



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128182** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)**C07K 16/28** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**C07K 14/00****C12N 15/13** (2006.01)**A61P 35/00**НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21)	Номер заявки:	а 2018 05270	(73)	Володілець (володільці): БІОНТЕХ АГ , An der Goldgrube 12 55131 Mainz, Germany (DE), Астеллас Фарма ІНК. , 5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-Ku, Tokyo 103-8411, Japan (JP), ТРОН-ТРАНСЛАЦІОНАЛЕ ОНКОЛОГІ АН ДЕР УНІВЕРЗІТЕТСМЕДІЦІН ДЕР ЙОХАННЕС ГУТЕНБЕРГ-УНІВЕРЗІТЕТ МАЙНЦ ГЕМАЙННЮТЦІГЕ ГмбХ , Freiligrathstr. 12 55131 Mainz, Germany (DE)
(22)	Дата подання заявки:	12.11.2013	(74)	Представник: Слободянюк Тарас Олександрович , реєстр. №217
(24)	Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	02.05.2024	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2007059997 A1, 31.05.2007 WO 2011057788 A1, 19.05.2011 Sahin Ugur et al. Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development. Clinical cancer research, The american association for cancer research, US, 2008, Vol. 14, no. 23, P. 7624-7634 Chad May et al. Advances in bispecific biotherapeutics for the treatment of cancer. Biochemical pharmacology, 2012, Vol. 84, no. 9, P. 1105-1112 Kerstin Fortmuller et al. Effective targeting of prostate cancer by lymphocytes redirected by a PSMA * CD3 bispecific single-chain diabody. Prostate, Wiley-Liss, New York, NY, US, 2010, Vol. 71, no. 6, P. 588-596 Penna et al. Antitumor x anti-CD3 bifunctional antibodies redirect T- cells activated in vivo with staphylococcal enterotoxin B to neutralize pulmonary metastases. Cancer research, 1994, Vol. 54, no. 10, P. 2738-2743
(31)	Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	PCT/EP2012/004712, PCT/EP2013/002270		
(32)	Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	13.11.2012, 30.07.2013		
(33)	Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP, EP		
(41)	Публікація відомостей про заявку:	12.11.2018, Бюл.№ 21		
(46)	Публікація відомостей про державну реєстрацію:	01.05.2024, Бюл.№ 18		
(62)	Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21):	а201505768, 12.11.2013		
(72)	Винахідник(и): Сахін Угур (DE), Тюречі Езлем (DE), Штадлер Крістіане (DE), Холанд Юлія (DE), Бер-Махмуд Хаят (DE), Байсерт Тім (DE), Плюм Лаура (DE), Ле Гол Фабріс (DE), Єндрецкі Арне (DE), Фідлер Маркус (DE)			

(54) АГЕНТИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЕКСПРЕСУЮЧИХ КЛАУДИН РАКОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

UA 128182 C2

(57) Реферат:

Винахід стосується з'єднувальних агентів, які містять з'єднувальний домен, який є специфічним відносно CD3, що забезпечує можливість зв'язування з Т-клітинами, і зв'язуючий домен, який є специфічним відносно пухлиноасоційованої молекули клаудина, а також способи застосування цих з'єднувальних агентів або нуклеїнових кислот для них для лікування раку.

Клаудини є інтегральними мембранними білками, локалізованими в щільних контактах епітелію й ендотелію. Передбачається, що клаудини містять чотири трансмембранні сегменти із двома позаклітинними петлями, і N- і C-кінці, розташовані в цитоплазмі. Клаудин (CLDN), сімейство трансмембранних білків, відіграє важливу роль у підтримці епітеліальних і ендотеліальних щільних контактів, а також може брати участь у підтримці цитоскелету й у клітинній сигналізації.

Молекула клаудина 18 (CLDN18) є інтегральним трансмембранним білком (тетраспанін), який має у своєму складі чотири трансмембранні гідрофобні області й дві позаклітинні петлі (петлю 1, розташовану між гідрофобною областю 1 і гідрофобною областю 2; петлю 2, розташовану між гідрофобними областями 3 і 4). CLDN18 існує у двох різних сплайс-варіантах, які описані в мишей і в людини (Niimi, Mol. Cell. Biol. 21:7380-90, 2001). Сплайс-варіанти (номер доступу в Genbank: сплайс-варіант 1 (CLDN18.1): NP_057453, NM_016369, і сплайс-варіант 2 (CLDN18.2): NM_001002026, NP_001002026) мають молекулярну масу приблизно 27,9/27,72 кДа. Сплайс-варіанти CLDN18.1 і CLDN18.2 відрізняються в N-кінцевій частині, яка містить першу трансмембранну (TM) область і петлю 1, тоді як первинна білкова послідовність на C-кінці є ідентичною.

У нормальних тканинах відсутня детектована експресія CLDN18.2, за винятком шлунка, де CLDN18.2 експресується винятково на короткоживучих диференційованих клітинах епітелію шлунка. Експресія CLDN18.2 зберігається в процесі злоякісної трансформації й, таким чином, часто проявляється на поверхні людських клітин раку шлунка. Більше того, цей пан-пухлинний антиген у значній мірі ектопічно активується при аденокарциномі стравоходу, підшлункової залози й легенів. Білок CLDN18.2 також локалізований у метастазах у лімфовузлах аденокарциноми шлунка й віддалених метастазах, особливо, у яєчниках (так звані пухлини Крукенберга).

CLDN6 експресується в ряді різних людських ракових клітин, при цьому експресія в нормальних тканинах обмежується плацентою.

Диференціальна експресія клаудинів, таких як CLDN18.2 і CLDN6, у ракових і нормальних клітинах, їх локалізація в мембрані й відсутність у переважної більшості з них токсичності відносно релевантних нормальних тканин робить ці молекули привабливими мішенями для імунотерапії раку, і використання лікарських засобів на основі антитіл для спрямованого впливу на клаудини в терапії раку обіцяє високий рівень терапевтичної специфічності.

Підходи, у яких використовується потенціал Т-клітин для лікування раку, включають вакцинацію білками, виділеними з пухлини; РНК або пептидними антигенами; інфузію виділених з пухлини, збагачених ex-vivo Т-клітин (названу адоптивним переносом); перенос гена Т-клітинного рецептора або пряме захоплення Т-клітин бі- або триспецифічними антитілами. Подібним чином, безліч стимуляторів Т-клітинних відповідей пройшли клінічне тестування в комбінації або у вигляді монотерапії, такі як ліганди для Toll-подібних рецепторів; антитіла, що блокують CTLA-4 на Т-клітинах; цитокіни, що стимулюють імунну відповідь; або антитіла, що нейтралізують молекули, залучені в «услизання» ракових клітин від імунної відповіді, такі як Tgf-Бета або B7-H1. Інтенсивна розробка терапій на основі Т-клітин продиктована тим спостереженням, що пацієнти, очевидно, живуть значно довше, якщо їх пухлини інфільтровані Т-клітинами. Більше того, численні мишачі моделі показали, що захоплення Т-клітин різними способами може усунути навіть великі пухлини, і ряд Т-клітинних терапій останнім часом добилися значного прогресу в лікуванні різних симптомів раку.

Задачею винаходу є забезпечення нових агентів і способів для терапії ракових захворювань.

Розв'язок проблеми, що лежить в основі винаходу, оснований на концепті створення з'єднувального агента, що містить з'єднувальний домен, який є специфічним відносно пухлиноасоційованої молекули клаудина, тобто ракових клітин. Інший з'єднувальний домен є специфічним відносно CD3, забезпечуючи зв'язування з Т-клітинами й входження в комплекс, роблячи, таким чином, можливим направлення цитотоксичної дії Т-клітин на ракові клітини. Утворення цього комплексу може індукувати передачу сигналу в цитотоксичних Т-клітинах, або самостійно, або в комбінації з А-клітинами, що приводить до вивільнення цитотоксичних медіаторів.

Автори вперше повідомляють, що з'єднувальні агенти, які направлено впливають на клаудин і CD3, можуть індукувати сильний опосередкований Т-клітинами лізис і є ефективними в лікуванні пухлинних захворювань.

Короткий опис винаходу

В одному аспекті винахід належить до з'єднувального агента, який містить щонайменше два з'єднувальні домени, при цьому перший з'єднувальний домен зв'язується із клаудином і другий з'єднувальний домен зв'язується з CD3. З'єднувальний агент за винаходом може зв'язуватися із цитотоксичною клітиною (утягуючи CD 3-рецептор) і раковою клітиною, яка експресує CLDN, яка є мішенню, що підлягає знищенню.

В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент є біспецифічною молекулою, такою як біспецифічне антитіло, зокрема біспецифічне одноланцюгове антитіло. В одному варіанті здійснення зазначений клаудин експресується в раковій клітині. В одному варіанті здійснення зазначений клаудин експресується на поверхні ракової клітини. В одному варіанті здійснення зазначений клаудин вибраний із групи, яка складається із клаудина 18.2 і клаудина 6. В одному варіанті здійснення зазначений перший з'єднувальний домен зв'язується з позаклітинним доменом зазначеного клаудина. В одному варіанті здійснення зазначений перший з'єднувальний агент зв'язується з нативними епітопами CLDN, присутніми на поверхні живих клітин. В одному варіанті здійснення зазначений перший з'єднувальний домен зв'язується з першою позаклітинною петлею CLDN. В одному варіанті здійснення зазначений другий з'єднувальний домен зв'язується з епсилон-ланцюгом CD3. В одному варіанті здійснення зазначений CD3 експресується на поверхні Т-клітини. В одному варіанті здійснення зв'язування зазначеного з'єднувального агента з CD3 на Т-клітинах приводить до проліферації й/або активації зазначених Т-клітин, при цьому зазначені активовані Т-клітини переважно вивільняють цитотоксичні фактори, наприклад перфोरини й гранзими, і ініціюють цитолізис і апоптоз ракових клітин. В одному варіанті здійснення зазначене зв'язування із клаудином і/або зазначене зв'язування з CD3 є специфічне зв'язування.

В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент знаходиться у форматі повнорозмірного антитіла або фрагмента антитіла. В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент містить чотири варіабельні домени антитіла щонайменше із двома з'єднувальними домонами, при цьому щонайменше один з'єднувальний домен зв'язується із клаудином і щонайменше один з'єднувальний домен зв'язується з CD3. В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент містить варіабельний домен важкого ланцюга імуноглобуліну (VH) зі специфічністю відносно антигену клаудину (VH(CLDN)), варіабельний домен легкого ланцюга імуноглобуліну (VL) зі специфічністю відносно антигену клаудину (VL(CLDN)), варіабельний домен важкого ланцюга імуноглобуліну (VH) зі специфічністю відносно CD3 (VH(CD3)), і варіабельний домен легкого ланцюга імуноглобуліну (VL) зі специфічністю відносно CD3 (VL(CD3)).

В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент знаходиться у форматі діатіла, яке містить варіабельний домен важкого ланцюга, з'єднаний з варіабельним доменом легкого ланцюга на тому ж самому поліпептидному ланцюзі таким чином, що два домени не утворюють пари. В одному варіанті здійснення діатіло містить два поліпептидні ланцюги, при цьому один поліпептид містить VH(CLDN) і VL(CD3) і інший поліпептидний ланцюг містить VH(CD3) і VL(CLDN).

В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент знаходиться у форматі біспецифічного одноланцюгового антитіла, яке складається із двох молекул scFv, з'єднаних за допомогою лінкерного пептиду, при цьому варіабельні області важкого ланцюга (VH) і відповідні варіабельні області легкого ланцюга (VL) переважно розташовані в напрямку від N-кінця до C-кінця в порядку VH(CLDN)-VL(CLDN)-VH(CD3)-VL(CD3), VH(CD3)-VL(CD3)-VH(CLDN)-VL(CLDN) або VH(CD3)-VL(CD3)-VL(CLDN)-VH(CLDN). В одному варіанті здійснення зазначені варіабельні області важкого ланцюга (VH) і відповідні варіабельні області легкого ланцюга (VL) з'єднані за допомогою довгого пептидного лінкера, переважно пептидного лінкера, що містить амінокислотні послідовності (GGGGS)₃ або VE(GGGGS)₂GGVD. В одному варіанті здійснення зазначені дві одиниці VH-VL або VL-VH scFv з'єднані за допомогою короткого пептидного лінкера, переважно пептидного лінкера, що містить амінокислотну послідовність SGGGGS або GGGGS.

В одному варіанті здійснення зазначений CLDN є CLDN18.2, і зазначена VH(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 8, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент, і VL(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 15, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент.

В одному варіанті здійснення зазначений CLDN є CLDN18.2, і зазначена VH(CLDN) містить

амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 6, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент, і VL(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 11, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент.

5 В одному варіанті здійснення зазначений CLDN є CLDN6, і зазначена VH(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 22, або її варіант, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент, і VL(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 23, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент.

10 В одному варіанті здійснення зазначений CLDN є CLDN6, і зазначена VH(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 22, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент, і VL(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 97, 98, 99 або 100, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент.

15 В одному варіанті здійснення зазначена VH(CD3) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 36, 94 або 95, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент, і VL(CD3) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 37 або 96, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент.

20 В одному варіанті здійснення зазначена VH(CD3) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 36, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент, і VL(CD3) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 37, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент.

25 В одному варіанті здійснення зазначена VH(CD3) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 95, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент, і VL(CD3) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 96 або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент.

В одному аспекті з'єднувальний агент за винаходом представлений у форматі біспецифічного одноланцюгового антитіла, яке містить дві молекули scFv, з'єднані за допомогою лінкерного пептиду, при цьому варіабельні області важкого ланцюга (VH) і відповідні варіабельні області легкого ланцюга (VL) розташовані в напрямку від N-кінця до C-кінця в порядку VH(CLDN)-VL(CLDN)-VH(CD3)-VL(CD3). В одному варіанті здійснення зазначені VH(CD3) і VL(CD3) з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що складається з 15-20, переважно 15 або 20 амінокислот, переважно гліцину й/або серину, і переважно з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що містить амінокислотну послідовність (GGGGS)⁴. В одному варіанті здійснення зазначені VH(CLDN) і VL(CLDN) з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що складається з 15-20, переважно 15 або 20 амінокислот, переважно гліцину й/або серину, і переважно з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що містить амінокислотну послідовність (GGGGS)⁴. В одному варіанті здійснення зазначені дві одиниці VH-VL scFv з'єднані за допомогою лінкерного пептиду, що містить амінокислотну послідовність SGGGGS. Одна або обидві із зазначених одиниць VH-VL scFv можуть містити один або більш сполучних дисульфідних містків.

В одному аспекті з'єднувальний агент за винаходом знаходиться у форматі біспецифічного одноланцюгового антитіла, яке містить дві молекули scFv, з'єднані за допомогою лінкерного пептиду, при цьому варіабельні області важкого ланцюга (VH) і відповідні варіабельні області легкого ланцюга (VL) розташовані в напрямку від N-кінця до C-кінця в порядку VL(CLDN)-VH(CLDN)-VH(CD3)-VL(CD3). В одному варіанті здійснення зазначені VH(CD3) і VL(CD3) з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що складається з 15-20, переважно 15 або 20 амінокислот, переважно гліцину й/або серину, і переважно з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що містить амінокислотну послідовність (GGGGS)⁴. В одному варіанті здійснення зазначені VL(CLDN) і VH(CLDN) з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що складається з 15-20, переважно 15 або 20 амінокислот, переважно гліцину й/або серину, і переважно з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що містить амінокислотну послідовність (GGGGS)⁵. В одному варіанті здійснення зазначені одиниці VL-VH і VH-VL scFv з'єднані за допомогою лінкерного пептиду, що містить амінокислотну послідовність SGGGGS. Одна або обидві із зазначених двох одиниць VL-VH або VH-VL scFv можуть містити один або більше сполучних дисульфідних містків.

В одному аспекті з'єднувальний агент за винаходом знаходиться у форматі біспецифічного одноланцюгового антитіла, яке містить дві молекули scFv, з'єднані за допомогою лінкерного пептиду, при цьому варіабельні області важкого ланцюга (VH) і відповідні варіабельні області

легкого ланцюга (VL) розташовані в напрямку від N-кінця до C-кінця в порядку VH(CLDN)-VL(CLDN)-VL(CD3)-VH(CD3). Переважно, зазначена одиниця VL(CD3)-VH(CD3) scFv містить один або більше сполучних дисульфідних містків. В одному варіанті здійснення зазначені VL(CD3) і VH(CD3) з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що складається з 20-25, переважно 20 або 25 амінокислот, переважно гліцину й/або серину, і переважно з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що містить амінокислотну послідовність (GGGGS)⁵. В одному варіанті здійснення зазначені VH(CLDN) і VL(CLDN) з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що складається з 15-20, переважно 15 або 20 амінокислот, переважно гліцину й/або серину, і переважно з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що містить амінокислотну послідовність (GGGGS)⁴. В одному варіанті здійснення зазначені одиниці VH-VL і VL-VH scFv з'єднані за допомогою лінкерного пептиду, що містить амінокислотну послідовність SGGGGS. Зазначена одиниця VH(CLDN)-VL(CLDN) scFv може містити один або більше сполучних дисульфідних містків.

В одному аспекті з'єднувальний агент за винаходом знаходиться у форматі біспецифічного однокланового антитіла, яке містить дві молекули scFv, з'єднані за допомогою лінкерного пептиду, при цьому варіабельні області важкого ланцюга (VH) і відповідні варіабельні області легкого ланцюга (VL) розташовані в напрямку від N-кінця до C-кінця в порядку VL(CLDN)-VH(CLDN)-VL(CD3)-VH(CD3). Переважно, зазначена одиниця VL(CD3)-VH(CD3) scFv містить один або більше сполучних дисульфідних містків. В одному варіанті здійснення зазначені VL(CD3) і VH(CD3) з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що складається з 20-25, переважно 20 або 25 амінокислот, переважно гліцину й/або серину, і переважно з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що містить амінокислотну послідовність (GGGGS)⁵. В одному варіанті здійснення зазначені VL(CLDN) і VH(CLDN) з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що складається з 20-25, переважно 20 або 25 амінокислот, переважно гліцину й/або серину, і переважно з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що містить амінокислотну послідовність (GGGGS)⁵. В одному варіанті здійснення зазначені дві одиниці VL-VH scFv з'єднані за допомогою лінкерного пептиду, що містить амінокислотну послідовність SGGGGS. Зазначена ланка VL(CLDN)-VH(CLDN) scFv може містити один або більше сполучних дисульфідних містків.

В одному варіанті здійснення кожного із зазначених вище аспектів зазначений CLDN є CLDN18.2. Переважно, зазначена VH(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 8, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент, і VL(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 15, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент. Альтернативно, зазначена VH(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 6, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент, і VL(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 11, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент. В одному варіанті здійснення зазначена VH(CD3) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 95, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент, і VL(CD3) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 96, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент.

В одному аспекті з'єднувальний агент за винаходом знаходиться у форматі біспецифічного однокланового антитіла, яке містить дві молекули scFv, з'єднаних за допомогою лінкерного пептиду, при цьому варіабельні області важкого ланцюга (VH) і відповідні варіабельні області легкого ланцюга (VL) розташовані в напрямку від N-кінця до C-кінця в порядку VH(CLDN)-VL(CLDN)-VH(CD3)-VL(CD3); або в порядку VH(CD3)-VL(CD3)-VH(CLDN)-VL(CLDN). В одному варіанті здійснення зазначені VH(CLDN) і VL(CLDN) з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що складається з 15-20, переважно 15 або 20 амінокислот, переважно гліцину й/або серину, і переважно з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що містить амінокислотну послідовність (GGGGS)³. В одному варіанті здійснення зазначені VH(CD3) і VL(CD3) з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що складається з 15-20, переважно 15 або 20 амінокислот, переважно гліцину й/або серину, і переважно з'єднані за допомогою пептидного лінкера, що містить амінокислотну послідовність GGGGS(GGS)³GGGGS. В одному варіанті здійснення зазначені дві одиниці VH-VL scFv з'єднані за допомогою лінкерного пептиду, що містить амінокислотну послідовність SGGGGS.

В одному варіанті здійснення зазначеного вище аспекту зазначений CLDN є CLDN6. Переважно, зазначена VH(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 22, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент. Переважно, зазначена VL(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 98, 99 або 100, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або

фрагмент. Найбільше переважно, зазначена VL(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 99, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент. В одному варіанті здійснення зазначена VH(CD3) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 95, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент, і VL(CD3) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 96, або її фрагмент, або варіант зазначеної амінокислотної послідовності або фрагмент.

В одному варіанті здійснення зазначений CLDN є CLDN18.2, і зазначений з'єднувальний агент за винаходом містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 38, 39, 40 і 41, або їх фрагментів або варіантів.

В одному варіанті здійснення зазначений CLDN є CLDN18.2, і зазначений з'єднувальний агент за винаходом містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 103, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 і 93, або її фрагмент або варіант. В одному варіанті здійснення зазначений CLDN є CLDN18.2, і зазначений з'єднувальний агент містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 103, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 і 93, або її фрагмент або варіант, при цьому зазначена амінокислотна послідовність позбавлена сигналів секреції, таких як N-кінцеві сигнали секреції, особливо послідовність відповідно до SEQ ID NO: 51, і/або позбавлена His-міток, таких як C-кінцеві His-мітки, особливо послідовність Gly-Gly-Ser-(His)₆ або (His)₆, у випадку присутності.

В одному варіанті здійснення зазначений CLDN є CLDN6, і зазначений з'єднувальний агент за винаходом містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 42, 43, 44 і 45, або її фрагмент або варіант.

В одному варіанті здійснення зазначений CLDN є CLDN6, і зазначений з'єднувальний агент за винаходом містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 101, 102, 60, 61, 62, 63, 64 і 65, або її фрагмент або варіант. В одному варіанті здійснення зазначений CLDN є CLDN6, і зазначений з'єднувальний агент містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 101, 102, 60, 61, 62, 63, 64 і 65, або її фрагмент або варіант, при цьому зазначена амінокислотна послідовність позбавлена сигналів секреції, таких як N-кінцеві сигнали секреції, особливо послідовність відповідно до SEQ ID NO: 51, і/або позбавлена His-міток, таких як C-кінцеві His-мітки, особливо послідовність Gly-Gly-Ser-(His)₆ або (His)₆, у випадку присутності.

В одному варіанті здійснення зазначені ракові клітини, які експресують CLDN18.2, являють собою ракові клітини раку, вибраного із групи, яка складається з раку шлунка, раку стравоходу, раку підшлункової залози, раку легені, такого як недрібноклітинний рак легені (NSCLC), раку молочної залози, раку яєчників, раку товстої кишки, раку печінки, раку голови й шиї, раку жовчного міхура, і їх метастазів, пухлини Крукенберга, перитонеальних метастазів і/або метастазів у лімфатичні вузли.

В одному варіанті здійснення зазначені ракові клітини, які експресують CLDN6, являють собою ракові клітини раку, вибраного із групи, яка складається з раку сечового міхура; раку яєчника, зокрема аденокарциноми яєчника й теракарциноми яєчника; раку легені, включаючи дрібноклітинний рак легені (SCLC) і недрібноклітинний рак легені (NSCLC), зокрема плоскоклітинний рак легені й аденокарциному; раку шлунка; раку молочної залози; раку печінки; раку підшлункової залози; раку шкіри, зокрема базальноклітинної карциноми й плоскоклітинної карциноми; злоякісної меланоми; раку голови й шиї, зокрема злоякісної плеоморфної аденоми; саркоми, зокрема синовіальної саркоми й карциносаркоми; раку жовчної протоки; раку сечового міхура, зокрема перехідно-клітинної карциноми й папілярного раку; раку нирки, зокрема плоскоклітинного раку, включаючи світлоклітинний рак нирки й папілярну карциному нирки; раку товстої кишки; раку тонкої кишки, включаючи рак клубової кишки, зокрема аденокарциноми тонкої кишки й аденокарциноми клубової кишки; ембріональної карциноми яєчка; плацентарної хоріокарциноми; раку шийки матки; раку яєчка, зокрема семіноми яєчка, тератоми яєчка й ембріонального раку яєчка; раку матки; герміноми, такої як тератокарцинома або ембріональна карцинома, зокрема ембріонально-клітинної пухлини яєчка і їх метастатичних форм.

В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент містить N-кінцевий сигнал секреції й/або C-кінцеву гістидинову епітопну мітку, переважно епітопну мітку із шести гістидинів.

В одному аспекті винахід належить до рекомбінантної нуклеїнової кислоти, яка кодує з'єднувальний агент за винаходом. В одному варіанті здійснення рекомбінантна нуклеїнова кислота знаходиться у формі вектора. В одному варіанті здійснення рекомбінантна нуклеїнова кислота є РНК.

В одному аспекті винахід належить до клітини-хазяїна, яка містить рекомбінантну нуклеїнову кислоту за винаходом.

В одному аспекті винахід належить до з'єднувального агента за винаходом, рекомбінантної нуклеїнової кислоти за винаходом або клітини-хазяїна за винаходом для застосування в терапії, зокрема для застосування в лікуванні й попередженні раку.

В одному аспекті винахід належить до фармацевтичної композиції, яка містить з'єднувальний агент за винаходом, рекомбінантну нуклеїнову кислоту за винаходом або клітину-хазяїна за винаходом.

В одному аспекті винахід належить до способу лікування або попередження ракового захворювання, який включає введення пацієнтові фармацевтичної композиції за винаходом.

В одному варіанті здійснення клітини зазначеного раку експресують клаудин, з яким зазначений з'єднувальний агент здатний зв'язуватися.

В одному варіанті здійснення зазначений клаудин є CLDN18.2, і зазначений рак вибраний із групи, яка складається з раку шлунка, раку стравоходу, раку підшлункової залози, раку легені, такого як недрібноклітинний рак легені (NSCLC), раку молочної залози, раку яєчника, раку товстої кишки, раку печінки, раку голови й шиї, раку жовчного міхура і їх метастазів, пухлини Крукенберга, перитонеальних метастазів і/або метастазів в лімфовузлах.

В одному варіанті здійснення зазначений клаудин є CLDN6, і зазначений рак вибраний із групи, яка складається з раку сечового міхура; раку яєчника, зокрема аденокарциноми яєчника й теракарциноми яєчника; раку легені, включаючи дрібноклітинний рак легені (SCLC) і недрібноклітинний рак легені (NSCLC), зокрема плоскоклітинний рак легені й аденокарциному; раку шлунка; раку молочної залози; раку печінки; раку підшлункової залози; раку шкіри, зокрема базальноклітинної карциноми й плоскоклітинної карциноми; злоякісної меланоми; раку голови й шиї, зокрема, злоякісної плеоморфної аденоми; саркоми, зокрема синовіальної саркоми й карциносаркоми; раку жовчної протоки; раку сечового міхура, зокрема перехідно-клітинної карциноми й папілярного раку; раку нирки, зокрема плоскоклітинного раку, включаючи світлоклітинний рак нирки й папілярну карциному нирки; раку товстої кишки; раку тонкої кишки, включаючи рак клубової кишки, зокрема аденокарциноми тонкої кишки й аденокарциноми клубової кишки; ембріональної карциноми яєчка; плацентарної хоріокарциноми; раку шийки матки; раку яєчка, зокрема семіноми яєчка, тератоми яєчка й ембріонального раку яєчка; раку матки; герміноми, такої як тератокарцинома або ембріональна карцинома, зокрема ембріонально-клітинної пухлини яєчка і їх метастатичних форм.

В одному аспекті винахід забезпечує з'єднувальний агент або нуклеїнову кислоту, що кодує з'єднувальний агент, або клітину-хазяїна, описану тут, для застосування в способах лікування, описаних тут. В одному варіанті здійснення винахід забезпечує фармацевтичну композицію, описану тут, для застосування в способах лікування, описаних тут.

Згідно з винаходом, CLDN18.2 переважно містить амінокислотну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 1, і CLDN6 переважно містить амінокислотну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 2 або 3.

Інші відмітні ознаки й переваги даного винаходу будуть очевидні з наступного докладного опису й пунктів формули винаходу.

Короткий опис креслень

Фіг. 1. Блокова схема, що ілюструє дизайн рекомбінантних білків bi-scFv, що направлено впливають на CLDN18.2 TAA.

Дизайн bi-scFvs в (A) N-кінцевому й (B) C-кінцевому положенні відносно варіабельних областей анти-TAA. Області VH і VL анти-CLDN18.2 створені на основі послідовності моноклонального антитіла CLDN18.2 (mCLDN18.2ab). Анти-CD3 є загальним для областей VH і VL, створених з послідовностей наступних моноклональних антитіл до CD3: UCHT1-HU (гуманізоване MAB), UCHT1, CLB-T3, TR66, 145-2C11. Bi-scFv означає біспецифічний однокланцюговий варіабельний фрагмент; His, гістидинова мітка, що містить 6 залишків гістидина; HU, гуманізоване; LL, довгий лінкер (15-18 амінокислот); Sec, сигнал секреції; SL, короткий лінкер (5-6 амінокислот); TAA, пухлиноасоційований антиген; V, варіабельна область важкого (H) і легкого (L) ланцюга антитіла.

Фіг. 2. Ефект орієнтації доменів і вибору анти-CD3-scFv на специфічний лізис клітин-мішеней: 5'-mCLDN18.2ab ^VH-^VL_ TR66 ^VH-^VL-3' 1BiMAB bi-scFvs і no.15 є найбільш сильними варіантами.

Кілька варіантів bi-scFv, спрямованих проти CLDN18.2 і CD3, були тимчасово експресовані в клітинах HEK293T і очищені в малому масштабі на колонках Ni-NTA для порівняння їх сили в аналізі на цитотоксичність. Як клітини-мішені використовували клітини NucC4, які ендегенно експресують CLDN18.2 і стабільно які експресують люциферазу. Людські T-клітини й клітини-

мішені інкубували в співвідношенні Е:Т, рівному 5:1, з 5 нг/мл кожного білка bi-scFv в 96-лунковому форматі. Як негативні контролю використовували по.35, що направлено впливає на неекспресований ТАА, по.11 і по.16 – обоє, що направлено впливають на мишачі, але не людські Т-клітини. Кожний тестований зразок висівали в шестиразовій повторності, контрольний зразок для L_{min} висівали в дев'ятикратній повторності. Час спільної інкубації перед початком аналізу склав 8 год, 16 год і 24 год. Після додавання розчину люциферину в задані моменти часу люмінесценцію вимірювали на рідері Infinite M200 TECAN. Специфічний лізис клітин-мішеней розраховували шляхом нормалізації до зразків з контрольним по.35 (L_{min}) bi-scFv. Найбільш сильні білки bi-scFv - 1BiMAB і по.15 – мали однакову орієнтацію доменів і походження анти-CD3 MAB TR66, але відрізнялися своєю оптимізацією кодонів (HS і CHO, відповідно) і довгими послідовностями лінкера. CHO означає клітини яєчника китайського хом'ячка; MAB, моноклональне антитіло; HU, гуманізоване; ТАА, пухлиноасоційований антиген.

Фіг. 3. Фарбування кумаси й вестерн-блот аналіз білка 1BiMAB bi-scFv.

Супернатант без FCS моноклональних клітин HEK293, які стабільно експресують 1BiMAB, очищали афінною хроматографією (IMAC) на колонку Ni-NTA. Аліквоти різних стадій очищення вносили на 4-12 % Bis-Tris гелі. (А) Фарбування Кумаси клітинного супернатанта, пропущення й вісім фракцій елюата. Фракції першого піка елюювання видаляли, фракції другого піка елюювання поєднували для наступних досліджень, діалізували проти PBS і потім проти 200 мМ аргінінового буфера (Доріжка 1: HEK293/1BiMAB SN; доріжка 2: Проточна фракція IMAC; доріжки 3-4: Фракції піка елюювання 1 (вилучені); доріжки 5-10: Фракції піка елюювання 2 (об'єднані)); (В) Вестерн-Блот аналіз 0,5 г 1BiMAB із трьох незалежних очищень (доріжка 1, 2, 3). Детекцію виконували з первинним моноклональним анти-His і вторинним антимишачим антитілом, кон'югованим з пероксидази. IMAC означає афінну хроматографію з використанням іммобілізованих металів; PBS, фосфатно-буферний сольовий розчин; SN, супернатант; WB, вестерн-блотинг.

Фіг. 4. Білок 1BiMAB bi-scFv ефективно й специфічно зв'язується з CLDN18.2-експресуючими клітинами-мішенями й людськими Т-клітинами.

(А) $2,5 \times 10^5$ клітин NugC4, ендogenно експресуючих CLDN18.2, інкубували з 50 мкг/мл 1BiMAB або 10 мкг/мл mCLDN18.2ab як позитивний контроль й відповідними APC-кон'югованими вторинними антитілами. Контрольні фарбування включали тільки вторинні APC-кон'юговані антитіла (g-a-h, g-a-m), анти-His і g-a-m APC, або 1BiMAB і g-a-m APC. Аналіз виконували за допомогою проточної цитометрії. MFI APC-Сигналу розраховували за допомогою програмного забезпечення Flowjo. (В) 1×10^5 клітин NugC4, ендogenно експресуючих CLDN18.2, фарбували наростаючими концентраціями 1BiMAB (20 пг/мл - 20 мкг/мл), анти-His і g-a-m APC. Як негативний контроль клітини інкубували з анти-His і g-a-m APC. Як позитивний контроль використовували mCLDN18.2ab і g-a-h APC. MFI APC-сигналу розраховували за допомогою програмного забезпечення Flowjo. (С) 1×10^6 людських Т-клітин інкубували з наростаючими концентраціями 1BiMAB (2 нг/мл - 2 мкг/мл), анти-His і g-a-m APC. Як негативний контроль клітини інкубували з анти-His і g-a-m APC або тільки g-a-m APC. MFI APC-сигналу розраховували за допомогою програмного забезпечення Flowjo. (D) 1×10^5 CLDN18.2-негативних клітин PA-1 інкубували з наростаючими концентраціями 1BiMAB (10 нг/мл - 10 мкг/мл), анти-His і g-a-m APC. Як негативний контроль клітини фарбували анти-His і g-a-m APC або тільки g-a-h APC. 10 мкг/мл mCLDN18.2ab і g-a-h APC використовували для підтвердження негативності клітин відносно CLDN18.2. G-a-h означає козяче-антилюдське; g-a-m, козяче-антимишаче; MFI, середня інтенсивність флуоресценції; TL, Т-лімфоцит.

Фіг. 5. Білок 1BiMAB bi-scFv викликає утворення кластерів Т-клітин на CLDN18.2-позитивних клітинах-мішенях.

Клітини NugC4, які ендogenно експресують CLDN18.2, інкубували протягом 24 год з 1 нг/мл і 1 мкг/мл 1BiMAB і людськими Т-клітинами в співвідношенні ефектора до мішені 5:1 в 6-лункових планшетах. Як контрольні зразки вибирали тільки Т-клітини (TL), тільки клітини-мішені (NugC4) і людські Т-клітини із клітинами-мішенями (-контр). Через 24 год робили знімки зразків за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse Ti при збільшенні 200х. Білі стрілки вказують на кластери Т-клітин на клітинах-мішенях. TL означає Т лімфоцит.

Фіг. 6.1 Bimab опосередковує Т-клітинну активацію дозо-залежним чином.

Клітини NugC4, які ендogenно експресують CLDN18.2, інкубували протягом 24 год і 48 год з наростаючими концентраціями білка 1BiMAB bi-scFv (0,001 - 1000 нг/мл) і людськими Т-клітинами в співвідношенні ефектора до мішені 5:1 у двох повторностях в 24-лунковому форматі. Як контроль людські Т-клітини інкубували з 1-1000 нг/мл 1BiMAB без клітин-мішеней NugC4 для підтвердження залежності від мішені активації Т-клітин, опосередкованої 1BiMAB. Через 24 год (А) і 48 год (В) Т-клітини збирали й мітили анти-CD3-FITC, анти-CD25-PE і анти-

CD69-APC, і аналізували за допомогою проточної цитометрії. TL означає Т-лімфоцит.

Фіг. 7.1 BiMAB опосередковує активацію Т-клітин, строго залежну від мішені, навіть після тривалої інкубації із клітинними лініями, високо-, низько- і неекспресуючими CLDN18.2.

(А) Показані дані RT-PCR, отримані із загальної РНК шести пухлинних клітинних ліній. Величини Ct експресії CLDN18.2, нормалізовані стосовно гена домашнього господарства HPRT, розраховували на підставі двох незалежних експериментів. Клітинна лінія раку молочної залози MCF7 (сірий стовпець) неекспресуюча CLDN18.2 була вибрана як контроль. (В) Ракові клітинні лінії (А) інкубували протягом 144 год з 5 нг/мл білка 1BiMAB bi-scFv з людськими Т-клітинами або без них у співвідношенні ефектора до мішені 5:1 у двох повторностях в 6-лунковому форматі. Т-клітини мітили анти-CD3-FITC, анти-CD25-PE і анти-CD69-APC для аналізу загальної популяції Т-клітин (CD3), ранньої активації (CD69) і пізньої активації (CD25) Т-клітин за допомогою проточної цитометрії. TL означає Т-лімфоцит.

Фіг. 8.1BiMAB індукує Т-клітинну проліферацію й підвищує регуляцію гранзима В тільки в присутності CLDN18.2-позитивних клітин-мішеней.

(А) Людські Т-клітини людини фарбували CFSE і вирощували окремо (TL) або в присутності 1 нг/мл 1BiMAB (TL + 1 нг/мл 1BiMAB), клітин NugC4 (TL + NugC4), або клітин NugC4 і 1 нг/мл 1BiMAB (TL + 1 нг/мл 1BiMAB + NugC4) протягом 120 год. Було вибране співвідношення ефектора до мішені, рівне 5:1. Зменшення сигналу CFSE, що вказує на Т-клітинну проліферацію, аналізували за допомогою проточної цитометрії. (В) Людські Т-клітини інкубували із клітинами-мішенями NugC4 або без них, і з 5 нг/мл білка 1BiMAB bi-scFv або без нього. Співвідношення ефектора до мішені складало 5:1 в 6-лунковому форматі. Через 96 год спільної інкубації Т-клітини збирали й внутриклітинно фарбували анти-GrB-PE і аналізували за допомогою проточної цитометрії. MFI-сигнал анти-GrB-PE розраховували за допомогою програмного забезпечення FlowJo. Сигнал незабарвленого зразка TL + NugC4 + 5 нг/мл 1BiMAB віднімали із усіх зразків. CFSE означає складний ефір сукцинимідилу й карбоксифлуоресцеїну; GrB, гранзим В; MFI, середня інтенсивність флуоресценції; PE, фікоеритрин; TL, Т-лімфоцити.

Фіг. 9. Величина EC50 1BiMAB для специфічного лізису клітин-мішеней через 48 год складала приблизно 10 нг/мл.

Клітини NugC4, які ендогенно експресують CLDN18.2, які стабільно експресують люциферазу, інкубували протягом 24 год і 48 год з білком 1BiMAB bi-scFv у наростаючих концентраціях (0,001-1000 нг/мл) з людськими Т-клітинами в співвідношенні ефектора до мішені 5:1 у трьох повторностях в 96-лунковому форматі. Як мінімальний лізис (L_{min}) контрольні ефекторні клітини й клітини-мішені висівали без 1BiMAB bi-scFv. Максимальний лізис (L_{max}) для нормалізації стосовно спонтанного числа імпульсів люмінесценції був досягнутий шляхом додавання Triton X-100 у контрольні лунки, що містять ефекторні клітини й клітини-мішені у відсутності bi-scFv безпосередньо перед додаванням люциферину. Після додавання розчину люциферину люмінесценцію вимірювали на мікропланшетному рідері Infinite M200 Tecan через 24 год і 48 год. Специфічний лізис клітин-мішеней розраховували за формулою: % специфічного лізису = $[1 - (\text{люмінесценція тестованого зразка} - L_{max}) / (L_{min} - L_{max})] \times 100$. Величини наносили залежно від $\log$ 10 концентрації 1BiMAB. Величина EC50 означає половину максимальної ефективної концентрації; L, лізис.

Фіг. 10.1BiMAB показує терапевтичну ефективність *in vivo* у моделі пухлини SC на пізній стадії.

Мишам NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtm1Wjl/Sz.T (NSG) ін'єктували підшкірно (SC) клітини HEK293 у кількості 1×10^7 , стабільно, які експресують CLDN18.2. Через п'ять днів клітини PBMC людини як ефекторні клітини у кількості 2×10^7 ін'єктували інтраперитонеально (IP) групам G3 і G4, контрольні групи (G1 і G2) одержували тільки PBS. Наступного дня починали щоденне IP уведення 5 мкг білка 1BiMAB bi-scFv кожній тварині або носія як контролю. Терапію проводили протягом 22 днів, обсяг пухлини вимірювали з використанням каліпера й розраховували за формулою $\text{мм}^3 = \text{довжина мм} \times \text{ширина мм} \times (\text{ширина мм} / 2)$. (А) Обсяг пухлини однієї миші й середнє значення на групу показано для лікувальних днів 0 і 15 (верхній ряд), і днів 3 і 13 після закінчення лікування (нижній ряд). (В) Показаний середній обсяг пухлини двох лікувальних груп, привитих людськими ефекторними клітинами. Тире вказує забитих тварин. (С) Крива виживаності Каплана-Мейєра, що демонструє всі групи від дня інокуляції пухлини до дня 41. Тварин забивали після досягнення обсягу пухлини 500 мм^3 . Після дня 41 тварин, що залишилися, забивали для аналізу приживлення людських ефекторних клітин у селезінках мишей. (D) Спленоцити всіх мишей ізолювали й фарбували анти-CD45-APC і анти-CD3-FITC для детекції людських Т-клітин за допомогою проточної цитометрії. Медіана приживлення відображена на коробчатій діаграмі. G означає групу; IP, інтраперитонеально; PBMC, моноклеарні клітини периферичної крові; PBS, фосфатно-буферний сольовий розчин; SC,

підшкірно.

Фіг. 11. Блокова схема, що ілюструє дизайн рекомбінантних білків bi-scFv, що направлено впливають на CLDN6 TAA.

Дизайн bi-scFvs в (A) N-кінцевому (B) C-кінцевому положенні відносно варіабельних областей анти-TAA. Области VH і VL анти-CLDN6 створені на основі послідовності моноклонального антитіла CLDN6 (mCLDN6ab). Области VH і VL анти-CD3 створені на основі послідовності моноклонального антитіла CD3 TR66. Bi-scFv означає біспецифічний одноланцюговий варіабельний фрагмент; His, гістидинова мітка, що містить шість залишків гістидина; LL, довгий лінкер (15-18 амінокислот); Sec, сигнал секреції; SL, короткий лінкер (5 амінокислот); TAA, пухлиноасоційований антиген; V, варіабельна область важкого (H) і легкого (L) ланцюга антитіла.

Фіг. 12. Білки 6PHU5 і 6PHU3 bi-scFv викликають утворення кластерів Т-клітин на CLDN 6-позитивних клітинах-мішенях.

Клітини PA-1, які ендogenно експресують CLDN6, інкубували протягом 24 год з 50 нг/мл 6PHU5 або 6PHU3 і людськими Т-клітинами людини в співвідношенні ефектора до мішені 5:1 в 6-лункових планшетах. Як контрольні зразки були вибрані тільки Т-клітини (TL), тільки клітини-мішені (PA-1) і людські Т-клітини із клітинами-мішенями (-контр.). Через 24 год робили знімки зразків на мікроскопі Nikon Eclipse Tj при збільшенні 200х. Білі стрілки вказують на Т-клітинні кластери на клітинах-мішенях. TL означає Т-лімфоцити.

Фіг. 13. Ефект орієнтації доменів на ефективність: білок 6PHU3 bi-scFv є небагато більш ефективним відносно індукції активації Т-клітин у порівнянні з 6PHU5.

Клітини PA-1, які ендogenно експресують CLDN6, інкубували протягом 44 год з наростаючими концентраціями (5 - 200 нг/мл) 6PHU5 або 6PHU3 і людськими Т-клітинами в співвідношенні ефектора до мішені 5:1 у двох повторностях в 6-лунковому форматі. Як контроль людські Т-клітини людини інкубували з 100 і 200 нг/мл 6PHU5 або 6PHU3 без клітин-мішеней. Через 44 год Т-клітини збирали й мітили анти-CD3-FITC, анти-CD25-PE і анти-CD69-APC. Дозозалежну Т-клітинну активацію аналізували за допомогою проточної цитометрії. Ну означає людські; TL, Т-лімфоцити.

Фіг. 14. Фарбування кумаси й вестерн-блот аналіз білка 6PHU3.

Супернатант без FCS поліклональних клітин HEK293, стабільно експресуючих 6PHU3, очищали на Ni-NTA афінної хроматографії (IMAC). Аліквоти різних стадій очищення наносили на 4-12% Bis-Tris гелі. (A) Фарбування кумаси клітинного супернатанта, пропущення й дев'ять фракцій елюата. Фракції першого піка елюювання видаляли, фракції другого й третього піків елюювання поєднували для подальших досліджень, діалізували проти PBS і потім проти 200 мМ аргінінового буфера. (Доріжка 1: HEK293/6PHU3 SN; доріжка 2: IMAC проточні фракції; доріжки 3 - 5: Фракції піка елюювання 1 (вилучені); доріжки 6-11: Фракції піка елюювання 2 і 3 (об'єднані)) (B) Вестерн-Блот аналіз 0,5 мкг 6PHU3 із двох незалежних очищень. Детекцію виконували з первинним моноклональним анти-His і вторинним антимішачим антитілом, кон'югованим з пероксидазою. IMAC означає афінну хроматографію з використанням іммобілізованих металів; PBS; фосфатно-буферний сольовий розчин; SN, супернатант; WB, вестерн-блотинг.

Фіг. 15. Білок 6PHU3 bi-scFv ефективно й специфічно зв'язується з CLDN 6-експресуючими клітинами-мішенями й людськими Т-клітинами.

(A) 1×10^5 клітин PA-1, ендogenно експресуючих CLDN6, і клітини OV-90 інкубували з наростаючими концентраціями 6PHU3 або контрольним 1BiMAB bi-scFv (10 нг/мл - 10 мкг/мл) і 10 мкг/мл mCLDN6ab або контрольним MAB mCLDN18.2ab з відповідними APC-кон'югованими вторинними антитілами. Контрольні фарбування являли собою тільки вторинні APC-кон'юговані антитіла (g-a-h, g-a-m). Аналіз виконували за допомогою проточної цитометрії. MFI APC-сигналу розраховували за допомогою програмного забезпечення Flowjo. (B) 5×10^5 людських Т-клітин інкубували з наростаючими концентраціями 6PHU3 (100 нг/мл - 10 мкг/мл), анти-His і g-a-m PE. Як негативний контроль клітини інкубували з анти-His і g-a-m PE або тільки g-a-m PE. MFI PE-сигналу розраховували за допомогою програмного забезпечення Flowjo. (C) 1×10^5 CLDN 6-негативних клітин NucC4 інкубували з наростаючими концентраціями 6PHU3 і 1BiMAB (10 нг/мл - 10 мкг/мл), анти-His і g-a-m APC. Як негативний контроль клітини інкубували тільки з g-a-m APC. 10 мкг/мл mCLDN6ab і g-a-h APC використовували для підтвердження негативності CLDN6 клітин. Як позитивний контроль використовували mCLDN18.2ab і g-a-h APC. MFI APC-сигналу розраховували за допомогою програмного забезпечення Flowjo. APC означає алофікоціанін; g-a-h, козячі-антилюдські; g-a-m, козячі-антимішачі; MAB, моноклональне антитіло; MFI, середня інтенсивність флуоресценції; PE, фікоеритрин; TL, Т-лімфоцит.

Фіг. 16. 6PHU3 опосередковує активацію Т-клітин дозозалежним чином

Клітини PA-1, які ендogenous експресують CLDN6, інкубували протягом 24 год і 48 год з наростаючими концентраціями білка 6PHU3 bi-scFv (0.001-1000 нг/мл) і людськими Т-клітинами в співвідношенні ефектора до мішені 5:1 у двох повторностях в 24-лунковому форматі. Як контроль людські Т-клітини інкубували з 1-1000 нг/мл 6PHU3 без клітин-мішеней PA-1 для підтвердження залежності від мішені активації Т-клітин, опосередкованої 6PHU3. Через 24 год (А) і 48 год (В) Т-клітини збирали й мітили анти-CD3-FITC, анти-CD25-PE і анти-CD69-APC, і аналізували за допомогою проточної цитометрії. TL означає Т-лімфоцити.

Фіг. 17. Величина EC50 6PHU3 для специфічного лізису клітин-мішеней через 48 год склала приблизно 10 пг/мл.

Клітини PA-1, які ендogenous експресують CLDN6, які стабільно експресують люциферазу, інкубували протягом 24 год і 48 год з білком 6PHU3 у наростаючих концентраціях (0,001-1000 пг/мл) з людськими Т-клітинами в співвідношенні ефектора до мішені 5:1 у трьох повторностях в 96-лунковому форматі. Як мінімальний контроль лізису (L_{min}) ефекторні клітини й клітини-мішені висівали без 6PHU3 bi-scFv. Максимальний лізис (L_{max}) для нормалізації відносно числа імпульсів спонтанної люмінесценції був досягнутий шляхом додавання Triton X-100 у контрольні лунки, що містять ефекторні клітини й клітини-мішені при відсутності bi-scFv безпосередньо перед додаванням люциферину. Після додавання розчину люциферину люмінесценцію вимірювали на мікропланшетному рідері Infinite M200 Тесла через 24 год і 48 год. Специфічний лізис клітин-мішеней розраховували за формулою: $\% \text{ специфічного лізису} = [1 - (\text{люмінесценція тестованого зразка} - L_{max}) / (L_{min} - L_{max})] \times 100$. Значення наносили залежно від $\log_{10}$ концентрації 6PHU3. Величина EC50 означає половину максимальної ефективної концентрації; L, лізис.

Фіг. 18. 6PHU3 показує терапевтичну in vivo ефективність у моделі пухлини SC на пізній стадії.

Мишам NOD.Cg-Prkd^{scid} IL2rg^{tm1Wj1}/Szj (NSG) ін'єктували підшкірно (SC) клітини PA-1 у кількості 1×10^7 , які ендogenous експресують CLDN6. Через 15 днів групам G3 і G4 інтраперитонеально (IP) ін'єктували клітини PBMC людини в кількості 2×10^7 , контрольні групи (G1 і G2) одержували тільки PBS. Щоденне IP уведення 5 мкг 6PHU3 кожній тварині або контрольного 1BiMAB bi-scFv, або тільки носія як контролю починали через п'ять днів після ін'єкції PBMC. Терапію проводили протягом 25 днів, обсяг пухлини вимірювали за допомогою каліпера й розраховували за формулою $\text{мм}^3 = \text{довжина, мм} \times \text{ширина, мм} \times (\text{ширина, мм} / 2)$. (А) Обсяг пухлини однієї миші й середнє значення на групу показано для днів 0 і 14 терапії (верхній ряд), і 21 і 25 (нижній ряд). (В) Показаний середній обсяг пухлини всіх лікувальних груп. Пунктирні лінії означають забитих тварин. (С) Показана крива виживаності Каплана-Мейєра, для всіх груп від дня інюкуляції пухлини до дня 45. Тварин забивали при обсязі пухлини $>1500 \text{ мм}^3$. Через 45 днів усіх, що залишилися тварин забивали для аналізу приживлення людських ефекторних клітин у селезінках мишей. (D) Спленоцити всіх мишей виділяли й фарбували анти-CD45-APC і анти-CD3-FITC для детекції людських Т-клітин за допомогою проточної цитометрії. Медіана приживлення відбита на коробчатій діаграмі. IP означає інтраперитонеально; PBMC, моноклеарні клітини периферичної крові; PBS, фосфатно-буферний сольовий розчин; SC, підшкірно.

Фіг. 19. Підвищена інфільтрація Т-клітин в SC PA-1 пухлини у відповідь на терапію 6PHU3.

Мишам NSG ін'єктували підшкірно (SC) клітини PA-1 у кількості 1×10^7 , які ендogenous експресують CLDN6. Через 15 днів групам G3 і G4 інтраперитонеально (IP) ін'єктували клітини PBMC людини в кількості 2×10^7 , контрольні групи (G1 і G2) одержували тільки PBS. Щоденне IP уведення 5 мкг 6PHU3 кожній тварині або контрольного 1BiMAB bi-scFv, або тільки носія як контролю починали через п'ять днів після ін'єкції PBMC. Пухлини вирізали при розмірі 1500 мм^3 або наприкінці експерименту, і консервували в 4 % буферному розчині формальдегіду для поміщення в парафін.

Поміщені в парафін пухлинні тканини SC PA-1 пухлин піддавали імуногістохімічним фарбуванням. Послідовні зрізи фарбували поліклональним первинним антитілом антиклаудин 6 або антилюдськими CD3. Первинні антитіла детектували з використанням вторинних антикролячих антитіл, кон'югованих з пероксидазою HRP. Верхні ряди А-Е показують фарбування CLDN6, нижні ряди фарбування CD3. Зображення одержували за допомогою сканера Mirax. (А) і (В) показують PBS-контрольні групи G1 і G2, які не одержували людських ефекторних клітин і одержували носій або 6PHU3 bi-scFv, відповідно, (С) показує контрольну групу G3, яка одержувала людські ефекторні клітини й носій як терапію, (D) показує групу G4, яка одержувала людські ефекторні клітини й 6PHU3 bi-scFv як терапію, і (Е) показує контрольну групу G5, яка одержувала людські ефекторні клітини й контрольні 1BiMAB bi-scFv. Позитивні сигнали з'являються у вигляді червоного фарбування. Чорні стрілки вказують на приклади сигналів CD3. IP означає інтраперитонеально; PBMC, моноклеарні клітини периферичної

крові; PBS, фосфатно-буферний сольовий розчин; SC, підшкірно.

Фіг. 20. Схематичне зображення молекул IVT-РНК антитіла, що кодують, bi-scFv, що направлено впливають на CLDN18.2 TAA.

Схема *in vitro* транскрибованих послідовностей РНК, що кодують анти-CLDN18.2 антитіла bi-scFv. (А) IVT-мРНК в 5'- і 3'-положенні щодо варіабельних областей анти-TAA. (В) IVT альфавірусний реплікон в 5'-положенні щодо варіабельних областей анти-TAA. Области VH і VL анти-CLDN18.2 створювали на основі послідовності моноклонального антитіла CLDN18.2 (mCLDN18.2ab). «Кеп» однаково використовується для ARCA, бета-S-ARCA (DI) або бета-S-ARCA (D2). В (А) «анти-CD3» означає області VH і VL, створені на основі послідовностей наступних моноклональних CD3 антитіл: UCHT1-HU (гуманізоване MAB), UCHT1, CLB-T3, TR66, 145-2C11, в (В) «анти-CD3» описує тільки VH і VL з TR66. А означає аденін; bi-scFv, біспецифічний одноланцюговий варіабельний фрагмент; hAg, людський альфа глобін 5'-UTR; hBg, людський бета-глобін 3'-UTR; His, гістидинова мітка, що містить шість залишків гістидину; IVT, *in vitro* транскрибований; LL, довгий лінкер (15-18 амінокислот); nsPI-4, неструктурні білки 1-4; Sec, сигнал секреції; sgP, субгеномний промотор; SL, короткий лінкер (5-6 амінокислот); TAA, пухлиноасоційований антиген; UTR, нетрансльована область; V, варіабельна область важкого (H) ланцюга й легкого (L) ланцюга антитіла.

Фіг. 21. Ефект орієнтації доменів і вибору анти-CD3-scFv на залежну від мішені активацію Т-клітин і специфічний лізис клітин-мішеней.

Клітини NugC4, які ендogenно експресують CLDN18.2, тимчасово трансфікували декількома варіантами bi-scFv, спрямованими проти CLDN18.2 і CD3 для порівняння їх сили в аналізі на цитотоксичність. Клітини NugC4 у кількості 5×10^6 на кожний варіант електропорували з 20 мкг/мл IVT-мРНК. Трансфіковані клітини-мішені підраховували, 1×10^5 клітин засівали на кожний 6-лунковий планшет і інкубували з людськими цитотоксичними Т-клітинами (вибрані Т клітини CD8⁺) у співвідношенні Е:Т, рівному 5:1. Як негативні контролю використовували IVT-мРНК bi-scFv, що направлено впливає на неекспресований TAA (контр), і батьківське IgG MAB chCLDN18.2ab (контр IgG), що направлено впливає на CLDN18.2, але не Т-клітини. Білок 1BiMAB у концентрації 5 нг/мл служив як позитивний контроль. Як референсні фонові загиблі клітини електропоровані клітини засівали без Т-клітин і, як референсну фонову активацію Т-клітини засівали без клітин-мішеней. Кожний зразок висівали у двох повторностях. Через 48 год Т-клітини й клітини-мішені збирали й мітили анти-CD3-FITC, анти-CD25-PE, анти-CD69-APC і 7-AAD для фарбування живих і загиблих клітин і аналізували за допомогою проточної цитометрії. (А) TAA-залежну, опосередковану bi-scFv активацію Т-клітин спостерігали для всіх варіантів анти-CLDN18.2 bi-scFv. (В) Специфічний лізис клітин-мішеней визначали шляхом вирахування референсної популяції 7-AAD з популяції клітин-мішеней зразків 7-AAD. Антитіла bi-scFv, що викликає небагато більш високий лізис клітин-мішеней - 1BiMAB і по.5 – мають однакову орієнтацію доменів і анти-CD 3-походження MAB TR66, але відрізняються оптимізацією своїх кодонів (HS і CHO, відповідно) і послідовностями довгого лінкера. Bi-scFv означає біспецифічний одноланцюговий варіабельний фрагмент; контр, контроль; IgG, імуноглобулін G; IVT, *in vitro* транскрибований; мРНК, месенджер РНК; TL, Т-лімфоцит.

Фіг. 22. Спільна інкубація клітин-мішеней, трансфікованих IVT-мРНК 1BiMAB, і людських Т-клітин приводить до утворення кластерів Т-клітин.

Клітини NugC4, які ендogenно експресують CLDN18.2, тимчасово трансфікували шляхом електропорації 80 мкг/мл IVT-мРНК 1BiMAB і інкубували разом з людськими цитотоксичними Т-клітинами (вибрані Т-клітини CD8⁺) у співвідношенні ефектора до мішені 5:1 в 96-лункових планшетах. Як негативний контрольний зразок використовували клітини-мішені NugC4, трансфіковані IVT-мРНК bi-scFv, що направлено впливають на неекспресований TAA (-контр), спільно інкубовані з людськими цитотоксичними Т-клітинами (верхній ряд, ліворуч). Нижній ряд показує клітини NugC4, трансфіковані контрольним bi-scFv (ліворуч) або IVT-мРНК 1BiMAB (праворуч) без людських Т-клітин. Через 24 год спільної інкубації робили знімки зразків на мікроскопі Nikon Eclipse Ti при збільшенні 200х. Білі стрілки вказують на Т-клітинні кластери на клітинах-мішенях. CTL означає цитотоксичні Т-лімфоцити; контр, контроль; hu, людські.

Фіг. 23. 1BiMAB, секретований клітинами-мішенями після трансфекції IVT-мРНК, опосередковує активацію Т-клітин залежним від концентрації чином.

Клітини NugC4, які ендogenно експресують CLDN18.2, тимчасово трансфікували шляхом електропорації IVT-мРНК у загальній кількості 40 мкг/мл, що містять 0.4-40 мкг/мл IVT-мРНК 1BiMAB плюс відповідні кількості IVT-мРНК люциферази. Трансфіковані клітини-мішені спільно інкубували з людськими цитотоксичними Т-клітинами (вибрані Т клітини CD8⁺) у співвідношенні ефектора й мішені 5:1 в 6-лункових планшетах у двох повторностях. Як активацію Т-клітин референсні людські Т-клітини спільно інкубували із клітинами-мішенями NugC4,

трансфікованими 40 мкг/мл IVT-мРНК люциферази (0.0 мкг/мл IVT-мРНК 1BiMAB). Через 24 год (А) і 48 год (В) Т-клітини збирали й мітили анти-CD3-FITC, анти-CD25-PE і анти-CD69-APC, і аналізували за допомогою проточної цитометрії. На діаграмах показаний процентний вміст позитивно пофарбованих цитотоксичних Т-клітин людини, визначений за допомогою програмного забезпечення Flowjo. IVT означає *in vitro* транскрибовані; мРНК, месенджер РНК; TL, Т-лімфоцит.

Фіг. 24. 1BiMAB, секретований клітинами-мішенями після трансфекції IVT-мРНК, приводить до залежного від концентрації лізису клітин-мішеней.

Клітини NugC4, які ендогенно експресують CLDN18.2, тимчасово трансфікували шляхом електропорації IVT-мРНК у загальній кількості 40 мкг/мл, що містить 0,4 - 40 IVT-мРНК 1BiMAB плюс відповідні кількості IVT-мРНК люциферази або 40 мкг/мл тільки IVT-мРНК люциферази як референсний зразок. Трансфіковані клітини-мішені засівали з людськими цитотоксичними Т-клітинами (вибрані Т-клітини CD8⁺) у співвідношенні ефектора й мішені 5:1 або без ефекторних клітин для визначення процентного вмісту фонових загиблих клітин-мішеней шляхом індивідуальної електропорації. Усі зразки вирощували в 6-лункових планшетах у двох повторностях. Через 24 год (А) і 48 год (В) Т-клітини збирали, мітили йодидом пропідію (PI) для фарбування живих/загиблих клітин і аналізували за допомогою проточної цитометрії. Процентний вміст загиблих (PI⁺) клітин-мішеней визначали за допомогою програмного забезпечення Flowjo. Значення потім нормалізували відносно кожного індивідуального фонового зразка й референсного зразка. IVT означає *in vitro* транскрибовані; мРНК, месенджер РНК; TL, Т-лімфоцит.

Фіг. 25. Т-клітинна проліферація специфічно індукована у відповідь на секрецію 1BiMAB клітинами-мішенями в присутності CLDN18.2

Людські Т-клітини фарбували CFSE для аналізу. Т-клітини вирощували без клітин-мішеней (Т-клітини) у комбінації з 5 мкг/мл OKT3 і 2 мкг/мл α CD28 як позитивний контроль активації (+контр), з 5 нг/мл нетаргетного контрольного bi-scFv (білок -контр) або з 5 нг/мл білка 1BiMAB (білок 1BiMAB). Т-клітини й клітини-мішені NugC4, які надекспресують CLDN18.2, інкубували разом (Т-клітини+ CLDN18.2-позитивні клітини-мішені) без будь-чого (що імітує контроль) або з 5 нг/мл білка 1BiMAB (білок 1BiMAB). Для тестування IVT-мРНК клітини NugC4 трансфікували 20 мкг/мл IVT-мРНК 1BiMAB (мРНК 1BiMAB) або IVT-мРНК bi-scFv, що направлено впливають на неекспресований TAA (мРНК-контр) і інкубували з Т-клітинами. Крім того, клітини NugC4, трансфіковані IVT-мРНК bi-scFv, що направлено впливають на неекспресований TAA, поєднували з 5 нг/мл білка 1BiMAB (мРНК -контр + білок 1BiMAB). Як додатковий контроль специфічності включали зразки, що містять неекспресуючу CLDN18.2 лінію клітин-мішеней MDA-MB-231 разом з Т-клітинами (Т-клітини+ CLDN18.2-негативні клітини-мішені). MDA-MB-231 використовували неопрацьованими й інкубували без будь-чого (контроль, що імітує), з 5 нг/мл контрольного білка bi-scFv (білок-контр) або 5 нг/мл білка 1BiMAB (білок 1BiMAB), або MDA-MB-231 трансфікували 20 г/мл IVT-мРНК 1BiMAB (мРНК 1BiMAB) або IVT-мРНК bi-scFv, що направлено впливають на неекспресований TAA (мРНК -контр). Аналіз виконували при співвідношенні ефектора до мішені 5:1 в 96-лунковому планшеті, кожний зразок готували в трьох повторностях, і час інкубації склав 72 год. Зменшення сигналу CFSE, що вказує на проліферацію Т-клітин, аналізували за допомогою проточної цитометрії, розраховували за допомогою програмного забезпечення Flowjo і наносили на графік у вигляді % проліферуючих Т-клітин. CFSE означає складний ефір сукцинімідилу й карбоксифлуоресцеїну; IVT, *in vitro* транскрибований; мРНК, месенджер РНК.

Фіг. 26. Активація Т-клітин і опосередкований Т-клітинами лізис клітин-мішеней у відповідь на секрецію 1BiMAB починається при співвідношенні ефектора й мішені 0,3:1.

Клітини NugC4, які ендогенно експресують CLDN18.2, тимчасово трансфікували шляхом електропорації 40 мкг/мл IVT-мРНК 1BiMAB. Трансфіковані клітини-мішені спільно інкубували з людськими цитотоксичними Т-клітинами (вибрані Т-клітини CD8⁺) у зазначених співвідношеннях ефектора й мішені в діапазоні від 0,3:1 до 10:1 в 6-лункових планшетах у двох повторностях. Як референсні зразки людські Т-клітини вирощували під час відсутності клітин-мішеней ((А) 1:0) і клітини-мішені, трансфіковані контрольним IVT-мРНК, вирощували під час відсутності ефекторних клітин ((В) 0:1). Як негативний контроль людські Т-клітини спільно інкубували із клітинами-мішенями NugC4, трансфікованими 40 мкг/мл IVT-мРНК люциферази (контр IVT-мРНК) у співвідношенні Е:Т, рівному 10:1, ((А) і (В) контр IVT-мРНК 10:1). Через 48 год клітини збирали й мітили анти-CD3-FITC, анти-CD25-PE, анти-CD69-APC і йодидом пропідію (PI) для фарбування живих/загиблих клітин і аналізували за допомогою проточної цитометрії. (А) показує процентний вміст позитивно пофарбованих цитотоксичних людських Т-клітин. (В) демонструє процентний вміст загиблих (PI⁺) клітин-мішеней. Усі величини визначали за

допомогою програмного забезпечення Flowjo. E:T означає співвідношення ефектора й мішені; IVT, *in vitro* транскрибований; мРНК, месенджер РНК; TL, Т-лімфоцит.

Фіг. 27. Людські цитотоксичні Т-клітини можуть служити як реципієнт IVT-мРНК bi-scFv клітин-продуцентів

Людські цитотоксичні Т-клітини виділяли зі свіжих РВМС шляхом CD 8-позитивного відбору й потім тимчасово трансфікували шляхом електропорації 80 або 240 мкг/мл IVT-мРНК 1BiMAB. Трансфіковані ефекторні клітини спільно інкубували із клітинами-мішенями NucC4, ендогенно експресуючими CLDN18.2, у співвідношенні ефектора й мішені 5:1 в 6-лункових планшетах у двох повторностях. Як референсні зразки неопрацьовані людські Т-клітини вирощували із клітинами-мішенями. Як негативний контроль людські Т-клітини, трансфіковані 80 або 240 мкг/мл IVT-мРНК контролю eGFP, спільно інкубували із клітинами-мішенями NucC4. Через 48 год клітини збирали й мітили анти-CD3-FITC, анти-CD25-PE, анти-CD69-APC і йодидом пропідію (PI) для фарбування живих і загиблх клітин, і аналізували за допомогою проточної цитометрії. (А) показує процентний вміст позитивно пофарбованих цитотоксичних людських Т-клітин. В (В) показано процентний вміст загиблх (PI⁺) клітин-мішеней, нормалізованих до референсного зразка. Усі величини визначали за допомогою програмного забезпечення Flowjo. контр означає контрольний; IVT; *in vitro* транскрибовані; мРНК, месенджер РНК; TL, Т-лімфоцит.

Фіг. 28. CLDN18.2-негативні клітини-мішені, трансфіковані IVT-мРНК 1BiMAB, не є лізованими Т-клітинами

CLDN18.2-негативна лінія клітин PA-1, стабільно експресуюча люциферазу, служила як лінія клітин-мішеней. 5×10^6 клітин PA-1/лус трансфікували шляхом електропорації IVT-мРНК у загальній кількості 40 мкг/мл. Як позитивний контроль трансфікували 4 і 40 мкг/мл IVT-мРНК 1BiMAB або 6RHU3, що направлено впливає на CLDN6, що ендогенно експресується. Як bi-scFv-негативний контроль трансфікували 40 мкг/мл IVT-мРНК bi-scFv, що направлено впливає на неекспресований ТАА (- контр). Цей IVT-мРНК служив також як наповнення РНК в 4 мкг/мл зразків IVT-мРНК (4 мкг/мл IVT-мРНК 1BiMAB, 4 мкг/мл IVT-мРНК 6RHU3). Включені контрольні зразки білків, що містять 1BiMAB і 6RHU3 у комбінації з bi-scFv-негативним контролем, трансфіковані клітинами PA-1/лус і ефекторними клітинами.

Трансфіковані клітини-мішені засівали з людськими цитотоксичними Т-клітинами (пан-Т-клітини) у співвідношенні ефектора й мішені 5:1. Усі зразки засівали в трьох повторностях в 96-лунковому форматі й спільно інкубували протягом 72 год. Як контроль мінімального лізису (L_{min}) кожний індивідуальний зразок трансфікованих клітин-мішеней засівали без ефекторних клітин. Максимальний лізис (L_{max}) для нормалізації стосовно числа імпульсів спонтанної люмінесценції досягався шляхом додавання Triton X-100 у контрольні лунки, що містять ефекторні клітини й неопрацьовані клітини-мішені (L_{max1}) або тільки неопрацьовані клітини-мішені (L_{max2}) перед додаванням люциферину. Через 30 хв. після додавання розчину люциферину люмінесценцію вимірювали на мікропланшетному рідері Infinite M200 Тесла. Специфічний лізис клітин-мішеней розраховували за формулою: $\% \text{ специфічний лізис} = [1 - (\text{люмінесценція тестовий зразок} - L_{max1}) / (L_{min} \text{ тестовий зразок} - L_{max2})] \times 100$. контр означає контроль; IVT; *in vitro* транскрибований; мРНК, месенджер РНК.

Фіг. 29. Підтвердження продукції 1BiMAB клітинами ссавців, трансфікованими IVT-мРНК bi-scFv або -репліконом РНК

(А) 5×10^6 клітин ВН 21 тимчасово трансфікували шляхом електропорації 40 мкг/мл IVT-мРНК 1BiMAB або -репліконом РНК. Як імітуючий контроль клітини електропорували без РНК. Через 18 год після трансфекції супернатант і клітини збирали. Клітини лізували й супернатанти піддавали ~ 50 -кратному концентруванню. Неопрацьовані й концентровані супернатанти аналізували за допомогою ELISA з використанням стовпчиків Ni-NTA, анти-chCLDN18.2ab ідіотипічного MAB і вторинного AP-кон'югованого антитіла. Очищений білок 1BiMAB у ряді розведень від 2,3 до 37,5 нг/мл з 2 кроками використовували як стандарт. (В) Концентрований супернатант, клітинні лізати (А) і 0,1 мкг очищеного білка 1BiMAB як позитивний контроль розділяли за допомогою SDS-PAGE. Вестерн-блот аналіз виконували з первинним моноклональним анти-His і вторинним анти-мишачим антитілом, кон'югованим з пероксидазою. (С) 5×10^6 клітин ВНК21 тимчасово трансфікували шляхом електропорації 40 мкг/мл 1BiMAB або IVT-мРНК no.25. Як імітуючий контроль клітини піддавали електропорації без РНК. Через 48 год після трансфекції супернатант збирали й піддавали 40-кратному концентруванню. SN і 0,1 мкг очищеного білка 1BiMAB як позитивний контроль розділяли за допомогою SDS-PAGE. Вестерн-блот аналіз виконували з первинним моноклональним анти-His і вторинним антимишачим антитілом, кон'югованим з пероксидазою. Контр означає контроль; MAB, моноклональне антитіло; SN, супернатант; WB, Вестерн-блотинг.

Фіг. 30. Ін'єкція IVT-мРНК 1BiMAB bi-scFv або -реплікона РНК приводить до *in vivo* продукції

й молекул 1BiMAB bi-scFv, що виявляються у мишей

10 мкг IVT-мРНК 1BiMAB з IVT-мРНК EBK або без нього, або 10 мкг IVT-реплікона 1BiMAB ін'єктували внутрішньом'язово (IM) мишам NSG. Сироватку із крові, зібраної на 2, 4 і 7 дні після ін'єкції, застосовували в аналізі на цитотоксичність *in vitro*. CLDN18.2 і стабільно, які експресують люциферазу NucC4-LVT-CLDN18.2/luc, клітини-мішені спільно інкубували з людськими Т-клітинами в співвідношенні Е:Т, рівному 30:1, з 20 мкл зразка сироватки протягом 48 год. Стандартний контрольний білок 1BiMAB, L_{min} і L_{max} містили 20 мкл сироватки NSG. EBK означає суміш білків вірусу осповакцини Е3, В-І 8R, К3; IM, внутрішньом'язово.

Фіг. 31. Схематична ілюстрація молекул IVT-РНК, що кодують антитіла bi-scFv, що направлено впливають на CLDN6 TAA.

Схема *in vitro* транскрибованих послідовностей РНК, що кодують анти-CLDN6 антитіл bi-scFv. (А) IVT мРНК в 5'- і 3'- положенні щодо варіабельних областей анти-TAA. (В) альфавірусний IVT-реплікон в 3'-положенні щодо варіабельних областей анти-TAA. Области VH і VL анти-CLDN6 створювали на основі послідовності моноклонального антитіла CLDN6 (mCLDN6ab). "Кеп" однаково використовується для ARCA, бета-S-ARCA (DI) або бета-S-ARCA (D2). Области VH і VL анти-CD3 створювали на основі послідовності моноклонального CD3 антитіла TR66. А означає аденін; bi-scFv, біспецифічний одноланцюговий варіабельний фрагмент; hAg, людський альфа-глобін 5'-UTR; hBg, людський бета-глобін 3'-UTR; His, гістидинова мітка, що містить шість залишків гістидину; IVT, *in vitro* транскрибований; LL, довгий лінкер (15-18 амінокислот); nsPI-4, неструктурні білки 1-4; Sec, сигнал секреції; sgP, субгеномний промотор; SL, короткий лінкер (5-6 амінокислот); TAA, пухлиноасоційований антиген; UTR, нетрансльована область; V, варіабельна область важкого (H) і легкого (L) ланцюга антитіла.

Фіг. 32. Спільна інкубація клітин-мішеней, трансфікованих анти-CLDN6 IVT-мРНК bi-scFv, з людськими Т-клітинами приводить до утворення кластерів Т-клітин.

Клітини PA-1, які ендogenно експресують CLDN6, тимчасово трансфікували шляхом електропорації 20 мкг/мл IVT-мРНК 6RHU5 або 6RHU3 і спільно інкубували з людськими Т-клітинами (пан-Т-клітини) у співвідношенні ефектора до мішені 5:1 в 6-лункових планшетах. Як негативний контрольний зразок використовували клітини-мішені PA-1, трансфіковані IVT-мРНК bi-scFv, що направлено впливають на неекспресований TAA (- контр), спільно інкубовані з людськими Т-клітинами (верхній ряд, фото ліворуч). У середньому ряді показані неопрацьовані клітини PA-1 і людські Т-клітини без білка як негативного контролю (контроль, що імітує, фото ліворуч), або з 50 мкг/мл очищених анти-CLDN6 білків 6RHU5 (у середині) або 6RHU3 (праворуч) bi-scFv як позитивні контролю. У нижньому ряді показані неопрацьовані клітини PA-1 (ліворуч) і тільки людські Т-клітини (праворуч). Через 24 год спільної інкубації робили знімки зразків за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse Ti при збільшенні 200х. Білі стрілки вказують на Т-клітинні кластери на клітинах-мішенях. Bi-scFv означає біспецифічний одноланцюговий варіабельний фрагмент; контр, контрольний; hu, людський; IVT, *in vitro* транскрибований; мРНК, месенджер РНК; TL, Т-лімфоцит.

Фіг. 33. Ефект орієнтації доменів на ефективність: трансфекція клітин-мішеней анти-CLDN6 6RHU3 bi-scFv приводить до більш високого процентного вмісту активованих Т-клітин у порівнянні з 6RHU5.

Клітини PA-1, які ендogenно експресують CLDN6, тимчасово трансфікували двома варіантами bi-scFv 6RHU5 і 6RHU3, спрямованими проти CLDN6 і CD3 для порівняння їх активності в аналізі активації Т-клітин. Для кожного варіанта 5×10^6 клітин PA-1 піддавали електропорації 20 мкг/мл IVT-мРНК. Трансфіковані клітини-мішені повторно підраховували, 1×10^5 клітин засівали в кожний 6-лунковий планшет і інкубували з людськими цитотоксичними Т-клітинами (вибрані Т-клітини CD8⁺) у співвідношенні Е:Т, рівному 5:1. Як негативні контролю вибирали неопрацьовані клітини-мішені (hu TL + неопрацьовані PA-1) і клітини-мішені, трансфіковані IVT-мРНК bi-scFv, спрямованим на неекспресований TAA (hu TL + PA-1 - контр). Білок 6RHU5 служив як позитивний контроль в концентрації 50 нг/мл (hu TL + PA-1 білок контр). Крім того, Т-клітини засівали без клітин-мішеней з білком 6RHU5 і без нього як референсну фонову активацію. Кожний зразок засівали у двох повторностях. Аналіз виконували через 24 год і 48 год: Т-клітини збирали й мітили анти-CD3-FITC, анти-CD25-PE, анти-CD69-APC і 7-AAD для фарбування живих і загиблих клітин і аналізували за допомогою проточної цитометрії. TAA-залежну bi-scFv-опосередковану активацію Т-клітин спостерігали в обох варіантах анти-CLDN6 bi-scFv через 24 год (А) і 48 год (В) спільної інкубації. Трансфекція 6RHU3 bi-scFv викликала приблизно на 20 % більш високу активацію Т-клітин в обидва моменти часу. Bi-scFv означає біспецифічний одноланцюговий варіабельний фрагмент; Контр, контрольний; hu, людський; IVT, *in vitro* транскрибований; мРНК, месенджер РНК; TL, Т-лімфоцит.

Фіг. 34. Секреція 6RHU3 опосередковує Т-клітинну активацію залежним від концентрації чином.

Клітини PA-1, які ендogenно експресують CLDN6, тимчасово трансфікували шляхом електропорації IVT-мРНК у загальній кількості 20 мкг/мл, що включає 0,2-20 мкг/мл IVT-мРНК 6RHU3 плюс відповідні кількості IVT-мРНК bi-scFv, що направлено впливає на неекспресований ТАА. Трансфекція 20 мкг/мл IVT-мРНК bi-scFv, що направлено впливає на неекспресований ТАА (0.0 мкг/мл IVT-мРНК 6RHU3), служила як контроль специфічності. Трансфіковані клітини-мішені спільно інкубували з людськими цитотоксичними Т-клітинами (пан-Т-клітинами) у співвідношенні ефектора до мішені 5:1 в 6-лункових планшетах у двох повторностях. Як референсну активацію Т-клітин тільки людські Т-клітини вирощували без білка 6RHU5 (hu TL -) або з білком 6RHU5 (hu TL білковий контр). Як негативний контроль Т-клітини спільно інкубували з неопрацьованими клітинами-мішенями PA-1 (hu TL + PA-1 - Контр). Білок 6RHU5 служив як позитивний контроль в концентрації 50 нг/мл (hu TL + PA-1 білковий контр). Через 48 год Т-клітини збирали й мітили анти-CD3-FITC, анти-CD25-PE і анти-CD69-APC і аналізували за допомогою проточної цитометрії. На графіках показаний процентний вміст позитивно пофарбованих людських Т-клітин, визначених за допомогою програмного забезпечення Flowjo. Bi-scFv означає біспецифічний одноланцюговий варіабельний фрагмент; контр, контрольний; hu, людський; IVT, in vitro транскрибований; мРНК, месенджер РНК; TL, Т-лімфоцит.

Фіг. 35. Величина EC50 6RHU3 для специфічного лізису клітин-мішеней через 48 год склала приблизно 200 нг/мл.

Клітини PA-1, які ендogenно експресують CLDN6, які стабільно експресують люциферазу, тимчасово трансфікували шляхом електропорації IVT-мРНК bi-scFv у загальній концентрації 13,3 мкг/мл, що включає 0,004-13,3 мкг/мл 6RHU3 і відповідну кількість IVT-мРНК bi-scFv, що направлено впливає на неекспресований ТАА. Трансфіковані клітини-мішені засівали з людськими Т-клітинами в співвідношенні ефектора до мішені 5:1 у трьох повторностях в 96-лунковому форматі. Як контроль мінімального лізису (L_{min}) кожний індивідуальний зразок трансфікованих клітин-мішеней засівали без ефекторних клітин. Максимальний лізис (L_{max}) для нормалізації стосовно числа імпульсів спонтанної люмінесценції був досягнутий шляхом додавання Triton X-100 у контрольні лунки, що містять ефекторні клітини й неопрацьовані клітини-мішені, безпосередньо перед додаванням люциферину. Через 30 хв після додавання розчину люциферину люмінесценцію вимірювали на мікропланшетному рідері Infinite M200 Тесла через 24 год і 48 год. Специфічний лізис клітин-мішеней розраховували за формулою: % специфічного лізису = $[1 - (L_{min_тестованого\ зразка} - L_{max}) / (L_{min_тестованого\ зразка} - L_{max})] \times 100$. Значення наносили на графік залежно від $\log_{10}$ концентрації 6RHU3. Величини EC50 означають половину максимальної ефективної концентрації; L, лізис.

Фіг. 36. Т-клітинна проліферація специфічно індукована у відповідь на секрецію 6RHU3 клітинами-мішенями в присутності CLDN6.

Людські Т-клітини фарбували CFSE для аналізу. Т-клітини вирощували без клітин-мішеней (Т-клітини) у комбінації з 5 мкг/мл ОКТ3 і 2 мкг/мл α CD28 як позитивний контроль активації (+контр), з 5 нг/мл нетаргетного контрольного bi-scFv (-контр білок) або з 5 нг/мл білка 6RHU3 (білок 6RHU3). Т-клітини й клітини-мішені PA-1, які ендogenно експресують CLDN6, разом інкубували (Т-клітини + CLDN 6-позитивні клітини-мішені) без будь-чого (імітуючі) або з 5 нг/мл білка 6RHU3 (білок 6RHU3). Для тестування IVT-мРНК клітини PA-1 трансфікували 20 мкг/мл IVT-мРНК 6RHU3 (мРНК 6RHU3) або IVT-мРНК bi-scFv, що направлено впливають на неекспресований ТАА (мРНК -контр), і інкубували з Т-клітинами. Крім того, клітини PA-1, трансфіковані IVT-мРНК bi-scFv, що направлено впливають на неекспресований ТАА, поєднували з 5 нг/мл білка 6RHU3 (мРНК -контр + білок 6RHU3). Як додатковий контроль специфічності були включені зразки з лінією клітин-мішеней MDA-MB-231, яка не експресує CLDN6, разом з Т-клітинами (Т-клітини + CLDN 6-негативні клітини-мішені). MDA-MB-231 використовували неопрацьованими й інкубували без будь-чого (що імітує контроль), з 5 нг/мл контрольного білка bi-scFv (-контр білок) або 5 нг/мл білка 6RHU3 (білок 6RHU3), або MDA-MB-231 трансфікували 20 мкг/мл IVT-мРНК 6RHU3 (мРНК 6RHU3) або IVT-мРНК bi-scFv, що направлено впливають на неекспресований ТАА (-контр мРНК). Аналіз виконували в співвідношенні ефектора до мішені 5:1 в 96-лунковому планшеті, з кожним зразком у трьох повторностях і часом інкубації 72 год. Зменшення сигналу CFSE, що вказує на Т-клітинну проліферацію, аналізували за допомогою проточної цитометрії, розраховували за допомогою програмного забезпечення Flowjo і наносили на графік у вигляді % проліферуючих Т-клітин. CFSE означає складний ефір сукцинімідилу й карбоксифлуоресцеїну; IVT, in vitro транскрибований; мРНК, месенджер РНК.

Фіг. 37. Підтвердження 6RHU3 трансляції клітинами ссавців, трансфікованими IVT-мРНК bi-

scFv або - репліконом РНК.

(А) 5×10^6 клітин ВНК21 тимчасово трансфікували шляхом електропорації 40 мкг/мл IVT-мРНК 6RHU3 або -реплікона РНК. Трансфекція 40 мкг/мл IVT-мРНК по.25 була включена як додатковий зразок. Як імітуючий контроль клітини піддавали електропорації без РНК. Через 18 год після трансфекції супернатант і клітини збирали. Клітини лізували й супернатанти піддавали 50-кратному концентруванню. Неопрацьовані й концентровані супернатанти аналізували за допомогою ELISA з використанням стовпчиків Ni-NTA, анти-mCLDN6ab ідіотипічного MAB і вторинного AP-кон'югованого антитіла. Очищений білок 6RHU3 у розведенні від 2,3 до 150 нг/мл за 2 кроки використовували як стандарт. (В) Концентрований супернатант і клітинні лізати (А) і 0,1 мкг очищеного білка 6RHU3 як позитивний контроль розділяли за допомогою SDS-PAGE. Вестерн-блот аналіз виконували з первинним моноклональним анти-His і вторинним антимишачим антитілом, кон'югованим з пероксидазою. (С) 5×10^6 клітин ВНК21 тимчасово трансфікували шляхом електропорації 40 мкг/мл 6RHU3 або IVT-мРНК по.25. Як імітуючий контроль клітини піддавали електропорації без РНК. Через 48 год після трансфекції супернатант збирали й піддавали 40-кратному концентруванню. SN і 0,1 мкг очищеного білка 6RHU3 як позитивний контроль розділяли за допомогою SDS-PAGE. Вестерн-блот аналіз виконували з первинним моноклональним анти-His і вторинним антимишачим антитілом, кон'югованим з пероксидазою. Контр означає контрольні; MAB, моноклональне антитіло; SN, супернатант; WB, Вестерн-блотинг.

Фіг. 38. Ін'єкція IVT-мРНК 6RHU3 bi-scFv або - реплікона РНК приводить до *in vivo* трансляції й молекул bi-scFv, що детектуються у мишей.

10 мкг IVT-мРНК 6RHU3 з IVT-мРНК EBK або без нього або 10 мкг IVT-реплікона 6RHU3 ін'єктували ІМ мишам NSG. Сироватку крові, зібраної через 7 днів після ін'єкції, застосовували в аналізі на цитотоксичність *in vitro*. Клітини-мішені PA-I/luc, які ендogenно експресують CLDN6 і які стабільно експресують люциферазу, спільно інкубували з людськими Т-клітинами в співвідношенні Е:Т, рівному 30:1, з 20 мкл зразка сироватки протягом 48 год. Стандартний контрольний білок 6RHU3, L_{min} і L_{max} , який містить 20 мкл імітуючої сироватки NSG. EBK означає суміш білків вірусу осповакцини Е3, В-18R, К3; ІМ, внутрішньом'язово.

Фіг. 39. Результати аналізу на цитотоксичність анти-CLDN18.2 білків bi-scFv, що містять анти-CD3 з'єднувальний домен scFv у С-кінцевій частині білка.

Варіанти bi-scFv, спрямовані проти CLDN18.2 і CD3, тимчасово експресували в клітинах CHO і очищали полімером Protein-L для порівняння їх сили в аналізі на цитотоксичність. Клітини NugC4, які ендogenно експресують CLDN18.2, які стабільно експресують люциферазу, були використані як клітини-мішені. Людські Т-клітини й клітини-мішені інкубували в співвідношенні Е:Т, рівному 5:1, з 5000, 1000, 200 і 40 нг/мл кожного з білків bi-scFv в 96-лунковому форматі. Кожний тестований зразок висівали в трикратному повторенні, контрольний зразок для L_{min} висівали в трикратному повторенні. Тривалість спільної інкубації перед аналізом склала 24 год і 48 год. Після додавання розчину люциферину в задані моменти часу люмінесценцію вимірювали на рідері Infinite M200 TECAN. Специфічний лізис клітин-мішеней розраховували для кожної концентрації й записували.

a. Варіабельні домени анти-CD3 розташовані в порядку доменів VH - VL і розділені пептидним лінкером LL4.

b. Варіабельні домени анти-CD3 розташовані в порядку доменів VH – VL і розділені пептидним лінкером LL4. Анти-CD3 scFv містить сполучний дисульфідний місток між доменами VH і VL.

c. Варіабельні домени анти-CD3 розташовані в порядку VL - VH і розділені пептидним лінкером LL5.

d. Варіабельні домени анти-CD3 розташовані в порядку VL - VH і розділені пептидним лінкером LL5. Анти-CD3 scFv містить сполучний дисульфідний місток між доменами VL і VH.

Фіг. 40. Внутрішньоаналітичне порівняння величин EC50, отриманих в аналізі на цитотоксичність на основі люциферази з використанням анти-CLDN6 білків bi-scFv.

Аналізи на цитотоксичність на основі люциферази виконували за допомогою трьох різних донорів для Т-клітинного препарату. Величини EC50, розраховані з використанням 6 тестованих анти-CLDN6 білків bi-scFv через 24 год і 48 год інкубації представлені для кожного незалежного аналізу (А, В і С). Клітини PA-1, які ендogenно експресують CLDN6, інкубували протягом 24 год і 48 год з наростаючими концентраціями (0,025-50000 нг/мл для А і В, 0,0025-5000 нг/мл для С) анти-CLDN6 білків bi-scFv і людськими Т-клітинами в співвідношенні ефектора й мішені 5:1 у трьох повторностях в 96-лунковому форматі. Як контроль мінімального лізису (L_{min}) ефекторні клітини й клітини-мішені висівали без білків bi-scFv. Максимальний лізис (L_{max}) для нормалізації відносно числа імпульсів спонтанної люмінесценції досягався шляхом додавання Triton X-100 у

контрольні лунки, що містять ефекторні клітини й клітини-мішені під час відсутності bi-scFv безпосередньо перед додаванням люциферину. Через 30 хв. після додавання розчину люциферину люмінесценцію вимірювали на мікропланшетному рідері Infinite M200 Tecan через 24 год і 48 год інкубації клітин-мішеней і ефекторних клітин. Специфічний лізис клітин-мішеней розраховували за формулою: % специфічний лізис = $[1 - (\text{люмінесценція тестований зразок} - L_{\max}) / (L_{\min} - L_{\max})] \times 100$. EC50 означає половину максимальної ефективної концентрації; L, лізис; NA, немає даних.

Докладний опис винаходу

Хоча даний винахід описаний докладно далі, слід розуміти, що даний винахід не обмежується конкретними методиками, протоколами й реагентами, описаними тут, тому що зазначені методики, протоколи й реагенти можуть змінюватися. Також, слід розуміти, що термінологія, використовувана тут, призначена тільки для опису конкретних варіантів здійснення й не призначена для обмеження обсягу даного винаходу, який може бути обмежений тільки прикладеними пунктами формули винаходу. Якщо не зазначене інше, усі технічні й наукові терміни, використовувані тут, мають такі ж значення, як звичайно розуміється фахівцями в даній області.

Далі будуть описані елементи даного винаходу. Ці елементи перераховані разом з певними варіантами здійснення, однак, слід розуміти, що вони можуть бути об'єднані будь-яким способом і в будь-якій кількості для створення додаткових варіантів здійснення. Різні описані приклади й кращі варіанти здійснення не повинні розглядатися як обмежуючі обсяг даного винаходу тільки конкретно описаними варіантами здійснення. Слід розуміти, що даний опис служить підтримкою й охоплює варіанти здійснення, які поєднують чітко описані варіанти здійснення з будь-яким числом розкритих і/або кращих елементів. Крім того, будь-які перестановки й комбінації всіх описаних елементів у даній заявці будуть уважатися розкритими за допомогою опису за даною заявкою, якщо контекст не вказує на інше.

Переважно, терміни, використовувані тут, визначені, як описано в «A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)», H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, i H. Kolbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995).

Якщо не зазначене інше, здійснення даного винаходу буде передбачати використання стандартних методів хімії, біохімії, клітинної біології, імунології й методів рекомбінантних ДНК, описаних у літературі в даній області (дивися, наприклад, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

У всьому даному описі й прикладеній формулі винаходу, якщо контекст не вимагає іншого, слово «містити» і його варіації, такі як «містить» і «містять», будуть розумітися як включення зазначеного елемента, цілого числа або стадії, або груп елементів, цілих чисел або стадій, але не як виключення будь-якого іншого елемента, цілого числа або стадії, або груп елементів, цілих чисел або стадій, хоча в деяких варіантах здійснення такий інший елемент, ціле число або стадія, або групи елементів, цілих чисел або стадій можуть бути виключені, тобто об'єкт винаходу полягає у включенні зазначеного елемента, цілого числа або стадії, або груп елементів, цілих чисел або стадій. Використання однини в контексті опису винаходу (особливо в контексті прикладеної формули винаходу) повинне витлумачуватися так, щоб охоплювати і однину й множину, якщо інше не зазначене в даному документі або явно суперечить контексту. Перерахування діапазонів значень у даному документі призначене тільки для того, щоб воно служило способом скорочення для зазначення кожного окремого значення, що попадає в діапазон. Якщо не зазначене інше, кожне окреме значення включається в технічний опис так, ніби воно було окремо перераховане в даному документі. Усі способи, описані в даному документі, можуть бути виконані в будь-якому належному порядку, якщо інше не зазначене в даному документі або явно спростовується контекстом. Використання будь-якого або всіх прикладів, або мова зразків (наприклад, «такий як»), представлена у даному документі, призначена тільки для кращого роз'яснення винаходу, і не накладає ніяких обмежень на область застосування винаходу, якщо не заявлене інше. Ніяка мова в даному описі не повинна витлумачуватися, як така, що вказує який-небудь незаявлений у формулі винаходу елемент як найважливіший для здійснення винаходу.

У даному описі цитуються деякі документи. Кожний з документів, процитованих тут (включаючи всі патенти, патентні заявки, наукові публікації, специфікації виробника, інструкції і т.д.), вище або нижче, уведені тут посиланнями у всій повноті. Ніщо тут не повинне бути витлумачене як визнання того, що винахідник не має права датувати винахід більш раннім числом, внаслідок більш ранньої дати створення винаходу (antedate).

Клаудини являють собою сімейство білків, які є найбільш важливими компонентами щільних

контактів, де вони встановлюють параклітинний бар'єр, який контролює потоки молекул у міжклітинному просторі між клітинами епітелію. Клаудини являють собою трансмембранні білки, що чотирикратно перетинають клітинну мембрану, при цьому обидва кінці, N-кінець і C-кінець, розташовані в цитоплазмі. Перша позаклітинна петля, названа EC1 або ECL1, складається в середньому з 53 амінокислот, і друга позаклітинна петля, названа EC2 або ECL2, складається приблизно з 24 амінокислот. Білки клітинної поверхні сімейства клаудина, такі як CLDN6 і CLDN18.2, експресуються в пухлинах різного походження, і є особливо придатними як структури-мішені в опосередкованій антитілами імунотерапії раку завдяки їхній селективній експресії (експресія відсутня в нормальних тканинах, значимих з погляду токсичності) і локалізації в плазматичній мембрані.

У контексті даного винаходу кращі клаудини являють собою CLDN6 і CLDN18.2. CLDN6 і CLDN18.2 були ідентифіковані як такі, що диференційно експресуються в пухлинних тканинах, при цьому єдиними нормальними тканинами, експресуючими CLDN18.2, є шлунок, і єдиною нормальною тканиною, яка експресує CLDN6, є плацента.

CLDN18.2 селективно експресується в нормальних тканинах у диференційованих клітинах епітелію слизової оболонки шлунка. CLDN18.2 експресується в раку різного походження, такому як карцинома підшлункової залози, карцинома стравоходу, карцинома шлунка, бронхіальна карцинома, карцинома молочної залози й пухлини ЛОР-органів. CLDN18.2 є цінною мішенню для попередження й/або лікування первинних пухлин, таких як рак шлунка, рак стравоходу, рак підшлункової залози, рак легені, такий як недрібноклітинний рак легені (NSCLC), рак яєчника, рак товстої кишки, рак печінки, рак голови й шиї, і рак жовчного міхура, і їх метастазів, зокрема, метастазів раку шлунка, таких як пухлини Крукенберга, перитонеальних метастазів і метастазів у лімфовузлах.

Було виявлено, що CLDN6 експресується, наприклад, у раку яєчника, раку легені, раку шлунка, раку молочної залози, раку печінки, раку підшлункової залози, раку шкіри, меланомі, раку голови й шиї, саркомі, раку жовчних проток, нирково-клітинному раку й раку сечового міхура. CLDN6 є особливо кращою мішенню для попередження й/або лікування раку яєчника, зокрема аденокарциноми яєчника й тератокарциноми яєчника; раку легені, включаючи дрібноклітинний рак легені (SCLC) і недрібноклітинний рак легені (NSCLC), зокрема плоскоклітинний рак легені й аденокарциному; раку шлунка; раку молочної залози; раку печінки; раку підшлункової залози; раку шкіри, зокрема базальноклітинної карциноми й плоскоклітинної карциноми; злоякісної меланоми; раку голови й шиї, зокрема злоякісної плеоморфної аденоми; саркоми, зокрема синовіальної саркоми й карциносаркоми; раку жовчної протоки; раку сечового міхура, зокрема перехідно-клітинної карциноми й папілярного раку; раку нирки, зокрема плоскоклітинного рака, включаючи світлоклітинний рак нирки й папілярну карциному нирки; раку товстої кишки; раку тонкої кишки, включаючи рак клубової кишки, зокрема аденокарциноми тонкої кишки й аденокарциноми клубової кишки; ембріональної карциноми яєчка; плацентарної хоріокарциноми; раку шийки матки; раку яєчка, зокрема семіноми яєчка, тератоми яєчка й ембріонального раку яєчка; раку матки; герміноми, такої як тератокарцинома або ембріональна карцинома, зокрема ембріонально-клітинної пухлини яєчка і їх метастатичних форм. В одному варіанті здійснення раку захворювання, асоційовані з експресією CLDN6, вибрані із групи, яка складається з раку яєчників, раку легені, метастатичного раку яєчників і метастатичного раку легені. Переважно, рак яєчника є карциномою або аденокарциномою. Переважно, раком легені є карцинома або аденокарцинома, і переважно є бронхіолярний рак, такий як бронхіолярна карцинома або бронхіолярна аденокарцинома.

Термін «CLDN», використовуваний тут, означає клаудин і включає CLDN18.2 і CLDN6. Переважно, клаудин є клаудином людини.

Термін «CLDN18» належить до клаудина 18 і включає будь-які варіанти, включаючи сплайсований варіант 1 клаудина 18 (клаудин 18.1 (CLDN18.1)) і сплайсований варіант 2 клаудина 18 (клаудин 18.2 (CLDN 18.2)).

Термін «CLDN18.2» переважно належить до CLDN18.2 людини й, зокрема, до білка, що складається з амінокислотної послідовності згідно з SEQ ID NO: 1 переліку послідовностей або варіанта зазначеної амінокислотної послідовності. Перша позаклітинна петля CLDN18.2 переважно містить амінокислоти з 27 по 81, більш переважно амінокислоти з 29 по 78 амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 1. Друга позаклітинна петля CLDN18.2 переважно містить амінокислоти з 140 по 180 амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 1. Зазначені перша й друга позаклітинні петлі переважно утворюють позаклітинну частину CLDN18.2.

Термін «CLDN6» переважно належить до CLDN6 людини й, зокрема, до білка, що, переважно, складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 3

переліку послідовностей або варіанта зазначеної амінокислотної послідовності. Перша позаклітинна петля CLDN6 переважно містить амінокислоти з 28 по 80, більш переважно, амінокислоти з 28 по 76 амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 2, або амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 3. Друга позаклітинна петля CLDN6

5 переважно містить амінокислоти з 138 по 160, переважно, амінокислоти з 141 по 159, більш переважно, амінокислоти з 145 по 157 амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 2, або амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO: 3. Зазначені перша й друга позаклітинні петлі, переважно, утворюють позаклітинну частину CLDN6.

Термін «варіант» відповідно до винаходу належить, зокрема, до мутантів, сплайсованих варіантів, конформацій, ізоформ, алельних варіантів, варіантів різновидів і гомологів різновидів, зокрема таких, які присутні природним шляхом. Алельний варіант належить до альтерації нормальної послідовності гена, значення якої часто буває неясним. Повне секвенування гена часто дозволяє ідентифікувати численні алельні варіанти заданого гена. Гомологом різновидів є нуклеїнова кислота або амінокислотна послідовність із різновидами, що мають походження, яке відрізняється від походження заданої нуклеїнової кислоти або амінокислотної послідовності.

15 Термін «варіант» охоплює будь-які посттрансляційно модифіковані варіанти й конформаційні варіанти.

Другою молекулою-мішенню для з'єднувальних агентів, описаних тут, є кластер клітинного диференціювання CD3 (Cluster of Differentiation 3). Комплекс CD3 позначає антиген, який експресується на зрілих людських Т-клітинах, тимоцитах і субпопуляції природних клітин-кілерів, як частина мультимолекулярного комплексу Т-клітинного рецептора (TCR). Т-клітинний корецептор є білковим комплексом і складається із чотирьох різних ланцюгів. У ссавців комплекс містить ланцюг CD3 γ , ланцюг CD3 δ і два ланцюги CD3 ϵ . Ці ланцюги пов'язані з молекулою, відомою як Т-клітинний рецептор (TCR) і ζ -ланцюгом для генерації сигналу активації в Т-лімфоцитах. Разом, TCR, ζ -ланцюг і молекули CD3 утворюють TCR комплекс.

25

Амінокислотна послідовність CD 3-епсилон людини описана в Genbank під реєстраційним номером NM_000733 і містить SEQ ID NO: 4. Амінокислотна послідовність CD 3-гамма людини описана в Genbank під реєстраційним номером NM 000073. Амінокислотна послідовність CD 3-дельта людини описана в Genbank під реєстраційним номером NM_000732. CD3 відповідає за трансдукцію сигналу TCR. Як описано в Lin і Weiss, Journal of Cell Science 114, 243-244 (2001), активація TCR комплексу шляхом зв'язування МНС-презентованих специфічних епітопів антигенів приводить до фосфорилування імунорецепторних тирозинових мотивів, що активують (ITAM) кіназами Src-сімейства, запускаючи рекрутинг інших кіназ, що приводить до Т-клітинної активації, включаючи вивільнення Ca²⁺. Утворення кластерів CD3 на Т-клітинах, наприклад шляхом іммобілізації анти-CD 3-антитіл, приводить до Т-клітинної активації, аналогічній активації Т-клітинного рецептора, але яка не залежить від типової для цього клону специфічності.

30

Використовуваний тут термін «CD3» включає CD3 людини й позначає антиген, який експресується на людських Т-клітинах як частина мультимолекулярного комплексу Т-клітинного рецептора.

40

Відносно CD3 зв'язуючий агент за винаходом переважно розпізнає епсилон-ланцюг CD3, зокрема, він розпізнає епітоп, який відповідає першим 27 N-кінцевим амінокислотам CD3-епсилон або функціональним фрагментам цього подовження з 27 амінокислот.

Відповідно до винаходу, термін «клаудин-позитивний рак», або аналогічні терміни, означає рак, у який залучені ракові клітини, які експресують клаудин, переважно на поверхні зазначених ракових клітин.

45

«Клітинна поверхня» використовується відповідно до її звичайного значення в даній області й, таким чином, включає зовнішню частину клітини, яка є доступною для зв'язування білками й іншими молекулами.

50

Клаудин експресується на клітинній поверхні, якщо він розташований на поверхні зазначених клітин і є доступним для зв'язування клаудин-специфічними антитілами, доданими в клітини.

Термін «позаклітинна частина» у контексті даного винаходу належить до частини молекули, такої як білок, яка звернена до позаклітинного простору клітини й, переважно, є доступною зовні зазначеної клітини, наприклад, для антигензв'язуючих молекул, таких як антитіла, локалізовані зовні клітини. Переважно, термін належить до однієї або більше позаклітинних петель або доменів, або їх фрагментів.

55

Термін «частина» або «фрагмент» використовуються тут взаємозамінно й належать до безперервного елемента. Наприклад, частина структури, такої як амінокислотна послідовність або білок, належить до безперервного елемента зазначеної структури. Ділянка, частина або

60

фрагмент структури, переважно, має одну або декілька функціональних властивостей зазначеної структури. Наприклад, ділянка, частина або фрагмент епітопу або пептиду є, переважно, імунологічно еквівалентною епітопу або пептиду, з якого вона походить. Частина або фрагмент білкової послідовності, переважно, містить послідовність, що складається

5 щонайменше з 6, зокрема щонайменше з 8, щонайменше з 12, щонайменше з 15, щонайменше з 20, щонайменше з 30, щонайменше з 50 або щонайменше з 100 послідовних амінокислот білкової послідовності.

Відповідно до винаходу CLDN18.2 значно не експресується в клітині, якщо рівень експресії нижче в порівнянні з експресією в клітинах шлунка або тканини шлунка. Переважно, рівень експресії становить менш 10 %, переважно менше 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % або 0,05%, або навіть нижче, від експресії в клітинах шлунка або тканини шлунка. Переважно, CLDN18.2 в основному не експресується в клітині, якщо рівень експресії перевищує рівень експресії в нераковій тканині, відмінної від шлунка, не більш ніж в 2 рази, переважно в 1,5 рази й, переважно, не перевищує рівень експресії в зазначеній нераковій тканині. Переважно,

10 CLDN18.2 в основному не експресується в клітині, якщо рівень експресії нижче межі виявлення й/або якщо рівень експресії є занадто низьким для того, щоб забезпечити зв'язування CLDN18.2-специфічними антитілами, доданими в клітині.

Відповідно до винаходу, CLDN18.2 експресується в клітині, якщо рівень експресії перевищує рівень експресії в нераковій тканині, відмінної від шлунка, переважно, більш ніж в 2 рази, переважно в 10 разів, 100 разів, 1000 разів. Переважно, CLDN18.2 експресується в клітині, якщо рівень експресії вище межі виявлення й/або якщо рівень експресії є досить високим для забезпечення зв'язування CLDN18.2-специфічними антитілами, доданим у клітині. Переважно, CLDN18.2, який експресується в клітині, експресується або експонується на поверхні зазначеної клітини.

20

Відповідно до винаходу, CLDN6 в основному не експресується в клітині, якщо рівень експресії нижче в порівнянні з експресією в клітинах плаценти або тканини плаценти. Переважно, рівень експресії становить менше 10 %, переважно менше 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % або 0,05 %, або навіть нижче, від експресії в клітинах плаценти або тканини плаценти. Переважно, CLDN6 в основному не експресується в клітині, якщо рівень експресії перевищує рівень експресії в нераковій тканині, відмінної від плаценти, не більш ніж в 2 рази, переважно в 1,5 рази, і переважно, не перевищує рівень експресії в зазначеній нераковій тканині. Переважно, CLDN6 в основному не експресується в клітині, якщо рівень експресії нижче межі виявлення й/або рівень експресії є занадто низьким для забезпечення зв'язування CLDN 6-специфічними антитілами, доданими в клітині.

25

Відповідно до винаходу CLDN6 експресується в клітині, якщо рівень експресії перевищує рівень експресії в нераковій тканині, відмінної від плаценти, переважно, більш ніж 2 рази, переважно в 10 разів, 100 разів, 1000 разів або 10000 разів. Переважно, CLDN6 експресується в клітині, якщо рівень експресії вище межі виявлення й/або якщо рівень експресії є досить високим для забезпечення зв'язування CLDN 6-специфічними антитілами, доданими в клітині. Переважно, CLDN6, який експресується в клітині, експресується або експонується на поверхні зазначеної клітини.

30

Відповідно до винаходу термін «захворювання» належить до будь-якого патологічного стану, включаючи рак, зокрема, таких форм раку, які описані в даному документі. Будь-яке посилання в даному документі на рак або конкретні форми раку також включає метастази зазначеного раку. У кращому варіанті здійснення захворювання, що підлягає лікуванню відповідно до даного винаходу, включає клітини, які експресують клаудин (CLDN), такі як CLDN18.2 і/або CLDN6.

35

«Захворювання, асоційоване із клітинами, експресуючими CLDN» або подібні експресії означає відповідно до винаходу, що CLDN експресується в клітинах хворої тканини або органа. В одному варіанті здійснення експресія CLDN у клітинах хворої тканини або органа є збільшеною в порівнянні зі станом у здоровій тканині або органі. Збільшення належить до збільшення щонайменше на 10 %, зокрема щонайменше на 20 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 100 %, щонайменше на 200 %, щонайменше на 500 %, щонайменше на 1000 %, щонайменше на 10000 %, або навіть більше. В одному варіанті здійснення експресія виявляється тільки у хворій тканині, тоді як експресія в здоровій тканині є подавленою. Відповідно до винаходу, захворювання, асоційовані із клітинами, експресуючими CLDN, включають ракові захворювання. Крім того, відповідно до винаходу ракові захворювання переважно являють собою такі захворювання, у яких ракові клітини експресують CLDN.

40

Використовуваний тут термін «ракове захворювання» або «рак» включає захворювання, яке характеризується аберантно регульованим клітинним ростом, проліферацією, диференціацією,

45

адгезією й/або міграцією. Під терміном «ракова клітина» розуміється аномальна клітина, яка росте шляхом швидкої неконтрольованої клітинної проліферації й продовжує рости після стимулу, який ініціював нову зупинку росту. Переважно, «ракове захворювання» характеризується клітинами, експресуючими CLDN, і раковими клітинами, експресуючими CLDN. Клітина, експресуюча CLDN, переважно є раковою клітиною, переважно типів раку, описаних тут.

Термін «рак» відповідно до винаходу включає лейкоз, семіному, меланому, тератому, лімфому, нейробластому, гліому, рак прямої кишки, рак ендометрію, рак нирки, рак надниркової залози, рак щитовидної залози, рак крові, рак шкіри, рак головного мозку, рак шийки матки, рак шлунково-кишкового тракту, рак печінки, рак товстої кишки, рак шлунка, рак кишечника, рак голови й шиї, рак ШКТ, рак лімфовузлів, рак стравоходу, колоректальний рак, рак підшлункової залози, рак вух, носа й гортані (ENT), рак молочної залози, рак передміхурової залози, рак матки, рак яєчника й рак легені, і їхні метастази. Прикладами зазначеного раку є карцинома легені, карцинома молочної залози, карцинома передміхурової залози, карцинома товстої кишки, нирково-клітинна карцинома, карцинома шийки матки або метастази раку або пухлин, описаних вище. Термін рак відповідно до винаходу також включає метастази раку.

Відповідно до винаходу «карцинома» є злоякісною пухлиною, що складається з епітеліальних клітин. Ця група представляє найпоширеніші види раку, включаючи розповсюджені форми раку молочної залози, передміхурової залози, легені й товстої кишки.

«Аденокарцинома» є раком, який походить із залозистої тканини. Ця тканина є також частиною більшої категорії тканини, відомої як епітеліальна тканина. Епітеліальна тканина включає шкіру, залози й цілий ряд інших тканин, які вистилають порожнини й органи організму. Епітеліальна тканина походить із зародкових листків, ектодерми, ендодерми й мезодерми. Для класифікації раку як аденокарциноми клітини необов'язково повинні бути частиною залози, оскільки вони мають секреторні властивості. Ця форма карциноми може виникати в деяких вищих ссавців, включаючи людину. Добре диференційовані аденокарциноми мають подібність із залозистою тканиною, з якої вони походять, тоді як помірно диференційовані аденокарциноми такої властивості не мають. Шляхом фарбування клітин, отриманих з біопсії, патолог визначає, чи представляє пухлина аденокарциному або який-небудь інший тип раку. Аденокарцинома може виникати в багатьох тканинах організму за рахунок убіквітарної природи залоз в організмі. Незважаючи на те, що кожна залоза може не секретувати однакову речовину, оскільки існує екзокринна функція клітини, рак вважається залозистим і його злоякісна форма, таким чином, названа аденокарциномою. Злоякісна аденокарцинома інвазує інші тканини й часто поширює метастази, за умови що їй дали достатню кількість часу. Аденокарцинома яєчника є найпоширенішим типом карциноми яєчника. Вона включає серозні й муцинозні аденокарциноми, світло-клітинну аденокарциному й ендометриюїдну аденокарциному.

Термін «метастазування» означає поширення ракових клітин з їхньої ділянки походження в іншу частину організму. Формування метастазів є дуже складним процесом і залежить від відкріплення злоякісних клітин від первинної пухлини, інвазії позаклітинного матрикса, проникнення крізь базальні мембрани ендотелію для входження в порожнину організму й судини, і потім, після перенесення кров'ю, інфільтрації цільових органів. На закінчення, ріст нової пухлини в цільовій ділянці залежить від ангиогенезу. Метастазування пухлини часто виникає навіть після видалення первинної пухлини, тому що пухлинні клітини або компоненти можуть залишатися й розбудовувати метастатичний потенціал. В одному варіанті здійснення термін «метастазування» відповідно до винаходу належить до «віддалених метастазів», які належать до метастазів, віддалених від первинної пухлини й регіональної системи лімфатичних вузлів. В одному варіанті здійснення термін «метастази» відповідно до винаходу належить до метастазів у лімфатичні вузли. Однією конкретною формою метастазів, яка піддається лікуванню з використанням терапії за винаходом, є метастази, що походять з раку шлунка як первинної ділянки. У кращому варіанті здійснення такі метастази раку шлунка являють собою пухлину Крукенберга, перитонеальні метастази й/або метастази в лімфатичні вузли.

Пухлина Крукенберга є метастатичною пухлиною яєчника, що рідко зустрічається, на яку доводиться від 1 до 2 % від усіх пухлин яєчника. Прогноз при пухлині Крукенберга дотепер є дуже поганим і не існує затвердженого лікування пухлин Крукенберга. Пухлина Крукенберга є метастатичною перстневидноклітинною аденокарциномою яєчника. Шлунок є первинною ділянкою для більшості випадків пухлини Крукенберга (70 %). Карциноми товстої кишки, апендициту й молочної залози (в основному інвазивна лобулярна карцинома) є наступними найпоширенішими первинними ділянками. Повідомлялося про рідкі випадки пухлини Крукенберга, що походить з карциноми жовчного міхура, жовчної протоки, підшлункової залози, тонкого кишечника, фатерова соска, шийки матки й сечового міхура/сечової протоки.

Термін «лікувати» означає введення сполуки або композиції, або комбінації сполук або композицій суб'єктові для попередження або усунення захворювання, включаючи зменшення розміру пухлини або кількості пухлин у суб'єкта; купірування або вповільнення розвитку захворювання в суб'єкта; інгібування або вповільнення розвитку нового захворювання в суб'єкта; зменшення частоти або тяжкості симптомів і/або повторного виникнення в суб'єкта, який на теперішній момент має або який раніше мав захворювання, і/або продовження, тобто збільшення тривалості життя суб'єкта.

Зокрема, термін «лікування захворювання» включає лікування, скорочення тривалості, ослаблення, попередження, уповільнення або інгібування прогресування або погіршення, або попередження або затримку початку виникнення захворювання або його симптомів.

У контексті даного винаходу терміни, такі як «захистити», «попереджати», «превентивні» або «захисні» належать до попередження або лікування, або й того й іншого, виникнення й/або поширення захворювання в суб'єкта й, зокрема, відомості до мінімуму ймовірності того, що в суб'єкта буде розвиватися захворювання, або затримки розвитку захворювання. Наприклад, особа, що має ризик розвитку раку, буде кандидатом на лікування або попередження раку.

«Що має ризик» означає суб'єкта, який ідентифікований, як такий, що має більш високу, ніж нормальна, ймовірність розвитку захворювання, зокрема раку, у порівнянні із загальною популяцією. Крім того, суб'єкт, який мав або який на теперішній момент має захворювання, зокрема рак, є суб'єктом, який має підвищений ризик розвитку захворювання, наприклад, у суб'єкта може продовжувати розвиватися захворювання. Суб'єкти, які на теперішній момент мають, або які мали рак, також мають підвищений ризик метастазування раку.

Термін «пацієнт» відповідно до винаходу означає суб'єкта, що підлягає лікуванню, зокрема хворого суб'єкта, включаючи людину, приматів нелюдського походження або інших тварин, зокрема ссавців, таких як корови, коні, свині, кози, собаки, кішки або гризуни, такі як миші й пацюки. В особливо кращому варіанті здійснення пацієнтом є людина.

«Клітина-мішень» означає будь-яку небажану клітину, таку як ракова клітина. У кращих варіантах здійснення клітина-мішень експресує CLDN.

Термін «антиген» належить до агента, такого як білок або пептид, що містить епітоп, проти якого спрямована і/або повинна бути спрямована імунна відповідь. У кращому варіанті здійснення антиген є пухлиноасоційованим антигеном, таким як CLDN18.2 або CLDN6, тобто компонентом ракових клітин, який може походити із цитоплазми, клітинної поверхні й клітинних ядер, зокрема, такі антигени, які продукуються, переважно у великій кількості, внутрішньоклітинно або як поверхневі антигени на ракових клітинах.

У контексті даного винаходу термін «пухлино-асоційований антиген» переважно належить до білків, які в нормальних умовах специфічно експресуються в обмеженому числі тканин і/або органів, або на специфічних стадіях у процесі розвитку, і експресуються або аберадно експресуються в одній або більше пухлинах або ракових тканинах. У контексті даного винаходу пухлиноасоційований антиген переважно пов'язаний із клітинною поверхнею ракової клітини й переважно не експресується або тільки рідко експресується в нормальних тканинах.

Термін «епітоп» належить до антигенної детермінанти в молекулі, тобто частини молекули, яка розпізнається імунною системою, наприклад, яка розпізнається антитілом. Наприклад, епітопи являють собою дискретні, тривимірні ділянки на антигені, які розпізнаються імунною системою. Епітопи звичайно складаються з хімічно активних груп, розташованих на поверхні молекул, таких як бічні ланцюги амінокислот або цукрів, і звичайно мають специфічні характеристики тривимірної структури, а також специфічні характеристики зарядів. Конформаційні й неконформаційні епітопи відрізняються тим, що зв'язування з першим, на відміну від зв'язування з останнім, втрачається в присутності денатуруючих розчинників. Епітоп білка переважно містить безперервну або переривчасту частину зазначеного білка й, переважно, становить від 5 до 100, переважно від 5 до 50, більш переважно від 8 до 30, найбільше переважно від 10 до 25 амінокислот у довжину, наприклад, епітоп може містити переважно 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25 амінокислот у довжину.

Термін «антитіло» належить до глікопротеїну, що містить щонайменше два важкі (H) ланцюги й два легкі (L) ланцюги, зв'язані між собою дисульфідними зв'язками. Термін «антитіло» включає моноклональні антитіла, рекомбінантні антитіла, людські антитіла, гуманізовані антитіла й химерні антитіла. Кожний важкий ланцюг складається з варіабельної області важкого ланцюга (скорочено позначуваної тут як VH) і константної області важкого ланцюга. Кожний легкий ланцюг складається з варіабельної області легкого ланцюга (скорочено позначуваної тут як VL) і константної області легкого ланцюга. Області VH і VL можуть далі підрозділятися на ділянки гіперваріабельності, названі ділянками, що визначають

комплементарність (CDR), які перемежуються з ділянками, що є більш консервативними, названими каркасними областями (FR). Кожна VH і VL складається із трьох CDR і чотирьох FR, організованих у напрямку від амінокінця до карбоксикінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варіабельні області важкого й легкого ланцюгів містять з'єднувальний домен, який взаємодіє з антигеном. Константні області антитілу можуть опосередковувати зв'язування імуноглобуліну із тканинами або факторами хазяїна, що включають різні клітини імунної системи (наприклад ефекторні клітини), і першим компонентом (C1q) класичної системи комплементу.

Термін «моноклональне антитіло», використовуваний тут, належить до препарату молекул антитіла однієї молекулярної композиції. Моноклональне антитіло проявляє одну специфічність зв'язування й афінність. В одному варіанті здійснення моноклональні антитіла продукуються гібридомою, яка включає В-клітину, отриману від тварини, відмінної від людини, наприклад миші, злиту з іморталізованою клітиною.

Термін «рекомбінантне антитіло», використовуваний тут, передбачає включення всіх антитіл, які отримані, експресовані, створені або виділені рекомбінантними способами, таких як: (а) антитіла, виділені у тварини (наприклад миші), яка є трансгенною або трансхромосомною за генами імуноглобуліну, або з гібридами, отриманої з нього, (b) антитіла, виділені із клітини-хазяїна, трансформованої таким чином, щоб вона експресувала антитіло, наприклад, із трансфектоми, (с) антитіла, виділені з бібліотеки рекомбінантних комбінаторних антитіл, і (d) антитіла, отримані, експресовані, створені або виділені будь-якими іншими способами, які включають сплайсинг послідовностей гена імуноглобуліну з іншими послідовностями ДНК.

Термін «людське антитіло», використовуване тут, передбачає включення антитіл, що мають варіабельні й константні області, утворені з послідовностей імуноглобулінів зародкової лінії людини. Людські антитіла можуть включати амінокислотні залишки, не кодовані послідовностями імуноглобулінів зародкової лінії людини (наприклад, мутації, внесені випадковим або сайт-специфічним мутагенезом *in vitro*, або за допомогою соматичної мутації *in vivo*).

Термін «гуманізоване антитіло» належить до молекули, що має антигензв'язуючий сайт, який, по суті, походить із імуноглобуліну від різновидів нелюдського походження, і іншу структуру імуноглобуліну цієї молекули, основу на структурі й/або послідовності імуноглобуліну людини. Цей антигензв'язуючий сайт може містити або повні варіабельні домени, злиті з константними доменами, або тільки визначальні комплементарні області (CDR), пересажені на придатні каркасні області у варіабельних доменах. Антигензв'язуючі сайти можуть бути сайтами дикого типу або модифікованими однією або декількома амінокислотними замінами, наприклад модифікованими для того, щоб вони мали більш близьку подібність із імуноглобуліном людини. Деякі форми гуманізованих антитіл зберігають усі CDR-послідовності (наприклад гуманізоване мишаче антитіло, яке містить усі шість CDR з мишачого антитіла). Інші форми мають одну або більше CDR, які змінені щодо вихідного антитіла.

Термін «химерне антитіло» належить до таких антитіл, у яких одна частина кожної з амінокислотних послідовностей важких і легких ланцюгів гомологічна відповідним послідовностям антитіл, отриманих від певних різновидів або приналежних конкретному класу, тоді як інший сегмент ланцюга гомологічний відповідним послідовностям від інших видів. Звичайно варіабельна область і легкого, і важкого ланцюгів імітує варіабельні області антитіл, отриманих від одного виду ссавців, тоді як константні області гомологічні послідовностям в антитілах, отриманих від інших видів. Одна з явних переваг таких химерних форм полягає в тому, що варіабельна область може бути легко отримана з відомих у цей час джерел з використанням легко доступних В-клітин або гібридом організмів-хазяїнів, що не є людиною, у комбінації з константними областями, отриманими, наприклад, із препаратів клітин людини. У той час як перевага варіабельної області полягає в простоті одержання й на специфічність не впливає її джерело, константна область, якщо вона є людською, менш імовірно викличе імунну відповідь у суб'єкта-людини при ін'єкції антитіл, ніж в тому випадку, коли константна область отримана від джерела, відмінного від людини. Однак визначення не обмежене таким конкретним прикладом.

Антитіла можуть бути отримані від різних видів, включаючи, але без обмеження, мишей, пацюків, кроликів, морських свинок і людини.

Антитіла, описані тут, включають антитіла IgA, такі як IgA1 або IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM і IgD. У різних варіантах здійснення антитіло є антитілом IgG1, зокрема, ізотип IgG1 каппа або лямбда IgG1 (тобто IgG1, κ , λ), антитіло IgG2a (наприклад IgG2a, κ , λ), антитіло IgG2b (наприклад IgG2b, κ , λ), антитіло IgG3 (наприклад IgG3, κ , λ) або антитіло IgG4 (наприклад IgG4, κ , λ).

Використовуваний тут термін «гетерологічне антитіло» визначають відносно трансгенного організму, продукуючого дане антитіло. Цей термін належить до антитіла, що має послідовність амінокислот або кодуючу послідовність нуклеїнової кислоти, яка відповідає послідовностям, виявленим в організмі, який не є трансгенною твариною, і звичайно виділеному в різновидів, відмінних від трансгенної тварини.

Використовуваний тут термін «гетерогібридне антитіло» належить до антитіла, що має легкий і важкий ланцюги організмів різного походження. Наприклад, антитіло, що має людський важкий ланцюг, асоційований з мишачим легким ланцюгом, є гетерогібридним антитілом.

Антитіла, описані тут, переважно, є виділеними. Термін «виділене антитіло», використовуване тут, належить до антитіла, яке практично не містить інші антитіла, що мають відмінні антигенні специфічності (наприклад виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з CLDN18.2, практично не містить антитіла, які специфічно зв'язуються з антигенами, відмінними від CLDN18.2). Виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з епітопом, ізоформою або варіантом людського CLDN18.2, може, однак, мати перехресну реактивність із іншими спорідненими антигенами, наприклад, від інших видів (наприклад гомологи різновидів CLDN18.2). Крім того, виділене антитіло може практично не містити інший клітинний матеріал і/або хімічні речовини. В одному варіанті здійснення комбінація «виділених» моноклональних антитіл належить до антитіл, що мають різні специфічності, і об'єднані у добре охарактеризовану композицію або суміш.

Терміни «антигензв'язуюча область» антитіла (або просто «з'єднувальна область») або «антигензв'язуючий фрагмент» антитіла (або просто «з'єднувальний фрагмент»), або аналогічні терміни належать до одного або декількох фрагментів антитіла, які зберігають здатність до специфічного зв'язування з антигеном. Було показано, що антигензв'язуюча функція антитіла може здійснюватися фрагментами всієї послідовності. До прикладів з'єднувальних фрагментів, включених у термін «антигензв'язуюча область» антитіла, належать (i) фрагменти Fab, моновалентні фрагменти, що складаються із доменів VL, VH, CL і CH; (ii) фрагменти F(ab')₂, бівалентні фрагменти, що складаються із двох фрагментів Fab, зв'язаних дисульфідним містком у шарнірній області; (iii) фрагменти Fd, що складаються із доменів VH і CH; (iv) фрагменти Fv, що складаються із доменів VL і VH окремої області антитіла; (v) фрагменти dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), які складаються з домена VH; (vi) ізольовані області, що визначають комплементарність (CDR), і (vii) комбінації двох або більше ізольованих CDR, які можуть бути необов'язково з'єднані синтетичним лінкером. Більше того, незважаючи на те, що два домени у фрагменті Fv, VL і VH кодуються різними генами, їх можна об'єднати, використовуючи рекомбінатні технології, за допомогою синтетичного лінкера, який дозволяє побудувати з них єдиний білковий ланцюжок, у якому області VL і VH зв'язуються з утворенням моновалентних молекул (відомих як одиночний ланцюг Fv (scFv)); дивися, наприклад, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; і Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Такі одноланцюгові антитіла також передбачаються бути охопленими терміном «антигензв'язуючий фрагмент» антитіла. Додатковим прикладом є злиті білки з'єднувальний домен-імуноглобулін, що містять (i) поліпептид з'єднувального домена, який злитий з поліпептидом шарнірної області імуноглобуліну, (ii) константну область CH₂ важкого ланцюга імуноглобуліну, зливу із шарнірною областю, і (iii) константну область CH₃ важкого ланцюга імуноглобуліну, зливу з константною областю CH₂. Поліпептид з'єднувального домена може бути варіабельною областю важкого ланцюга або варіабельною областю легкого ланцюга. Злиті білки з'єднувальний домен-імуноглобулін додатково розкриті в US 2003/01 18592 і US 2003/0133939. Такі фрагменти антитіл одержують із використанням загальноприйнятих способів, відомих фахівцям у даній області, і ці фрагменти піддають скринінгу в такий же спосіб, як і інтактні антитіла.

Термін «з'єднувальний домен» характеризується в контексті даного винаходу структурою, наприклад, антитіла, яка зв'язується/взаємодіє із заданою цільовою структурою/антигеном/епітопом. Таким чином, зв'язуючий домен відповідно до винаходу, означає «ділянка взаємодії антигену».

Усі антитіла й похідні антитіл, такі як фрагменти антитіл, описані тут, з метою винаходу позначені терміном «антитіло». Термін «похідні антитіла» належить до будь-якої модифікованої форми антитіла, наприклад кон'югату антитіла й іншого агента або антитіла, або фрагмента антитіла. Крім того, антитіла й похідні антитіл, як описано тут, є придатними для одержання з'єднувальних агентів за винаходом, таких як фрагменти антитіла.

Антитіла природного походження, як правило, є моноспецифічними, тобто вони зв'язуються з одним антигеном. Даний винахід забезпечує з'єднувальні агенти, що зв'язуються із цитотоксичними клітинами (шляхом зв'язування з CD3 рецептором) і раковими клітинами (шляхом зв'язування з CLDN). З'єднувальні агенти за даним винаходом є щонайменше

біспецифічними або мультиспецифічними, такими як триспецифічні, тетраспецифічні і т.д.

З'єднувальний агент за винаходом може бути у форматі молекули антитіла або молекули, подібної антитілу, або білкового кістяка із властивостями, подібними антитілу, або циклічного пептиду щонайменше із двома специфічностями зв'язування. Таким чином зв'язуючий агент

може містити одне або більше антитіл, описаних тут, або їх фрагменти.

Відповідно до винаходу біспецифічна молекула, зокрема біспецифічний білок, такий як біспецифічне антитіло, є молекулою, яка містить дві різні специфічності зв'язування й, таким чином, може зв'язуватися із двома різними типами антигену, такими як CLDN і CD3. Зокрема, термін «біспецифічне антитіло», використовуваний тут, належить до антитіла, що містить дві антигензв'язуючих ділянки, перша ділянка зв'язування, що має афінність відносно першого антигену або епітопа, і друга ділянка зв'язування, що має афінність зв'язування відносно другого антигену або епітопа, відмінного від першого. Зокрема, біспецифічне антитіло є штучним білком, який складається із фрагментів двох різних антитіл (зазначені фрагменти двох різних антитіл утворюють два з'єднувальні домени) і, таким чином, зв'язується із двома різними типами антигену. Біспецифічне антитіло відповідно до винаходу сконструйоване для одночасного зв'язування із клітиною імунної системи, такою як імунна ефекторна клітина, зокрема Т-клітина, така як цитотоксична клітина (шляхом зв'язування з CD3), і клітиною-мішенню, такою як ракова клітина (шляхом зв'язування з пухлино-асоційованим антигеном CLDN), що підлягає знищенню.

Термін «біспецифічне антитіло» також включає діатіла. Діатіла є бівалентними, біспецифічними антитілами, у яких домени VH і VL експресуються на єдиному поліпептидному ланцюзі, але використання лінкера, який є занадто коротким для створення можливості спарювання між двома доменами на одному і тому ж ланцюзі, змушує ці домени спаровуватися з комплементарними доменами іншого ланцюга й створює два антигензв'язуючих сайти (дивися, наприклад, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121- 1123).

«Мультиспецифічні з'єднувальні агенти» являють собою молекули, які містять більше двох різних специфічностей зв'язування.

Особливо кращими відповідно до винаходу є біспецифічні антитіла, включаючи фрагменти біспецифічних антитіл, зокрема біспецифічні одноланцюгові антитіла, включаючи фрагменти біспецифічних одноланцюгових антитіл. Термін «біспецифічне одноланцюгове антитіло» означає один поліпептидний ланцюг, що містить два з'єднувальні домени. Зокрема, термін «біспецифічне одноланцюгове антитіло» або «одноланцюгове біспецифічне антитіло», або споріднені терміни відповідно до даного винаходу, переважно, означає конструкції антитіла, отримані в результаті з'єднання щонайменше двох варіабельних областей антитіла в одному поліпептидному ланцюзі, позбавленому константної й/або Fc частини(н), що присутня у повних імуноглобулінах.

Наприклад, біспецифічне одноланцюгове антитіло може бути конструкцією, що містить усього дві варіабельні області антитіла, наприклад дві VH-області, при цьому кожна область здатна до специфічного зв'язування з окремим антигеном і з'єднані одна з одною за допомогою короткого поліпептидного спейсера, таким чином, що дві варіабельні області антитіла з їхнім включеним спейсером існують у вигляді одного безперервного поліпептидного ланцюга. Іншим прикладом біспецифічного одноланцюгового антитіла може бути один поліпептидний ланцюг із трьома варіабельними областями антитіла. У цьому випадку, дві варіабельні області антитіла, наприклад одна VH і одна VL, можуть становити scFv, при цьому дві варіабельні області антитіла з'єднані одна з одною за допомогою синтетичного поліпептидного лінкера, причому зазначений лінкер генетично сконструйований таким чином, щоб бути мінімально імуногенним, при цьому залишаючись максимально стійким до протеолізу. Такий scFv здатний до специфічного зв'язування з конкретним антигеном і з'єднаний з варіабельною областю іншого антитіла, наприклад VH-областю, здатною до зв'язування з антигеном, відмінним від антигену, зв'язаного scFv. Ще іншим прикладом біспецифічного одноланцюгового антитіла може бути єдиний поліпептидний ланцюг із чотирма варіабельними областями антитіла. У цьому випадку, перші дві варіабельні області антитіла, наприклад VH-область і VL-область, можуть формувати один scFv, здатний до зв'язування з одним антигеном, тоді як друга VH-область і VL-область можуть формувати другий scFv, здатний до зв'язування з іншим антигеном. У межах одного безперервного поліпептидного ланцюга індивідуальні варіабельні області антитіла однієї специфічності можуть бути успішно розділені синтетичним поліпептидним лінкером, тоді як відповідні scFv можуть бути успішно розділені коротким поліпептидним спейсером, як описано вище.

Відповідно до одного варіанту здійснення винаходу перший з'єднувальний домен

біспецифічного антитіла містить один варіабельний домен антитіла, переважно домен VHH. Відповідно до одного варіанту здійснення винаходу перший з'єднувальний домен біспецифічного антитіла містить два варіабельні домени антитіла, переважно scFv, тобто VH-VL або VL-VH. Відповідно до одного варіанту здійснення винаходу другий з'єднувальний домен біспецифічного антитіла містить один варіабельний домен антитіла, переважно домен VHH. Відповідно до одного варіанту здійснення винаходу другий з'єднувальний домен біспецифічного антитіла містить два варіабельні домени антитіла, переважно scFv, тобто VH-VL або VL-VH. У своїй мінімальній формі загальне число варіабельних областей антитіла в специфічному антитілі відповідно до винаходу рівне, таким чином, тільки двом. Наприклад, таке антитіло може містити два домени VH або два домени VHH.

Відповідно до одного варіанту здійснення винаходу перший з'єднувальний домен і другий з'єднувальний домен біспецифічного антитіла, кожний, містить один варіабельний домен антитіла, переважно, домен VHH. Відповідно до одного варіанту здійснення винаходу перший з'єднувальний домен і другий з'єднувальний домен біспецифічного антитіла, кожний, містять два варіабельні домени антитіла, переважно scFv, тобто VH-VL або VL-VH. У цьому варіанті здійснення з'єднувальний агент за винаходом переважно містить (i) варіабельний домен важкого ланцюга (VH) антитіла проти CLDN, (ii) варіабельний домен легкого ланцюга (VL) антитіла проти CLDN, (iii) варіабельний домен важкого ланцюга (VH) антитіла проти CD3, і (iv) варіабельний домен легкого ланцюга (VL) антитіла проти CD3.

Біспецифічні антитіла повної довжини можуть бути отримані шляхом ковалентного зв'язування двох моноклональних антитіл або за допомогою стандартних методів на основі міжвидових гібридом. Ковалентне зв'язування двох моноклональних антитіл описане в Anderson, Blood 80 (1992), 2826-34. У контексті даного винаходу одне з антитіл є специфічним відносно CLDN і інше відносно CD3.

В одному варіанті здійснення біспецифічний з'єднувальний агент знаходиться у форматі подібної антитілу молекули, при цьому важкий ланцюг містить два послідовні N-кінцевих варіабельних домени з різними специфічностями, і легкий ланцюг містить два послідовні варіабельні домени з різними специфічностями, приводячи до утворення чотирьох з'єднувальних доменів із двома різними специфічностями (Wu et al, Nat. Biotechnology, 2007, 25(11)), при цьому однією специфічністю є CD3 і іншою специфічністю є CLDN.

У кращому варіанті здійснення біспецифічний з'єднувальний агент за винаходом знаходиться у форматі фрагмента антитіла.

В одному варіанті здійснення біспецифічні молекули відповідно до винаходу містять дві Fab-області, одну, спрямовану проти CLDN, і іншу, спрямовану проти CD3. В одному варіанті здійснення молекула за винаходом є комплексом антигензв'язуючих фрагментів (Fab)₂. Комплекс Fab₂ складається із двох Fab-фрагментів, при цьому один Fab-фрагмент містить домен Fv, тобто домени VH і VL, специфічний відносно антигену CD3, і інший Fab-фрагмент містить домен Fv, специфічний відносно CLDN. Кожний з Fab-фрагментів може складатися із двох одиночних ланцюгів, модуля VL-CL і модуля VH-CH. Альтернативно, кожний з індивідуальних Fab-фрагментів може бути складений в одиночний ланцюг, переважно VI-CL-CH-VH, і індивідуальні варіабельні й константні домени можуть бути з'єднані за допомогою пептидного лінкера. У цілому, індивідуальні одиночні ланцюги Fab-фрагментів можуть бути з'єднані за допомогою дисульфідних зв'язків, адгезивних доменів, зв'язані хімічно й/або за допомогою пептидного лінкера. Біспецифічна молекула може також містити більше двох Fab-фрагментів, зокрема молекула може бути Fab3, Fab4 або мультимерним комплексом Fab зі специфічністю відносно 2, 3, 4 або більше різних антигенів. Винахід також включає хімічно зв'язані Fab.

В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент відповідно до винаходу включає різні типи бівалентних і тривалентних одноланцюгових варіабельних фрагментів (scFv), злиті білки, що імітують варіабельні домени двох антитіл. Одноланцюговий варіабельний фрагмент (scFv) є злитим білком, що складається з варіабельних областей важкого (VH) і легкого ланцюгів (VL) імунoglobulinів, з'єднаних коротким лінкерним пептидом, що складаються із приблизно 10-25 амінокислот. Лінкер звичайно багатий гліцином для гнучкості, а також серином або треоніном для розчинності, і може з'єднувати або N-кінець VH з C-кінцем VL, або навпаки. Дивалентні (бівалентні) одноланцюгові варіабельні фрагменти (di-scFv, bi-scFv) можуть бути сконструйовані шляхом зв'язування двох scFv. Це може бути зроблено шляхом одержання одиночного пептидного ланцюга із двома областями VH і двома областями VL з одержанням тандемних scFv. Винахід також включає мультиспецифічні молекули, що містять більше двох scFv-з'єднувальних доменів. Це забезпечує те, що молекула має безліч специфічностей до антигену і є триспецифічною, тетраспецифічною або мультиспецифічною молекулою, або молекула є

біспецифічною молекулою, що містить більше одного з'єднувального домена scFv, зі специфічністю відносно того самого антигену. Зокрема, молекула за винаходом може бути мультиспецифічною одноланцюговою молекулою Fv.

Іншою можливістю є створення scFv з лінкерними пептидами, які є надто короткими для з'єднання двох варіабельних областей (приблизно п'ять амінокислот), ініціюючи димеризацію scFv. Цей тип відомий як діатіла. Ще більш короткі лінкери (одна або дві амінокислоти) приводять до формування тримерів, так званих триатіл або тритіл. Тетратіла також були отримані. Вони проявляють навіть більш високу афінність стосовно своїх мішеней, ніж діатіла.

Особливо кращим прикладом фрагмента біспецифічного антитіла є діатіло (Kipriyanov, *Int. J. Cancer* 77 (1998), 763-772), яке є невеликим фрагментом бівалентного й біспецифічного антитіла. Діатіла містять варіабельний домен важкого ланцюга (VH), з'єднаний з варіабельним доменом легкого ланцюга (VL) на одному й тому ж поліпептидному ланцюзі (VH-VL) за рахунок пептидного лінкера, який має занадто малу довжину, щоб забезпечувати можливість спарювання між двома доменами на одному й тому ж ланцюзі. Це викликає спарювання з комплементарними доменами іншого ланцюга й сприяє складанню димерної молекули із двома функціональними антигензв'язуючими ділянками. Для конструювання біспецифічних діатіл за винаходом V-домени анти-CD3 антитіла й анти-CLDN антитіла можуть бути злиті для створення двох ланцюгів VH(CD3)-VL(CLDN), VH(CLDN)-VL(CD3). Кожний ланцюг сам по собі нездатний до зв'язування з відповідним антигеном, але відтворює функціональні антигензв'язуючі ділянки анти-CD3 антитіла й анти-CLDN антитіла при спарюванні з іншим ланцюгом. У цьому випадку використовується пептидний лінкер, який є занадто коротким для того, щоб забезпечити можливість спарювання між двома доменами на одному й тому ж ланцюзі. Дві молекули scFv з лінкером між варіабельним доменом важкого ланцюга й варіабельним доменом легкого ланцюга, який є занадто коротким для внутрішньомолекулярної димеризації, співекспресуються й самозбираються з формуванням біспецифічних молекул із двома сайтами зв'язування на протилежних кінцях.

В одному варіанті здійснення мультиспецифічна молекула відповідно до винаходу містить варіабельні (VH, VL) і константні (C) домени імунoglobulinів. В одному варіанті здійснення біспецифічна молекула є мінітіло, переважно мінітіло, що містить два одиночні ланцюги VH-VL-C, які з'єднані один з одним за допомогою константних доменів (C) кожного ланцюга. Згідно із цим аспектом відповідні варіабельні області важкого ланцюга (VH), відповідні варіабельні області легкого ланцюга (VL) і константні домени (C) розташовані в напрямку від N-кінця до C-кінця в порядку VH(CLDN)-VL(CLDN)-(C) і VH(CD3)-VL(CD3)-C, де C переважно є доменом CH3. Спарювання константних доменів приводить до утворення мінітіла.

Відповідно до іншого, особливо кращого аспекту, біспецифічний з'єднувальний агент за винаходом знаходиться у форматі конструкції біспецифічного одноланцюгового антитіла, при цьому зазначена конструкція містить або складається щонайменше із двох з'єднувальних доменів, при цьому один із зазначених доменів зв'язується з CLDN і другий домен зв'язується з CD3. Такі молекули, також названі «bispecific T cell engagers» (Bite; термін Bite належить тільки до біспецифічних молекул, одне плече яких є специфічним відносно CD3), складаються із двох молекул scFv, з'єднаних за допомогою лінкерного пептиду.

Використовуваний тут термін «біспецифічне одноланцюгове антитіло» означає одиночний поліпептидний ланцюг, що містить два з'єднувальні домени. Кожний з'єднувальний домен містить одну варіабельну область із важкого ланцюга антитіла («область VH»), при цьому область VH першого з'єднувального домена специфічно зв'язується з CLDN, і область VH другого з'єднувального домена специфічно зв'язується з CD3. Два з'єднувальні домени необов'язково зв'язані один з одним коротким поліпептидним спейсером. Необмежуваним прикладом поліпептидного спейсера є GLY-GLY-GLY-GLY-SER (G-G-G-G-S) і її повтори. Кожний з'єднувальний домен може додатково містити одну варіабельну область із легкого ланцюга антитіла («область VL»), при цьому область VH і область VL у межах кожного з першого й другого з'єднувальних доменів зв'язані один з одним за допомогою поліпептидного лінкера, що має достатню довжину для того, щоб забезпечити можливість спарювання області VH і області VL першого з'єднувального домена з областю VH і областю VL другого з'єднувального домена.

Відповідно до цього аспекту відповідні варіабельні області важкого ланцюга (VH) і відповідні варіабельні області легкого ланцюга (VL) розташовані в напрямку від N-кінця до C-кінця в порядку VH(CLDN)-VL(CLDN)-VH(CD3)-VL(CD3), VH(CD3)-VL(CD3)-VH(CLDN)-VL(CLDN) або VH(CD3)-VL(CD3)-VL(CLDN)-VH(CLDN). Однак передбачається, що біспецифічні одноланцюгові антитіла за винаходом містять інші розташування доменів, такі як VL(CLDN)-VH(CLDN)-VH(CD3)-VL(CD3), VL(CLDN)-VH(CLDN)-VL(CD3)-VH(CD3), VH(CLDN)-VL(CLDN)-VL(CD3)-VH(CD3), VL(CD3)-VH(CD3)-VH(CLDN)-VL(CLDN), VL(CD3)-VH(CD3)-VL(CLDN)-VH(CLDN).

Довгий лінкер звичайно з'єднує відповідні варіабельні області важкого ланцюга (VL) і відповідні варіабельні області легкого ланцюга (VL) з утворенням з'єднувального scFv-домена, тоді як короткий лінкер звичайно з'єднує два з'єднувальні scFv-домени. Лінкер звичайно розроблений для забезпечення гнучкості й стійкості до протеази й, переважно, лінкер містить амінокислотні залишки гліцину й/або серину. Короткі послідовності пептидного лінкера можуть складатися з 12 або менше, наприклад 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 або 2 амінокислот, і переважно 5 або 6 амінокислот. Короткі пептидні лінкери, переважно, містять амінокислотні послідовності SGGGS або GGGGS. Довгі пептидні лінкери можуть складатися з 12 або більше, наприклад 15-25 або 15-20, або 15-18 амінокислот. Довгі пептидні лінкери, переважно, містять амінокислотні послідовності (GGGS)3 або VE(GGSGGS)2GGVD. Додаткові довгі пептидні лінкери можуть містити амінокислотні послідовності (GGGS)4, (GGGS)5 або GGGGS(GGS)3GGGS.

З'єднувальні агенти відповідно до винаходу можуть також містити амінокислотну послідовність для сприяння секреції молекули, наприклад N-кінцевого сигналу секреції, і/або одну або більше епітопних міток, що сприяють зв'язуванню, очищенню або детекції молекули.

Переважно, сигнал секреції є сигнальною послідовністю (наприклад вибраною з SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55), яка забезпечує достатнє проходження по секреторному шляхові й/або секрецію з'єднувального агента в позаклітинний простір. Переважно, послідовність сигналу секреції є, що розщеплюється й віддаляється зі зрілого з'єднувального агента. Послідовність сигналу секреції, переважно, вибирається відповідно до клітини або організму, у якому з'єднувальний агент продукується.

Амінокислотна послідовність епітопної мітки може бути введена в будь-яке положення в межах амінокислотної послідовності з'єднувального агента, і може набувати форми петлі в межах кодованої білкової структури, або може бути злита на N-кінцях або C-кінцях зі з'єднувальним агентом. Переважно, епітопна мітка злита на C-кінці зі з'єднувальним агентом. Епітопна мітка може містити сайт розщеплення, який забезпечує можливість видалення мітки зі з'єднувального агента. Зазначена епітопна мітка може бути будь-яким видом епітопної мітки, який є функціональним у нативних і/або денатуруючих умовах, переважно гістидиновою міткою, найбільше переважно міткою, що містить шість залишків гістидину.

Біспецифічний з'єднувальний агент за винаходом може містити додатково до зазначеного першого й другого з'єднувального домену, додатковий з'єднувальний домен, який служить, наприклад, для підвищення селективності відносно пухлинних клітин. Це може бути досягнуто, наприклад, шляхом забезпечення з'єднувальних доменів, які зв'язуються з іншими антигенами, що експресуються на пухлинних клітинах.

У контексті даного винаходу, створені з'єднувальні агенти, переважно, здатні викликати імунні ефекторні функції, описані тут. Переважно, зазначені імунні ефекторні функції спрямовані проти клітин, що несуть пухлиноасоційований антиген CLDN на своїй поверхні.

Термін «імунні ефекторні функції» у контексті даного винаходу включають будь-які функції, опосередковані компонентами імунної системи, які приводять, наприклад, до інгібування росту пухлини й/або інгібування розвитку пухлини, включаючи інгібування поширення пухлини й метастазів. Переважно, імунні ефекторні функції призводять до загибелі пухлинних клітин. Такі функції включають комплемент-залежну цитотоксичність (CDC), антитіло-залежну клітинну цитотоксичність (ADCC), антитіло-залежний клітково-опосередкований фагоцитоз (ADCP), індукцію апоптозу в клітинах, що несуть пухлиноасоційований антиген, цитоліз клітин, що несуть пухлиноасоційований антиген, і/або інгібування проліферації клітин, що несуть пухлиноасоційований антиген. З'єднувальні агенти можуть також проявляти ефект просто шляхом зв'язування з пухлиноасоційованими антигенами на поверхні ракової клітини. Наприклад, антитіла можуть блокувати функцію пухлиноасоційованого антигену або індукувати апоптоз лише шляхом зв'язування з пухлиноасоційованим антигеном на поверхні ракової клітини.

З'єднувальні агенти, описані тут, можуть бути кон'юговані з терапевтичним фрагментом або агентом, таким як цитотоксин, лікарським засобом (наприклад імуносупресантом) або радіоактивним ізотопом. Цитотоксин або цитотоксичний агент включає будь-який агент, який є згубним для клітин і, зокрема, убиває клітини. Приклади включають таксол, цитохалазин В, граміцидин D, етидіум бромід, еметин, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкрисдин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксиантрацидін, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, татракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин і їх аналоги або гомологи. Придатні терапевтичні агенти для формування кон'югатів включають, але без обмеження, антиметаболіти (наприклад метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогuanін, цитарабін, флударабін, 5-фторурацил, декарабазин),

алкілюючі агенти (наприклад мехлоретамін, тіоепа хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) і ломусти́н (CCNU), циклофосфамід, бусульфан, дибромманітол, стрептозотоцин, мітоміцин C і цис-дихлордіамін платини (II) (DDP) цисплатин), антрацикліни (наприклад даунорубіцин (вихідна назва дауноміцин) і доксорубіцин), антибіотики (наприклад дактиноміцин (вихідна назва актиноміцин), блеоміцин, митраміцин і антраміцин (AMC), і антимітотичні агенти (наприклад, вінкрестин і вінбластин). У кращому варіанті здійснення терапевтичний агент є цитотоксичним агентом або радіотоксичним агентом. В іншому варіанті здійснення терапевтичний агент є імуносупресантом. У ще іншому варіанті здійснення терапевтичний агент є GM-CSF. У кращому варіанті здійснення терапевтичним агентом є доксорубіцин, цисплатин, блеоміцин, сульфат, кармустин, хлорамбуцил, циклофорамід або рицин А.

Також зв'язуючі агенти можуть бути кон'юговані з радіоактивними ізотопами, наприклад, йодом-131, ітрієм-90 або індієм-111 для створення цитотоксичних радіофармацевтичних засобів.

Методики кон'югації таких терапевтичних фрагментів з антитілами добре відомі, дивися, наприклад, Arnon et al., «Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy» в Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., «Antibodies For Drug Delivery» в Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review» в Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); «Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy» в Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), і Thorpe et al., «The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates», Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

Термін «зв'язування» відповідно до винаходу переважно належить до специфічного зв'язування.

Відповідно до даного винаходу агент, такий як антитіло, здатний зв'язуватися з попередньо визначеною мішенню, якщо він має значну афінність відносно зазначеної попередньо визначеної мішені й зв'язується із зазначеною попередньо визначеною мішенню в стандартних аналізах. «Афінність» або «афінність зв'язування» часто вимірюється константою дисоціації (KD). Переважно, термін «значна афінність» належить до зв'язування з попередньо визначеною мішенню з константою дисоціації (KD), рівною 10^{-5} М або нижче, 10^{-6} М або нижче, 10^{-7} М або нижче, 10^{-8} М або нижче, 10^{-9} М або нижче, 10^{-10} М або нижче, 10^{-11} М або нижче, або 10^{-12} М або нижче.

Агент не здатний (значно) зв'язуватися з мішенню, якщо він не має значної афінності відносно зазначеної мішені й не зв'язується в значній мірі, зокрема не зв'язується детектованим чином із зазначеною мішенню в стандартних аналізах. Переважно, агент не зв'язується детектованим чином із зазначеною мішенню у випадку присутності при концентрації, що становить до 2, переважно 10, більш переважно 20, особливо 50 або 100 мг/мл або вище. Переважно, агент не має значної афінності відносно мішені, якщо він зв'язується із зазначеною мішенню з KD, яка щонайменше в 10 разів, 100 разів, 103 рази, 104 рази, 105 разів або 106 разів вище, чим KD для зв'язування з попередньо визначеною мішенню, з якою агент здатний зв'язуватися. Наприклад, якщо KD для зв'язування агента з мішенню, з якою агент здатний зв'язуватися, рівна 10^{-7} М, KD для зв'язування з мішенню, відносно якої агент не має значної афінності, буде становити щонайменше 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М або 10^{-1} М.

Агент, такий як антитіло, є специфічним відносно попередньо визначеної мішені, якщо він здатний зв'язуватися із зазначеною попередньо визначеною мішенню, при цьому він не здатний зв'язуватися з іншими мішенями, тобто не має значної афінності відносно інших мішеней і значно не зв'язується з іншими мішенями в стандартних аналізах. Відповідно до винаходу агент є специфічним відносно CLDN, якщо він здатний зв'язуватися з CLDN, але не здатний (значно) зв'язуватися з іншими мішенями. Переважно, агент є специфічним відносно CLDN, якщо афінність відносно таких інших мішеней і зв'язування з такими іншими мішенями значно не перевищує афінність відносно неспоріднених CLDN білків або зв'язування з неспорідненими CLDN білками, такими як бичачий сироватковий альбумін (BSA), казеїн, людський сироватковий альбумін (HSA), або не стосовними до клаудину трансмембранними білками, такими як молекули MHC або рецептор трансферину, або будь-яким іншим зазначеним поліпептидом. Переважно, агент є специфічним відносно попередньо визначеної мішені, якщо він зв'язується із зазначеною мішенню з KD, яка, щонайменше, в 10 разів, 100 разів, 103 рази, 104 рази, 105 разів, або 106 разів нижче, чим KD для зв'язування з мішенню, для якої він не є специфічним. Наприклад, якщо KD для зв'язування агента з мішенню, відносно якої він є специфічним, рівна

10^{-7} M, KD для зв'язування з мішенню, відносно якої він не є специфічним, буде рівна, щонайменше, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M або 10^{-1} M.

Зв'язування агента з мішенню може бути визначене експериментально з використанням будь-якого придатного способу; дивися, наприклад, Berzofsky et al., «Antibody-Antigen Interactions» в Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), і способи, описані в даному документі. Афінність може бути легко визначена стандартними методами, такими як рівноважний діаліз; аналіз із використанням обладнання Biacore 2000 відповідно до загальних процедур, описаних виробником; радіоімуноаналіз із використанням радіоактивно міченого цільового антигену; або іншим методом, відомим фахівцям у даній області. Дані афінності можуть бути проаналізовані, наприклад, методом Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci, 51:660 (1949). Обмірювана афінність конкретної антитіло-антиген взаємодії може змінюватися при вимірюванні в різних умовах, наприклад, концентрації солі, pH. Таким чином, вимірювання афінності й інших антигензв'язуючих параметрів, наприклад, KD, IC₅₀, переважно проводять у стандартизованих розчинах антитіла й антигену, і стандартизованому буфері.

Використовуваний тут термін «ізотип» належить до класу антитіл (наприклад IgM або IgG), кодованих генами константної області важкого ланцюга.

Використовуваний тут термін «перемикання ізотипа» належить до феномена, внаслідок якого клас або ізотип антитіла переходить із одного класу в один з інших класів Ig.

Термін «природний», використовуваний тут, застосовують до об'єкта для позначення того факту, що цей об'єкт може бути виявлений у природних умовах. Наприклад, поліпептидна або полінуклеотидна послідовність, яка присутня в організмі (включаючи віруси), яка може бути виділена із природного джерела і яка не була навмисно модифікована людиною в лабораторних умовах, є природною.

Термін «реаранжирований», використовуваний тут, належить до конфігурації локусу важкого ланцюга або легкого ланцюга імуноглобуліну, де положення сегмента V знаходиться в безпосередній близькості до сегмента D-J або J у конформації, що кодує в основному повний домен VH або VL, відповідно. Реаранжирований локус гена імуноглобуліну (антитіла) може бути ідентифікований шляхом порівняння із ДНК зародкової лінії; реаранжирований локус буде містити щонайменше один, що піддався рекомбінації гептамерний/нонамерний гомологічний елемент.

Термін «нереаранжирований» або «конфігурація зародкової лінії», використовуваний тут відносно сегмента V, належить до конфігурації, у якій сегмент V не зазнає рекомбінації, при якій він знаходився би в безпосередній близькості до сегмента D або J.

В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент за винаходом має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, тобто здатність зв'язуватися з епітопом, присутнім в CLDN18.2, переважно епітопом, розташованим у межах позаклітинних доменів CLDN18.2, особливо, першій позаклітинній петлі, переважно, у положеннях амінокислот 29 по 78 CLDN18.2. У конкретних варіантах здійснення агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, зв'язується з епітопом на CLDN18.2, який не є присутнім на CLDN18.1.

Агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, переважно зв'язується з CLDN18.2, але не з CLDN18.1. Переважно, агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є специфічним відносно CLDN18.2. Переважно, агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, зв'язується з CLDN18.2, що експресується на клітинній поверхні. В особливо кращих варіантах здійснення агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, зв'язується з нативними епітопами CLDN18.2, присутніми на поверхні живих клітин.

У кращому варіанті здійснення агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить варіабельну область важкого ланцюга (VH), яка містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10 і їх фрагментів.

У кращому варіанті здійснення агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить варіабельну область легкого ланцюга (VL), яка містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 і їх фрагментів.

У деяких кращих варіантах здійснення агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить комбінацію варіабельної області важкого ланцюга (VH) і варіабельної області легкого ланцюга (VL), вибрану з наступних можливих варіантів з (i) по (ix):

(i) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 5, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 12, або її фрагмент;

(ii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 6, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 11, або її фрагмент;

(iii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7, або її фрагмент, і

VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 13, або її фрагмент;

(iv) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 9, або її фрагмент, і

VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16, або її фрагмент;

(v) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 8, або її фрагмент, і

5 VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15, або її фрагмент;

(vi) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 10, або її фрагмент,

і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 14, або її фрагмент;

(vii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 10, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 17, або її

10 фрагмент;

(viii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 10, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 18, або її фрагмент;

(ix) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 10, або її фрагмент,

15 і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 19, або її фрагмент.

В особливо кращому варіанті здійснення агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить наступну комбінацію варіабельної області важкого ланцюга (VH) і варіабельної області легкого ланцюга (VL):

VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 8, або її фрагмент, і VL

20 містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15, або її фрагмент.

У наступному, особливо кращому варіанті здійснення агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить наступну комбінацію варіабельної області важкого ланцюга (VH) і варіабельної області легкого ланцюга (VL):

VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 6, або її фрагмент, і VL

25 містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 11, або її фрагмент.

Термін «фрагмент» належить, зокрема, до однієї або декількох визначаючих комплементарність областей (CDR), переважно щонайменше варіабельної області CDR3, варіабельної області важкого ланцюга (VH) і/або варіабельної області легкого ланцюга (VL). В одному варіанті здійснення зазначена одна або декілька визначаючих комплементарність областей (CDR) вибрані із групи визначаючих комплементарність областей CDR1, CDR2 і CDR3. В особливо кращому варіанті здійснення термін «фрагмент» належить до визначаючих комплементарність областей CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області важкого ланцюга (VH) і/або варіабельної області легкого ланцюга (VL).

В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент, що містить одну або декілька CDR, набір CDR або комбінацію наборів CDR, як описано тут, містить зазначені CDR разом з розташованими між ними каркасними областями. Переважно, частина буде також містити щонайменше приблизно 50 % однієї із двох або обох першої й четвертої каркасних областей, при цьому 50 % являють собою С-кінцеві 50 % першої каркасної області й N-кінцеві 50 % четвертої каркасної області. Конструювання з'єднувальних агентів, здійснюване способами на основі рекомбінантної ДНК, може приводити до введення N- або С-кінцевих залишків у варіабельні області, кодованих лінкерами, уведеними для того, щоб полегшити клонування або інші стадії обробки, включаючи введення лінкерів, щоб з'єднати варіабельні області згідно з винаходом з додатковими послідовностями білка, включаючи важкі ланцюги імуноглобуліну, інші варіабельні домени (наприклад при одержанні діатіл) або білкові мітки.

В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент, що містить одну або декілька CDR, набір CDR або комбінацію наборів CDR, як описано тут, містить зазначені CDR у каркасній області людського антитіла.

В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент за винаходом має здатність зв'язуватися з CLDN6, тобто здатність зв'язуватися з епітопом, присутнім в CLDN6, переважно епітопом, розташованим у межах позаклітинних доменів CLDN6, зокрема, у першій позаклітинній петлі, переважно в положеннях амінокислот з 28 по 76 CLDN6, або в другій позаклітинній петлі, переважно в положеннях амінокислот з 141 по 159 CLDN6. У конкретних варіантах здійснення агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN6, зв'язується з епітопом на CLDN6, який не є присутнім на CLDN9. Переважно, агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN6, зв'язується з епітопом на CLDN6, який не є присутнім на CLDN4 і/або CLDN3. Найбільше переважно, агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN6, зв'язується з епітопом на CLDN6, який не є присутнім на білку CLDN, відмінному від CLDN6.

Агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN6, переважно зв'язується з CLDN6, але не з CLDN9, і переважно не зв'язується з CLDN4 і/або CLDN3. Переважно, агент, що має здатність зв'язуватися з CLDN6, є специфічним відносно CLDN6. Переважно, агент, що має здатність

VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 100, або її фрагмент.

Термін «фрагмент» належить, зокрема, до однієї або декількох визначаючих комплементарність областей (CDR), переважно щонайменше варіабельної області CDR3, варіабельної області важкого ланцюга (VH) і/або варіабельної області легкого ланцюга (VL). В

одному варіанті здійснення зазначена одна або декілька визначаючих комплементарність областей (CDR) вибрані з набору визначаючих комплементарність областей CDR1, CDR2 і CDR3. В особливо кращому варіанті здійснення термін «фрагмент» належить до визначаючих комплементарність областей CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області важкого ланцюга (VH) і/або варіабельної області легкого ланцюга (VL).

В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент, що містить одну або декілька CDR, набір CDR або комбінацію наборів CDR, як описано тут, містить зазначені CDR разом з розташованими між ними каркасними областями. Переважно, частина буде також містити щонайменше приблизно 50 % однієї із двох або обох першої й четвертої каркасних областей, при цьому 50 % являють собою С-кінцеві 50 % першої каркасної області й N-кінцеві 50 % четвертої каркасної області. Конструювання з'єднувальних агентів, здійснюване способами на основі рекомбінантної ДНК, може приводити до введення N- або С-кінцевих залишків у варіабельні області, кодованих лінкерами, уведеними для того, щоб полегшити клонування або інші стадії обробки, включаючи введення лінкерів, щоб з'єднати варіабельні області згідно з винаходом з додатковими послідовностями білка, включаючи важкі ланцюги імуноглобуліну, інші варіабельні домени (наприклад при одержанні діатіл) або білкові мітки.

В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент, що містить одну або декілька CDR, набір CDR або комбінацію наборів CDR, як описано тут, містить зазначені CDR у каркасній області людського антитіла.

Анти-CD3 антитіла, які є придатними для забезпечення з'єднувальних агентів відповідно до винаходу, включають, але без обмеження, UCHT1-HS (гуманізоване MAB), UCHT1-MM (мишаче MAB), CLB-T3, TR66, 145-2C11.

UCHT1 є моноклональне IgG1 анти-CD3 моноклональним антитілом, яке детектує CD3 у людини й приматів. CLB-T3 є мишачим моноклональним анти-CD3 антитілом, яке спрямоване проти антигену CD3 і взаємодіє з 80-90 % людських периферичних Т-лімфоцитів і медулярних тимоцитів. TR66 є мишачим IgG1 моноклональним анти-CD3 антитілом, яке розпізнає епсилон-ланцюг людського CD3. 145-2C11 є моноклональним антитілом сірого хом'ячка проти мишачого CD3.

Переважно, області VH і VL з'єднувального домена CD3 отримані з молекул антитіл/антитіла й подібних антитілу молекул, які здатні специфічно розпізнавати людський CD3 у контексті інших субодиниць TCR, які присутні на активованих первинних людських Т-клітинах, експресуючих TCR у своїй нативній конфігурації. Области VH і VL, отримані з антитіла, специфічного відносно CD 3-епсилон ланцюга, є найбільш бажаними, і зазначені (батьківські) антитіла повинні бути здатні специфічно зв'язувати епітопи, що відображають нативну або близьку до нативної структуру, або конформаційний епітоп людського CD3, представлений у контексті комплексу TCR. У кращому варіанті здійснення винаходу області VH і VL з'єднувального домена CD3 отримані з CD 3-специфічного антитіла, вибраного із групи, яка складається з UCHT1-HS, UCHT1-MM, CLB-T3 і TR66, переважно TR66.

У кращому варіанті здійснення агент, що має здатність зв'язуватися з CD3, містить варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 30, 32, 34, 36, 94, 95 і їх фрагментів.

У кращому варіанті здійснення агент, що має здатність зв'язуватися з CD3, містить варіабельну область легкого ланцюга (VL), що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 96 і їх фрагментів.

У певних кращих варіантах здійснення агент, що має здатність зв'язуватися з CD3, містить комбінацію варіабельної області важкого ланцюга (VH) і варіабельної області легкого ланцюга (VL), вибрану з наступних можливих варіантів з (i) по (ix):

(i) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 30, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 31, або її фрагмент;

(ii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 32, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 33, або її фрагмент;

(iii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 34, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 34, або її фрагмент;

(iv) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 36, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 37, або її фрагмент;

(v) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 94, або її фрагмент,

і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 37, або її фрагмент;

(vi) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 95, або її фрагмент,

і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 37, або її фрагмент;

(vii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 36, або її
фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 96, або її
фрагмент;

(viii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 94, або її
фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 96, або її
фрагмент;

(ix) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 95, або її фрагмент,
і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 96, або її фрагмент.

В особливо кращому варіанті здійснення агент, що має здатність зв'язуватися з CD3, містить
наступну комбінацію варіабельної області важкого ланцюга (VH) і варіабельної області легкого
ланцюга (VL):

VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 36, або її фрагмент, і
VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 37, або її фрагмент.

У додатковому особливо кращому варіанті здійснення агент, що має здатність зв'язуватися з
CD3, містить наступну комбінацію варіабельної області важкого ланцюга (VH) і варіабельної
області легкого ланцюга (VL):

VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 94, або її фрагмент, і
VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 37, або її фрагмент.

У додатковому особливо кращому варіанті здійснення агент, що має здатність зв'язуватися з
CD3, містить наступну комбінацію варіабельної області важкого ланцюга (VH) і варіабельної
області легкого ланцюга (VL):

VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 95, або її фрагмент, і
VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 96, або її фрагмент.

Термін «фрагмент» належить, зокрема, до однієї або декількох визначаючих
комплементарність областей (CDR), переважно щонайменше варіабельної області CDR3,
варіабельної області важкого ланцюга (VH) і/або варіабельної області легкого ланцюга (VL). В
одному варіанті здійснення зазначена одна або декілька з визначаючих комплементарність
областей (CDR) вибрані з набору визначаючих комплементарність областей CDR1, CDR2 і
CDR3. В особливо кращому варіанті здійснення термін «фрагмент» належить до визначаючих
комплементарність областей CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області важкого ланцюга (VH)
і/або варіабельної області легкого ланцюга (VL).

В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент, що містить одну або декілька CDR, набір
CDR або комбінацію наборів CDR, як описано тут, містить зазначені CDR разом з
розташованими між ними каркасними областями. Переважно, частина буде також містити
щонайменше приблизно 50 % однієї із двох або обох першої й четвертої каркасних областей,
при цьому 50 % являють собою С-кінцеві 50 % першої каркасної області й N-кінцеві 50 %
четвертої каркасної області. Конструювання з'єднувальних агентів, здійснюване способами на
основі рекомбінантної ДНК, може приводити до введення N- або С-кінцевих залишків у
варіабельні області, кодованих лінкерами, уведеними для того, щоб полегшити клонування або
інші стадії обробки, включаючи введення лінкерів, щоб з'єднати варіабельні області згідно з
винаходом з додатковими послідовностями білка, включаючи важкі ланцюги імуноглобуліну,
інші варіабельні домени (наприклад при одержанні діатіл) або білкові мітки.

В одному варіанті здійснення з'єднувальний агент, що містить одну або декілька CDR, набір
CDR або комбінацію наборів CDR, як описано тут, містить зазначені CDR у людській каркасній
області.

Відповідно до винаходу кращий з'єднувальний агент, що направлено впливає на CLDN18.2,
містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 38, 39, 40 і
41 або їх варіантів.

Відповідно до винаходу наступний кращий з'єднувальний агент, що направлено впливає на
CLDN18.2, містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO:
103, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90,
91, 92 і 93, або їх фрагментів або варіантів. В одному варіанті здійснення зазначена
амінокислотна послідовність позбавлена сигналів секреції, таких як N-кінцеві сигнали секреції,
зокрема, послідовності згідно з SEQ ID NO: 51, і/або позбавлена His-міток, таких як С-кінцеві His-
мітки, зокрема, послідовності Gly-Gly-Ser-(His)₆ або (His)₆, у випадку присутності.

Відповідно до винаходу кращий з'єднувальний агент, що направлено впливає на CLDN6,
містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 42, 43, 44 і

45 або їх варіантів.

Відповідно до винаходу наступний кращий з'єднувальний агент, що направлено впливає на CLDN6, містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 101, 102, 60, 61, 62, 63, 64 і 65, або їх фрагментів або варіантів. В одному варіанті здійснення зазначена амінокислотна послідовність позбавлена сигналів секреції, таких як N-кінцеві сигнали секреції, зокрема, послідовності згідно з SEQ ID NO: 51, і/або позбавлена His-міток, таких як C-кінцеві His-мітки, зокрема, послідовності Gly-Gly-Ser-(His)₆ або (His)₆, у випадку присутності.

Слід розуміти, що з'єднувальні агенти, описані тут, можуть бути доставлені пацієнтові шляхом введення нуклеїнової кислоти, такої як РНК, що кодує агент і/або шляхом введення клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту, таку як РНК, що кодує агент. Таким чином, нуклеїнова кислота, що кодує з'єднувальний агент, при введенні пацієнтові, може бути присутня у вільній формі або в придатному носії для доставки, наприклад у формі ліпосом або вірусних часток, або в межах клітини-хазяїна. Забезпечена нуклеїнова кислота може продукувати агент протягом тривалих періодів часу пролонгованим чином, пригнічуючи нестійкість, щонайменше частково, спостережувану відносно терапевтичних антитіл, особливо біспецифічних антитіл. Нуклеїнові кислоти, що підлягають доставці пацієнтові, можуть бути отримані за допомогою рекомбінантних способів. Якщо нуклеїнову кислоту вводять пацієнтові при присутності в клітині-хазяїні, вона переважно поглинається клітинами пацієнта для експресії з'єднувального агента, кодованого нуклеїною кислотою. Якщо нуклеїнову кислоту вводять пацієнтові у випадку присутності в клітині-хазяїні, вона переважно експресується клітиною-хазяїном в організмі пацієнта таким чином, щоб продукувати з'єднувальний агент, кодований нуклеїною кислотою.

Термін «рекомбінантний» у контексті даного винаходу означає «виготовлений методом генної інженерії» Переважно, «рекомбінантний об'єкт», такий як рекомбінантна нуклеїнова кислота, у контексті даного винаходу не має природного походження.

Термін «природний», використовуваний тут, належить до того факту, що об'єкт може бути виявлений у природних умовах. Наприклад, пептид або нуклеїнова кислота, яка присутня в організмі (включаючи віруси), і яка може бути виділена із природного джерела, і не була навмисно модифікована людиною в лабораторних умовах, є природною.

Термін «нуклеїнова кислота», використовуваний тут, означає включення ДНК і РНК, таку як геномна ДНК, кДНК, мРНК, рекомбінантно отримані й хімічно синтезовані молекули. Нуклеїнова кислота може бути одонитковою або двонитковою. РНК включає транскрибовану *in vitro* РНК (IVT RNA) або синтетичну РНК.

Нуклеїнові кислоти можуть бути включені у вектор. Термін «вектор», використовуваний тут, включає будь-які вектори, відомі фахівцям в даній області, включаючи плазмідні вектори, космідні вектори, фагові вектори, такі як фаг лямбда, вірусні вектори, такі як аденовірусні або бакуловірусні вектори, або вектори на основі штучних хромосом, таких як бактеріальні штучні хромосоми (BAC), штучні хромосоми дріжджів (YAC), або штучні хромосоми на основі PI (PAC). Зазначені вектори включають експресійні, а також клонуючі вектори. Експресійні вектори містять плазмідні, а також вірусні вектори, і звичайно містять бажану кодуєчу послідовність і відповідні послідовності ДНК, необхідні для експресії функціонально зв'язаної кодуєчої послідовності в конкретному хазяїні-організмі (наприклад бактерії, дріжджі, рослина, комаха або ссавець) або в експресійних системах *in vitro*. Клонуючі вектори звичайно використовуються для створення й ампліфікації певних бажаних фрагментів ДНК і можуть бути позбавлені функціональних послідовностей, необхідних для експресії бажаних фрагментів ДНК.

У контексті даного винаходу термін «РНК» належить до молекули, яка містить рибонуклеотидні залишки й, переважно, повністю або, по суті, складається з рибонуклеотидних залишків. «Рибонуклеотид» належить до нуклеотиду, що містить гідроксильну групу в 2'-положенні β-D-рибофуранозильної групи. Термін включає дволанцюгову РНК, одностанцюгову РНК, виділену РНК, таку як частково очищена РНК, по суті, чиста РНК, синтетичну РНК, отриману рекомбінантними методами РНК, а також модифіковану РНК, яка відрізняється від природної РНК за рахунок внесення в неї добавки, делеції, заміщення й/або зміни одного або декількох нуклеотидів. Такі зміни можуть включати додавання матеріалу нуклеотидної природи, такі як добавки, що містяться на одному або обох кінцях молекули РНК або введені усередину молекули, наприклад локалізовані в одному або декількох нуклеотидах у складі РНК. Нуклеотиди в складі молекул РНК можуть також включати нестандартні нуклеотиди, такі як нуклеотиди неприродного походження, або хімічно синтезовані нуклеотиди, або дезоксинуклеотиди. Зазначені змінні РНК можуть розглядатися як аналоги або аналоги природних РНК.

Відповідно до даного винаходу термін «РНК» включає й переважно належить до «мРНК», що означає «месенджер РНК» і належить до «транскрипту», який може бути отриманий з

використанням ДНК як матриці й кодує пептид або білок. мРНК звичайно містить 5' нетрансльовану область (5'-UTR), область, що кодує білок або пептид, і 3' нетрансльовану область (3'-UTR). мРНК має обмежений час напівжиття в клітинах і *in vitro*. Переважно, мРНК одержують шляхом *in vitro* транскрипції з використанням матриці ДНК. В одному варіанті здійснення РНК отримана шляхом *in vitro* транскрипції або хімічного синтезу. Метод транскрипції *in vitro* відомий для фахівців у даній області. Наприклад, існують різні комерційно доступні набори для *in vitro* транскрипції.

В одному варіанті здійснення даного винаходу РНК є РНК, що самореплікується, такою як одноланцюгова РНК, що самореплікується. В одному варіанті здійснення РНК, що самореплікується є одноланцюговою позитивно-полярною РНК, що самореплікується. В одному варіанті здійснення РНК, що самореплікується, є вірусною РНК або РНК, отриманою з вірусної РНК. В одному варіанті здійснення РНК, що самореплікується, є альфавірусною геномною РНК або РНК, отриманою з геномів альфавірусів. В одному варіанті здійснення РНК, що самореплікується, є експресійним вектором на основі вірусних генів. В одному варіанті здійснення вірус є вірусом лісу Семліки. В одному варіанті здійснення РНК, що самореплікується, містить один або декілька трансгенів, при цьому щонайменше один із зазначених трансгенів кодує з'єднувальний агент, описаний тут. В одному варіанті здійснення, якщо РНК є вірусною РНК або отримана з вірусної РНК, трансгени можуть частково або повністю замінити вірусні послідовності, такі як вірусні послідовності, що кодують структурні білки. В одному варіанті здійснення РНК, що самореплікується, є *in vitro* транскрибованою РНК.

Геном альфавірусів є одноланцюговою позитивно-полярною РНК (ssRNA(+)), яка кодує дві відкриті рамки зчитування (ORF) для великих поліпротеїнів. ORF на 5'-кінці генома кодує неструктурні білки з nSP1 по nSP4 (nSPI-4), які транскрибуються й процесуються в РНК-залежну РНК-полімеразу (репліказу); ORF на 3'-кінці кодує структурні білки - капсид і глікопротеїни. Обидві ORF розділені так званим субгеномним промотором (SGP), який управляє транскрипцією структурної ORF. При використанні як генних векторів структурні білки, розташовані перед субгеномним промотором (SGP), звичайно замінені трансгенами. Для впакування таких векторів у вірусні частки структурні білки звичайно експресуються *in trans* з хелперних конструкцій. Реплікація альфавірусів відбувається в цитоплазмі інфікованих клітин, винятково на рівні РНК. Після інфікування геном ssRNA(+) діє як мРНК для трансляції прекурсор поліпротеїну nsP1234, який знаходиться на ранніх стадіях життєвого циклу вірусів, аутопротеолітично процесований у фрагменти nsP123 і nsP4. Фрагменти nsP123 і nsP4 формують (-)нитковий комплекс реплікази, який транскрибує (-)ниткову РНК із матриці геномної РНК. На більш пізніх стадіях поліпротеїн nsP1234 повністю розщеплюється на одиночні білки, які збираються в (+)нитковий комплекс реплікази, який синтезує нові (+)ниткові геноми, а також субгеномні транскрипти, які кодують структурні білки або трансгени. Субгеномна РНК, а також нова геномна РНК є кепованою і поліаденільованою і, таким чином, розпізнається як мРНК після інфікування клітин-мішеней. Тільки нова геномна РНК містить сигнал упакування, який забезпечує особливе впакування геномної РНК усередину, вібріонів, що брунькуються. Привабливість альфавірусних репліконів для векторології основана на позитивній орієнтації кепованого й поліаденільованого генома РНК. Трансльований реплікон РНК може бути легко синтезований *in vitro*, при цьому кеповання може бути досягнуте за допомогою кепо-аналога, доданого в реакцію транскрипції *in vitro*, і полі(A)-хвости можуть бути кодовані як сліди поліімідилової кислоти (poly-T) на плазмідних матрицях. Транскрибовані *in vitro* (IVT) реплікони трансфікують традиційними методами трансфекції й навіть низькі кількості вихідної IVT RNA швидко розмножувалися. За кілька годин після переносу трансгени, які поміщають нижче по ходу транскрипції від SGP, транскрибувалися у велику кількість копій, приблизно від 40000 до 200000 копій субгеномної РНК на клітину, таким чином, не дивно, що експресія рекомбінантних білків є високою. Залежно від певної мети, IVT реплікони можуть бути трансфіковані прямо в клітини-мішені й упаковані в альфавірусні частки з хелперними векторами, які забезпечують структурні гени *in trans*. Перенос у шкіру або м'язи приводить до високої й стійкої локальної експресії, поряд із сильною індукцією гуморальної й клітинної імунної відповіді.

Для збільшення експресії й/або стабільності РНК, використовуваної відповідно до даного винаходу, РНК може бути модифікована, переважно без зміни послідовності експресованого пептиду або білка.

Термін «модифікація» у контексті РНК, використовуваний відповідно до даного винаходу, включає будь-яку модифікацію РНК, яка природним шляхом не є присутня у зазначеній РНК.

В одному варіанті здійснення винаходу РНК, використовувана відповідно до винаходу, не містить некепованих 5'-трифосфатів. Видалення таких некепованих 5'-трифосфатів може бути досягнуте шляхом обробки РНК фосфатазою.

РНК відповідно до винаходу може бути модифікована рибонуклеотидами природного походження або синтетичними для збільшення її стабільності й/або зменшення цитотоксичності. Наприклад, в одному варіанті здійснення в РНК, використовуваної відповідно до винаходу, цитидин заміняли частково або повністю, переважно повністю, на 5-метилцитидин.

Альтернативно або додатково, в одному варіанті здійснення в РНК, використовуваної відповідно до винаходу, уридин заміняли частково або повністю, переважно повністю, на псевдоуридин.

В одному варіанті здійснення термін «модифікація» належить до забезпечення РНК із 5'-кепом або аналогом 5'-кепа. Термін «5'-кеп» належить до кеп-структури, виявленої на 5'-кінці молекули мРНК і, як правило, складається з гуанозинового нуклеотида, з'єданого із мРНК за допомогою незвичайного 5'-5' трифосфатного зв'язку. В одному варіанті здійснення цей гуанозин метильований в 7-положенні. Термін «типовий 5'-кеп» належить до 5'-кепа РНК природного походження, переважно 7-метилгуанозинового кепу (m7G). У контексті даного винаходу термін «5'-кеп» включає аналог 5'-кепа, який має подібність із кеп-структурою РНК і є модифікованим для прояву здатності стабілізувати РНК у випадку приєднання до неї, переважно *in vivo* і/або в клітині.

Забезпечення РНК 5'-кепом або аналогом 5'-кепа може бути досягнуте шляхом *in vitro* транскрипції ДНК-матриці в присутності зазначеного 5'-кепа або аналога 5'-кепа, при цьому зазначений 5'-кеп є котранскрипційно вбудованим в утворену нитку РНК, або РНК може бути утворена, наприклад, шляхом *in vitro* транскрипції, і 5'-кеп може бути прикріплений до РНК пост-транскрипційно з використанням кепуючих ферментів, наприклад кепуючих ферментів вірусу осповакцини.

РНК може містити додаткові модифікації. Наприклад, додаткова модифікація РНК, використовувана в даному винаході, може бути подовженням або вкороченням полі(А)-хвоста природного походження або зміною 5'- або 3'-нетрансльованих областей (UTR), таким як уведення UTR, яка не належить до кодуєчої області, зазначеної РНК, наприклад вставці однієї або більше, переважно двох копій 3'-UTR, отриманих з гена глобіна, такого як альфа-2-глобін, альфа-1-глобін, бета-глобін, переважно бета-глобін, більш переважно людський бета-глобін.

Таким чином, для підвищення стабільності й/або експресії РНК, використовуваної відповідно до даного винаходу, РНК може бути модифікована таким чином, щоб бути присутньою разом з послідовністю полі-А, що переважно має довжину від 10 до 500, більш переважно від 30 до 300, навіть більш переважно від 65 до 200, і особливо переважно від 100 до 150 аденозинових залишків. В особливо кращому варіанті здійснення послідовність полі-А має довжину приблизно 120 аденозинових залишків. Крім того, вбудовування двох або більш 3'-нетрансльованих областей (UTR) в 3'-нетрансльовану область молекули РНК може привести до посилення ефективності трансляції. В одному конкретному варіанті здійснення 3'-UTR отримана з гена β -глобіна людини.

Переважно, РНК при доставці, тобто трансфекції в клітину, зокрема клітину, що присутня *in vivo*, експресує білок, пептид або антиген, який вона кодує.

Термін «трансфекція» належить до введення нуклеїнових кислот, зокрема РНК, у клітину. З метою даного винаходу термін «трансфекція» також включає введення нуклеїнової кислоти в клітину або захоплення нуклеїнової кислоти такою клітиною, при цьому клітина може бути присутньою у суб'єкта, наприклад пацієнта. Таким чином, відповідно до даного винаходу, клітина, призначена для трансфекції нуклеїнової кислоти, описаної тут, може бути присутньою *in vitro* або *in vivo*, наприклад клітина може формувати частину органа, тканини й/або організму пацієнта. Відповідно до винаходу, трансфекція може бути тимчасовою або стабільною. Для деяких застосувань трансфекції досить, щоб трансфікований генетичний матеріал експресувався тільки тимчасово. Оскільки нуклеїнова кислота, уведена в процесі трансфекції, звичайно не інтегрована в ядерний геном, чужорідна нуклеїнова кислота буде розведена за допомогою мітозу або деградована. Клітини, що забезпечують епісомальну ампліфікацію нуклеїнових кислот, значно знижують швидкість розведення. Якщо бажано, щоб трансфікована нуклеїнова кислота фактично залишалася в геномі клітини і її дочірніх клітинах, повинна виникнути стабільна трансфекція. РНК може бути трансфікована в клітини для тимчасової експресії її кодованого білка.

Термін «стабільність» РНК належить до «напівжиття» РНК. «Напівжиття» належить до періоду часу, який необхідний для усунення половини активності, кількості або числа молекул. У контексті даного винаходу напівжиття РНК є показником стабільності зазначеної РНК. Напівжиття РНК може впливати на «тривалість експресії» РНК. Можна припустити, що РНК, що має довгий період напівжиття, буде експресуватися протягом більшого періоду часу.

У контексті даного винаходу термін «транскрипція» належить до процесу, у якому

генетичний код у послідовності ДНК транскрибований у РНК. Відповідно, РНК може бути трансльована в білок. Відповідно до даного винаходу, термін «транскрипція» включає «in vitro транскрипцію», при цьому термін «in vitro транскрипція» належить до процесу, у якому РНК, зокрема мРНК, є синтезованою in vitro у безклітинній системі, переважно з використанням

5 відповідних клітинних екстрактів. Переважно, клонуючі вектори застосовуються для утворення транскриптів. Ці клонуючі вектори, як правило, розроблені як транскрипційні вектори і відповідно до даного винаходу охоплені терміном «вектор».

Термін «трансляція» відповідно до винаходу належить до процесу в рибосомах клітини, за допомогою якого нитка месенджера РНК направляє складання послідовності амінокислот на

10 одержання пептиду або білка.

Термін «експресія» використовується відповідно до винаходу в найбільш загальному значенні й включає продукцію РНК і/або пептидів або білків, наприклад, шляхом транскрипції й/або трансляції. Відносно РНК, термін «експресія» або «трансляція» належить, зокрема, до продукції пептидів або білків. Зазначений термін також включає часткову експресію нуклеїнових

15 кислот. Більше того, експресія може бути тимчасовою або стабільною. Відповідно до винаходу, термін «експресія» також включає «аберантну експресію» або «аномальну експресію».

«Аберантна експресія» або «аномальна експресія» означає відповідно до винаходу, що експресія є зміненою, переважно збільшеною, у порівнянні з референсною експресією, наприклад, станом суб'єкта захворювання, що не має, пов'язаного з аберантною або

20 аномальною експресією певного білка, наприклад, пухлинного антигену. Збільшення експресії належить до збільшення щонайменше на 10 %, зокрема щонайменше на 20 %, щонайменше на 50 % або щонайменше на 100 %, або більше. В одному варіанті здійснення експресія виявляється тільки у хворій тканині, при цьому експресія в здоровій тканині є подавленою.

Термін «специфічно експресується» означає, що білок переважно експресується тільки в специфічній тканині або органі. Наприклад, пухлинний антиген, що специфічно експресується в слизовій оболонці шлунка, означає, що зазначений білок головним чином експресується в слизовій оболонці шлунка й не експресується в інших тканинах, або не експресується в значній

25 мірі в тканинах або органах інших типів. Таким чином, білок, який експресується винятково в клітинах слизової оболонки шлунка й у значно меншому ступені в будь-якій іншій тканині, такий як насінник, специфічно експресується в клітинах слизової оболонки шлунка. У деяких варіантах здійснення пухлинний антиген також може специфічно експресуватися в нормальних умовах у

30 тканині або органі більш ніж одного типу, наприклад в 2 або 3 типах тканин або органах, але переважно не більш ніж 3 різних типах тканин або органів. У цьому випадку пухлинний антиген потім специфічно експресується в цих органах. Наприклад, якщо пухлинний антиген експресується в нормальних умовах, переважно у приблизно рівному ступені в легені й шлунку, то зазначений пухлинний антиген специфічно експресується в легені й шлунку.

Відповідно до винаходу термін «кодує РНК» означає, що РНК, у випадку присутності у відповідному середовищі, переважно в межах клітини, може експресуватися із продукуванням

35 білка або пептиду, який вона кодує.

Деякі аспекти винаходу основані на адоптивному переносі клітин-хазяїв, які трансфіковані in vitro нуклеїновою кислотою, такою як РНК, що кодує з'єднувальний агент, описаний тут, і перенесені реципієнтами, таким як пацієнти, переважно, після ex vivo експансії від низького

40 числа копій прекурсор до клінічно значимої кількості клітин. Клітини-хазяїни, використовувані для лікування відповідно до винаходу, можуть бути аутологічними, алогенними або сингенними відносно реципієнта, що зазнає лікування.

Термін «аутологічний» використовується для опису будь-чого, що отримане від того самого суб'єкта. Наприклад, «аутологічний трансплантат» належить до тканини або органами, отриманих від того самого суб'єкта. Такі процедури є кращими, тому що вони долають імунологічний бар'єр, що в іншому випадку приводить до відторгнення.

50

Термін «алогенний» використовується для опису будь-чого, що отримане від різних індивідуумів однакових різновидів. Два або більше індивідуумів вважаються алогенними один одному, коли гени в одному або більше локусах не є ідентичними.

Термін «сингенний» використовується для опису будь-чого, що отримане від індивідуумів або тканин, що мають ідентичні генотипи, тобто ідентичних близнюків або тварин однакового

55 інбредного штаму, або їх тканин.

Термін «гетерологічний» використовується для опису будь-чого, що складається з безлічі різних елементів. Наприклад, перенос кісткового мозку одного індивідуума іншому індивідуумові представляє гетерологічний трансплантат. Гетерологічний ген є геном, отриманим від джерела, відмінного від суб'єкта.

60 Термін «пептид» відповідно до винаходу включає оліго- і поліпептиди, і належить до

речовин, що містять дві або більше, переважно 3 або більше, переважно 4 або більше, переважно 6 або більше, переважно 8 або більше, переважно 9 або більше, переважно 10 або більше, переважно 13 або більше, переважно 16 або більше, переважно 21 або більше і аж до переважно 8, 10, 20, 30, 40 або 50, зокрема 100 амінокислот, з'єднаних ковалентно пептидними зв'язками. Термін «білок» належить до великих пептидів, переважно пептидів, що містять більше 100 амінокислотних залишків, але, як правило, терміни «пептиди» і «білки» є синонімами й використовуються тут взаємозамінно.

Дані, представлені в даному документі відносно специфічних амінокислотних послідовностей, наприклад, наведених у переліку послідовностей, слід розглядати як стосовні також до варіантів зазначених специфічних послідовностей, що приводять до послідовностей, які є функціонально еквівалентними зазначеним специфічним послідовностям, наприклад амінокислотним послідовностям, що проявляють властивості, ідентичні або подібні із властивостями специфічних амінокислотних послідовностей. Однією важливою властивістю є збереження зв'язування з мішенню або забезпечення ефекторних функцій. Переважно, щоб послідовність, яка є варіантом стосовно визначеної послідовності, коли вона замінює певну послідовність в антитілі, зберігала зв'язування зазначеного антитіла з CLDN і/або CD3, і, переважно, функції зазначеного антитіла, описані тут, наприклад CDC-опосередкований лізис або ADCC-опосередкований лізис.

Наприклад, послідовності, представлені в переліку послідовностей, можуть бути модифіковані для видалення одного або декількох, переважно всіх вільних цистеїнових залишків, зокрема, шляхом заміни цистеїнових залишків на амінокислоти, відмінні від цистеїну, переважно серин, аланін, треонін, гліцин, тирозин, лейцин або метіонін, найбільше переважно аланін або серин. Наприклад, цистеїн у положенні 103 послідовності, представленої в SEQ ID NO: 36 переліку послідовностей, або відповідний цистеїн у послідовності, що містить зазначену послідовність, може бути, таким чином, модифікований. Інші цистеїни, які можуть бути модифіковані таким способом, являють собою цистеїни в положенні 178 в SEQ ID NO: 42, у положенні 197 в SEQ ID NO: 43, у положенні 427 в SEQ ID NO: 44 або в положенні 446 в SEQ ID NO: 45.

Фахівцям у даній області слід урахувати, що гіперваріабельні й варіабельні області послідовності CDR, зокрема, можуть бути модифіковані без втрати здатності зв'язування з CLDN і/або CD3. Наприклад, області CDR будуть ідентичні або високогомологічними областям антитіл, зазначених тут. Під «високогомологічними» передбачається, що від 1 до 5, переважно від 1 до 4, наприклад від 1 до 3, або 1 або 2 заміщення може бути зроблено в CDR. Крім того, гіперваріабельні й варіабельні області можуть бути модифіковані таким чином, що вони показують значну гомологію з областями антитіл, спеціально розкритих тут.

З метою даного винаходу «варіанти» амінокислотної послідовності включають варіанти амінокислотних вставок, варіанти амінокислотних добавок, варіанти амінокислотних делецій і/або варіанти амінокислотних заміщень. Варіанти амінокислотних делецій, які містять делецію на N-кінці й/або C-кінці білка, також називаються вкороченими варіантами на N-кінці й/або C-кінці.

Варіанти амінокислотних вставок включають вставки однієї або двох, або більше амінокислот у конкретну амінокислотну послідовність. У випадку варіантів амінокислотної послідовності, що мають вставку, один або кілька амінокислотних залишків вставлені в конкретну ділянку в амінокислотній послідовності, хоча випадкова вставка при відповідному скринінгу готового продукту також є можливою.

Варіанти амінокислотного додавання включають аміно- і/або карбокси-кінцеві злиття однієї або більше амінокислот, наприклад 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 або більше амінокислот.

Варіанти амінокислотних делецій характеризуються видаленням однієї або декількох амінокислот з послідовності, наприклад, шляхом видалення 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 або більш амінокислот. Делеції можуть бути в будь-якому положенні білка.

Варіанти амінокислотного заміщення характеризуються тим, що щонайменше один залишок у послідовності вилучений і на його місце вставлений інший залишок. Перевага віддається модифікаціям у положеннях в амінокислотній послідовності, які не є консервативними між гомологічними білками або пептидами, і/або заміні амінокислот іншими амінокислотами, що мають подібні властивості. Переважно, амінокислотні зміни в білкових варіантах являють собою консервативні амінокислотні зміни, тобто заміщення подібним чином заряджених або незаряджених амінокислот. Консервативна амінокислотна зміна включає заміщення однієї амінокислоти із сімейства амінокислот, які є родинними за своїми бічними ланцюгами. Амінокислоти природного походження, як правило, діляться на чотири сімейства: кислотні (аспартат, глутамат), основні (лізин, аргінін, гістидин), неполярні (аланін, валін, лейцин,

ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), і незаряджені полярні амінокислоти (гліцин, аспарагін, глутамін, цистеїн, серин, треонін, тирозин). Фенілаланін, триптофан і тирозин іноді класифікуються як ароматичні амінокислоти.

Переважно, ступінь подібності, переважно, ідентичність між заданою амінокислотою
5 послідовністю й амінокислотою послідовністю, яка є варіантом заданої амінокислотної послідовності, буде становити щонайменше приблизно 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %. Ступінь подібності або ідентичність, переважно, представлена для амінокислотної області, яка становить щонайменше приблизно 10 %, щонайменше приблизно 20 %,
10 щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 40 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 % або приблизно 100 % від загальної довжини референсної амінокислотної послідовності. Наприклад, якщо референсна амінокислотна послідовність складається з 200 амінокислот, ступінь подібності або ідентичність представлена, переважно,
15 для щонайменше 20, щонайменше 40, щонайменше 60, щонайменше 80, щонайменше 100, щонайменше 120, щонайменше 140, щонайменше 160, щонайменше 180 або приблизно 200 амінокислот, переважно безперервних амінокислот. У кращих варіантах здійснення ступінь подібності або ідентичність представлена для повної довжини референсної амінокислотної послідовності. Вирівнювання для визначення подібності послідовностей, переважно
20 ідентичності послідовностей, може бути виконане за допомогою відомих у даній області інструментів, переважно, з використанням оптимального вирівнювання послідовностей, наприклад з використанням Align, з використанням стандартних налаштувань, переважно EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

«Подібність послідовностей» указує процентний вміст амінокислот, які є ідентичним або які
25 представляють консервативні амінокислотні заміщення. «Ідентичність послідовностей» між двома амінокислотними послідовностями вказує процентний вміст амінокислот, які ідентичні між послідовностями.

Термін «відсоток ідентичності» призначений для позначення відсотка ідентичних амінокислотних залишків між обома порівнюваними послідовностями, отриманого після
30 оптимального вирівнювання, при цьому цей відсоток є винятково статистичним і відмінності між обома послідовностями розподілені випадковим чином і по всій їхній довжині. Порівняння двох амінокислотних послідовностей традиційно проводять, порівнюючи ці послідовності після вирівнювання їх оптимальним чином, при цьому зазначене порівняння може бути проведене за допомогою порівняння сегментів або з використанням «вікна порівняння» для ідентифікації й
35 порівняння локальних областей подібності послідовності. Оптимальне вирівнювання послідовностей для їхнього порівняння може бути здійснене також і вручну із застосуванням алгоритму локальної гомології Smith і Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, із застосуванням алгоритму локальної гомології Neddleman і Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, із застосуванням аналогічного способу пошуку Pearson і Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, або із
40 застосуванням пакетів комп'ютерних програм, що використовують ці алгоритми (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N і TFASTA у пакеті програм Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

Відсоток ідентичності розраховують, визначаючи число ідентичних положень, загальних для двох порівнюваних послідовностей, і роблячи розподіл цього числа на загальне число положень
45 у вікні порівняння, і роблячи множення отриманого результату на 100 для одержання відсотка ідентичності між обома цими послідовностями.

З'єднувальні агенти за винаходом можуть бути отримані внутрішньоклітинно (наприклад у цитозолі, периплазмі або тільцях включення) і потім виділені із клітин-хазяїв і необов'язково додатково очищені; або вони можуть бути отримані позаклітинно (наприклад у середовищі, у
50 якому клітини-хазяїни вирощуються) і потім виділені з культурального середовища й необов'язково додатково очищені. Способи й реагенти, використовувані для одержання рекомбінантних поліпептидів, такі як специфічні придатні експресійні вектори, методи трансформації або трансфекції, селективні маркери, способи індукції експресії білка, умови вирощування й таке інше, є відомими в даній області. Аналогічно, технології виділення й
55 очищення добре відомі фахівцям у даній області.

Термін «клітина» або «клітина-хазяїн» переважно належить до інтактної клітини, тобто клітини з інтактною мембраною, яка не вивільняє свої нормальні внутрішньоклітинні компоненти, такі як ферменти, органели або генетичний матеріал. Інтактна клітина переважно є життєздатною клітиною, тобто живою клітиною, здатною виконувати свої нормальні метаболічні
60 функції. Переважно, зазначений термін належить відповідно до винаходу до будь-якої клітини,

яка може бути трансфікована екзогенною нуклеїновою кислотою. Переважно, щоб клітина при трансфекції екзогенною нуклеїновою кислотою й переносі реципієнтові могла експресувати нуклеїнову кислоту в реципієнта. Термін «клітина» включає бактеріальну клітину; інші придатні клітини являють собою клітини дріжджів, клітини грибів або клітини ссавців. Придатні

5 бактеріальні клітини включають клітини від грамнегативних штамів бактерій, таких як штам *Escherichia coli*, *Proteus* і *Pseudomonas*, і грампозитивні штам бактерій, такі як штам *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* і *Lactococcus*. Придатні клітини грибів включають клітини від різновидів *Trichoderma*, *Neurospora* і *Aspergillus*. Придатні клітини дріжджів включають клітини від видів *Saccharomyces* (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (наприклад, *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (наприклад, *Pichia pastoris* і *Pichia methanolic*) і *Hansenula*. Придатні клітини ссавців включають, наприклад, клітини CHO, клітини BHK, клітини Hela, клітини COS, 293 HEK і таке інше. Однак клітини земноводних, клітини комах, клітини рослин і будь-які інші клітини, використовувані в даній області для експресії гетерологічних білків, також можуть бути використані. Клітини ссавців є особливо бажаними для адаптивного

10 переносу, такі як клітини від людини, мишей, хом'яків, свиней, овець і приматів. Клітини можуть бути отримані з різноманітних типів тканин і включають первинні клітини й клітинні лінії, такі як клітини імунної системи, зокрема, антигенпредставляючі клітини, такі як дендритні клітини й Т-клітини, стовбурні клітини, такі як гематопоетичні стовбурні клітини й мезенхімальні стовбурні клітини, і інші типи клітин. Антигенпредставляюча клітина являє собою клітину, яка представляє

20 антиген за допомогою його зв'язування з головним комплексом гістосумісності на своїй поверхні. Т-клітини можуть розпізнавати цей комплекс із використанням свого Т-клітинного рецептора (TCR).

Термін «скорочувати», «зменшувати» або «інгібувати», використовуваний тут, означає загальне зменшення або здатність викликати загальне зменшення краще на 5 % або більше, на 10 % або більше, на 20 % або більше, більш переважно на 50 % або більше, і найбільше переважно на 75 % або більше рівня експресії або рівня проліферації клітин.

Терміни, такі як «збільшує» або «підсилює», переважно, належать до збільшення або посилення приблизно, щонайменше на 10 %, переважно щонайменше на 20 %, переважно щонайменше на 30 %, більш переважно щонайменше на 40 %, більш переважно щонайменше на 50 %, навіть більш переважно щонайменше на 80 %, і найбільше переважно щонайменше на 100 %, щонайменше на 200 %, щонайменше на 500 %, щонайменше на 1000 %, щонайменше на 10000 %, або навіть більше.

Антитіло-залежна клітинно-опосередкована цитотоксичність

ADCC описує здатність ефекторних клітин, зокрема лімфоцитів, знищувати клітини, що

35 переважно вимагає мічення клітини-мішені антитілом.

ADCC переважно виникає, коли антитіла зв'язуються з антигенами на пухлинних клітинах і домени Fc антитіла зв'язуються з Fc-рецепторами (FcR) на поверхні імунних ефекторних клітин. Ідентифіковано кілька сімейств Fc-рецепторів, і специфічні клітинні популяції характерним чином експресують певні Fc-рецептори. ADCC може розглядатися як механізм прямої індукції мінливого ступеня негайної деструкції пухлини, що приводить до презентації антигену й індукції пухлиноспрямованих Т-клітинних відповідей. Переважно, індукція ADCC *in vivo* буде приводити до пухлиноспрямованих Т-клітинних відповідей і гуморальних імунних відповідей організма-хазяїна.

Комплементзалежна цитотоксичність

Комплементзалежна цитотоксичність (CDC) є іншим способом знищення клітин, який може

45 направлятися антитілами. IgM є найбільш ефективним ізотипом для активації комплементу. Обидва, IgG1 і IgG3, також є ефективними відносно направлення CDC класичним шляхом активації системи комплементу. Переважно, у цьому каскаді, утворення комплексів антиген-антитіло приводить до появи безлічі ділянок зв'язування C1q у безпосередній близькості на доменах Cn2 молекул антитіла, що беруть участь, таких як молекули IgG (C1q є одним із трьох субкомпонентів комплементу C1). Переважно, ці з'єднувальні ділянки C1q переводять раніше

50 низькоафінні взаємодії C1q-IgG у взаємодії з високою авидністю, які запускають каскад подій, у які залучені серії інших білків комплементу, і приводять до протеолітичного вивільнення хемотаксичних/активуючих агентів, C3a і C5a. Переважно, каскад комплементу закінчується

55 утворенням мембраноатакуючого комплексу, який створює пори в клітинній мембрані, що сприяють вільному проходженню води й розчинених речовин усередину й назовні клітини.

Антитіла, описані тут, наприклад для забезпечення областей VL і VH, можуть бути отримані з використанням безлічі відомих технологій, таких як стандартна технологія гібридизації соматичних клітин Kohler і Milstein, Nature 256: 495 (1975). Хоча процедури гібридизації

60 соматичних клітин є кращими, у принципі можуть бути використані інші технології одержання

моноклональних антитіл, наприклад, трансформація В-лімфоцитів вірусами або онкогенами, або технологія представлення на фагах з використанням бібліотек генів антитіл.

Кращою тваринною системою одержання гібридом, які продукують моноклональні антитіла, є мишача система. Одержання гібридами з використанням мишей добре відоме в даній області. Протоколи й технології виділення імунізованих спленоцитів для злиття відомі в даній області. Партнери злиття (наприклад клітини мишачої мієломи) і методи злиття також відомі.

Іншими кращими тваринними системами для одержання гібридом, які продукують моноклональні антитіла, є щурячі й кролячі системи (наприклад описані в Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348 (1995), дивися також Rossi et al., Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)).

У ще іншому кращому варіанті здійснення людські моноклональні антитіла можуть бути отримані з використанням трансгенних або трансхромосомних мишей, що несуть частини людської імунної системи, а не мишачої системи. Ці трансгенні й трансхромосомні миші включають мишей, відомих як миші HuMAB і миші KM, відповідно, і спільно називаються тут як «трансгенні миші». Продукція людських антитіл у таких трансгенних мишах може бути виконана, як описано докладно для CD20 в WO2004 035607.

Ще однієї стратегією створення моноклональних антитіл є безпосереднє виділення генів, що кодують антитіла, з лімфоцитів, продукуючих антитіла певної специфічності, наприклад, дивися Babcock et al., 1996; нова стратегія створення моноклональних антитіл з одиночних виділених лімфоцитів, продукуючих антитіла певних специфічностей. Для більш докладної інформації щодо конструювання рекомбінантного антитіла дивися, також, Welschof і Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8 і Benny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1.

Для генерації антитіл мишей можна імунізувати кон'югованими з носієм пептидами, отриманими з послідовності антигену, тобто послідовності, проти якої повинні бути спрямовані антитіла, збагаченим препаратом рекомбінантно експресованого антигену або його фрагментів, і/або клітинами, експресуючими антиген, як описано. Альтернативно, миші можуть бути імунізовані ДНК, що кодує антиген або його фрагменти. У випадку, коли імунізації з використанням очищеного або збагаченого препарату антигену не приводять до утворення антитіл, мишей можна також імунізувати клітинами, експресуючими антиген, наприклад клітинною лінією, з метою стимуляції імунних відповідей.

Імунна відповідь може бути піддана моніторингу в ході протоколу імунізації з використанням зразків плазми й сироватки, одержуваних при відборі крові із хвостової вени або ретроорбітальної вени. Миші з достатніми титрами імуноглобуліну можуть бути використані для злиттів. Мишам проводять бустерну імунізацію шляхом інтраперитонеального або внутрішньовенного введення антиген-експресуючих клітин за 3 дні до забиття й видалення селезінки для збільшення рівня секретуючих специфічні антитіла гібридом.

Для одержання гібридом, продукуючих моноклональні антитіла, спленоцити й клітини лімфатичних вузлів імунізованої миші можуть бути виділені й злиті з підходящою іморталізованою клітинною лінією, такою як клітинна лінія мишачої мієломи. Потім проводять скринінг отриманих гібридом на продукцію антиген-специфічних антитіл. Потім проводять скринінг окремих лунок за допомогою ELISA на гібридоми, секретуючі антитіла. Шляхом імунофлуоресценції й аналізу FACS з використанням антиген-експресуючих клітин, антитіла зі специфічністю до антигену можуть бути ідентифіковані. Гібридами, секретуючі антитіла, можуть бути повторно висіяні, знову піддані скринінгу й, якщо вони залишаються позитивними відносно моноклональних антитіл, їх субклонують шляхом обмежуючого розведення. Потім стабільні субклони культивують *in vitro* у середовищі для культур тканин з метою одержання антитіла для характеристики.

Антитіла також можна одержати в трансфектомі клітини-хазяїна при використанні, наприклад, комбінації технологій рекомбінантної ДНК і способів трансфекції гена, як це добре відомо в даній області (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Наприклад, в одному варіанті здійснення ген, що представляє інтерес(и), наприклад гени антитіла, може бути лігований в експресійний вектор, такий як еукаріотична експресійна плазміда, така як використовують у системі експресії гена GS, описаній в публікаціях WO 87/04462, WO 89/01036 і EP 338 841, або інших експресійних системах, добре відомих з рівня техніки. Очищену плазмідну із клонованими генами антитіла вводять в еукаріотичні клітини-хазяї, наприклад клітини CHO, клітини NS/O, клітини HEK 293T або клітини HEK293, або, альтернативно, в інші еукаріотичні клітини, наприклад клітини, виділені з рослин, грибів або дріжджів. Спосіб, використовуваний для введення даних генів, може бути представлений способами, описаними в даній області, такими як електропорація, використання ліпофектаміна,

або іншими способами. Після введення даних генів антитіл у клітини-хазяї можна ідентифікувати й селекувати клітини, які експресують антитіло. Дані клітини представляють собою трансфектоми, які потім можуть бути розмножені на основі рівня експресії й масштабовані для одержання антитіл. Із супернатантів і/або клітин даних культур можна

виділити й очистити рекомбінантні антитіла.

Альтернативно, дані клоновані гени антитіл можна експресувати в інших експресійних системах, включаючи прокаріотичні клітини, такі як мікроорганізми, наприклад *E. coli*. Крім того, антитіла можуть бути отримані з використанням трансгенних тварин, що не належать до людини, наприклад у молоці овець і пацюків або в курячих яйцях, або в трансгенних рослинах; дивися, наприклад, Verma, R., et al. (1998) *J. Immunol. Meth.* 216: 165-181 ; Pollock, et al. (1999) *J. Immunol. Meth.* 231 : 147-157; і Fischer, R., et al. (1999) *Biol. Chem.* 380: 825-839.

Химеризація

Немічені мишачі антитіла є високоімуногенними в людини при повторюванні застосуванні, приводячи до зниження терапевтичного ефекту. Основна імуногенність опосередкована константними областями важкого ланцюга. Імуногенність мишачих антитіл у людини може бути знижена або повністю усунута, якщо відповідні антитіла є химеризованими або гуманізованими. Химерні антитіла являють собою антитіла, різні частини яких отримані за допомогою різних видів тварин, наприклад такі, де варіабельна область є антитіло миші, а константна область – імуноглобулін людини. Химеризація антитіл досягається шляхом з'єднання варіабельних областей важкого й легкого ланцюга мишачого антитіла з константною областю людського важкого й легкого ланцюга (наприклад як описано Kraus et al., в *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). У кращому варіанті здійснення химерні антитіла отримані шляхом з'єднання людської константної області каппа-легкого ланцюга з мишачою варіабельною областю легкого ланцюга. У також кращому варіанті здійснення химерні антитіла можуть бути отримані шляхом з'єднання людської константної області лямбда-легкого ланцюга з мишачою варіабельною областю легкого ланцюга. Кращі константні області важкого ланцюга для створення химерних антитіл являють собою IgG1, IgG3 і IgG4. Інші кращі константні області важкого ланцюга для створення химерних антитіл представляють собою IgG2, IgA, IgD і IgM.

Гуманізація

Антитіла взаємодіють із антигенами-мішенями в основному за допомогою амінокислотних залишків, які знаходяться у шести гіперваріабельних ділянках (CDR) легкого й важкого ланцюгів. Із цієї причини амінокислотні послідовності усередині CDR є більш різноманітними серед окремих антитіл, ніж послідовності поза CDR. Оскільки послідовності CDR відповідають за більшість взаємодій антитіла й антигену, можна експресувати рекомбінантні антитіла, які імітують властивості специфічних природних антитіл шляхом конструювання експресійних векторів, які включають послідовності CDR зі специфічного природного антитіла, привиті на каркасні послідовності з іншого антитіла з іншими властивостями (дивися, наприклад, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321 : 522-525; і Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 10029-10033). Дані каркасні послідовності можуть бути отримані із загальнодоступних баз даних ДНК, які включають послідовності генів антитіл зародкової лінії. Дані послідовності зародкової лінії будуть відрізнятися від послідовностей генів зрілого антитіла, оскільки вони не будуть включати повністю зібрані варіабельні гени, які формуються шляхом зв'язування V (D) J у процесі дозрівання В-клітин. Послідовності генів зародкової лінії також будуть відрізнятися від послідовностей високоафінного антитіла із вторинного репертуару характерним рівномірним розташуванням у варіабельній області.

Здатність антитіл і інших з'єднувальних агентів зв'язуватися з антигеном може бути визначена з використанням стандартних аналізів зв'язування (наприклад ELISA, Вестерн блотинг, імуофлуоресценція й аналіз методом проточної цитометрії).

Для очищення антитіл відібрані отримані від виробника клітинні лінії можна вирощувати у дволітрових ролерних колбах для очищення рекомбінантного антитіла. Альтернативно, антитіла можуть бути отримані за допомогою діалізу в біореакторах. Перед проведенням афінної хроматографії з використанням білка L-сефарози супернатанти можуть бути відфільтровані й, за потреби, концентровані. Елюований IgG може бути перевірений за допомогою гель-електрофореза й високоефективної рідинної хроматографії для гарантії чистоти. Після заміни буферного розчину на PBS концентрацію можна визначити за OD280 з використанням відповідного коефіцієнта інстинкції. Рекомбінантні антитіла можуть бути розділені на аліквоти і можуть зберігатися при -80 °C.

Для демонстрації зв'язування моноклональних антитіл з живими клітинами, експресуючими

антиген, можна використовувати проточну цитометрію. Клітинні лінії, які експресують природно або після трансфекції антиген і негативні контролю, позбавлені експресії антигену (вирощені в умовах стандартного росту), можна змішати з різними концентраціями моноклональних антитіл у супернатантах гібридами або в PBS, що містить 1 % FBS, і інкубувати при 4 °C протягом 30 хв.

Після промивання проводять реакцію анти-IgG антитіла, міченого APC або Alexa647, з антиген-зв'язаним моноклональним антитілом у тих же умовах, що для фарбування первинного антитіла. Зразки можна аналізувати методом проточної цитометрії за допомогою обладнання FACS, з використанням характеристик світла й бічного розсіювання дискримінаційного вікна для окремих клітин. Для відмінності антиген-специфічних моноклональних антитіл від неспецифічних зв'язуючих в одному вимірюванні, може бути використаний спосіб котрансфекції. Клітини, тимчасово трансфіковані плазмідами, що кодують антиген, і флуоресцентні маркери фарбують, як описано вище. Трансфіковані клітини можуть бути детектовані в каналах флуоресценції, відмінних від пофарбованих антитілом клітин. Тому що більша частина трансфікованих клітин експресує обидва трансгени, антиген-специфічні моноклональні антитіла зв'язуються переважно із клітинами, експресуючими флуоресцентний маркер, тоді як неспецифічні антитіла зв'язуються в порівняльному співвідношенні з нетрансфікованими клітинами. На додаток або замість проточного цитометричного аналізу може бути використаний альтернативний спосіб аналізу з використанням флуоресцентної мікроскопії. Клітини фарбують так, як описано вище, і досліджують за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Для демонстрації зв'язування моноклональних антитіл з живими клітинами, експресуючими антиген, може бути використаний аналіз методом імунофлуоресцентної мікроскопії. Наприклад, клітинні лінії, які експресують або спонтанно або після трансфекції антиген, і негативні контролю, позбавлені експресії антигену, вирощують на предметних склах у стандартних умовах росту в середовищі DMEM/F12, доповненої 10 % фетальною бичачою сироваткою (FCS), 2 mM L-глутаміну, 100 ОД/мл пеніциліну й 100 мкг/мл стрептоміцину. Клітини потім фіксують метанолом або параформальдегідом, або залишають неопрацьованими. Потім проводять реакцію клітин з моноклональними антитілами проти антигену протягом 30 хв при 25 °C. Після промивання проводять реакцію клітин з міченим Alexa555 вторинним антимишачим IgG антитілом (Molecular Probes) у тих же самих умовах. Потім клітини досліджують за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Клітинні екстракти клітин, експресуючих антиген, і відповідних негативних контролів готують і піддають електрофорезу на натрій додецил сульфат-поліакриламідному гелі (SDS). Після електрофорезу розділені антигени переносять на нітроцелюлозні мембрани, блокують і зондують тестованими моноклональними антитілами. Зв'язування IgG можна детектувати із використанням антимишачого IgG, кон'югованого з пероксидазою, і проявляти за допомогою субстрату ECL.

Антитіла можуть бути додатково тестовані на взаємодію з антигеном методами імуногістохімії, добре відомими фахівцям в даній області, наприклад, з використанням фіксованих параформальдегідом або ацетоном криозрізів, або поміщених у парафін зрізів тканин, фіксованих параформальдегідом, отриманих зі зразків неракової тканини або ракової тканини від пацієнта під час звичайних хірургічних процедур, або від мишей, що несуть привиті пухлини, інокульовані клітинними лініями, експресуючими спонтанно або після трансфекції антиген. Для імунофарбування антитіла, реакційноздатні відносно антигену, можуть бути інкубовані з козячим антимишачими або козячими антикролячими антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрину (DAKO) відповідно до інструкцій виробника.

Передклінічні дослідження

З'єднувальні агенти, описані тут, також можуть бути тестовані в моделі *in vivo*, наприклад, на імунодефіцитній миші, що несе ксенотрансплантовані пухлини, інокульовані клітинними лініями, експресуючими CLDN, для визначення їх ефективності відносно контролю росту CLDN-експресуючих пухлинних клітин.

Дослідження *in vivo* після ксенотрансплантації CLDN-експресуючих пухлинних клітин імунокомпромітованим мишам або іншим тваринам можуть бути проведені з використанням з'єднувальних агентів, описаних тут. З'єднувальні агенти можуть бути введені мишам, що не мають пухлини, з наступною ін'єкцією пухлинних клітин для вимірювання ефектів з'єднувальних агентів відносно запобігання формуванню пухлин або пов'язаних з пухлиною симптомів. З'єднувальні агенти можуть бути введені несучим пухлину мишам для визначення терапевтичної ефективності відповідних з'єднувальних агентів відносно зменшення росту пухлини, метастазів або пов'язаних з пухлиною симптомів. Застосування з'єднувальних агентів може бути об'єднане із застосуванням інших речовин, таких як цитостатичні лікарські засоби, інгібітори фактора росту, блокатори клітинного циклу, інгібітори антігенеза або антитіла, для

визначення синергічної ефективності й потенційної токсичності комбінацій. Для аналізу токсичних побічних ефектів, опосередкованих з'єднувальними агентами, тварини можуть бути інокульовані з'єднувальними агентами або контрольними реагентами й ретельно досліджені відносно симптомів, можливо пов'язаних з терапією CLDN-з'єднувальним агентом.

5 Картування епітопів, які розпізнали з'єднувальні агенти, може бути виконане як описано докладно в «Epitope Mapping Protocols» (Methods in Molecular Biology) by Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 і в «Epitope Mapping: A Practical Approach» Practical Approach Series, 248 by Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay.

10 Сполуки й агенти, описані тут, можуть бути введені у формі будь-якої підходящої фармацевтичної композиції.

Фармацевтичні композиції за винаходом є переважно стерильними й містять ефективну кількість з'єднувальних агентів, описаних тут, і необов'язково додаткові агенти, описані тут, для досягнення бажаної реакції або бажаного ефекту.

15 Фармацевтичні композиції звичайно представлені у вигляді стандартної лікарської форми й можуть бути приготовлені способами, відомими в даній області. Фармацевтична композиція може, наприклад, знаходитися у формі розчину або суспензії.

20 Фармацевтична композиція може містити солі, буферні речовини, консерванти, носії, розріджувачі й/або допоміжні речовини, усі з яких переважно є фармацевтично прийнятними. Термін «фармацевтично прийнятний» належить до нетоксичності матеріалу, який не перешкоджає дії активного компонента фармацевтичної композиції.

25 Солі, що не є фармацевтично прийнятними, можуть бути використані для приготування фармацевтично прийнятних солей і включені у винахід. Фармацевтично прийнятні солі цього виду включають, але без обмеження, солі, отримані з наступних кислот: соляна, бромистоводнева, сірчана, азотна, фосфорна, малеїнова, оцтова, саліцилова, лимонна, мурашина, маленова, бурштинова кислоти, і т.п. Фармацевтично прийнятні солі можуть бути також приготовлені у вигляді солей лужних металів або солей лужноземельних металів, таких як солі натрію, солі калію або солі кальцію.

30 Буферні речовини, що придатні для використання у фармацевтичній композиції, включають оцтову кислоту у вигляді солі, лимонну кислоту у вигляді солі, борну кислоту у вигляді солі й фосфорну кислоту у вигляді солі.

Консерванти, що придатні для використання у фармацевтичній композиції, включають бензалконію хлорид, хлорбутанол, парабен і тімерозал.

Ін'єктована лікарська форма може містити фармацевтично прийнятну допоміжну речовину, таку як лактат Рінгера.

35 Термін «носій» належить до органічного або неорганічного компонента природного або синтетичного походження, з яким об'єднаний активний компонент для сприяння, посилення або забезпечення можливості застосування. Відповідно до винаходу термін «носій» також включає одну або більше сумісних твердих або рідких наповнювачів, розріджувачів або інкапсулюючих речовин, які є придатними для введення пацієнтові.

40 Можливі речовини носія для парентерального введення являють собою, наприклад, стерильну воду, розчин Рінгера, лактат Рінгера, стерильний розчин хлориду натрію, поліалкіленгліколи, гідровані нафталіни й, зокрема, біосумісні лактидні полімери, співполімери лактиду/гліколіду або співполімери поліоксіетилену/поліоксипропілену.

45 Термін «допоміжна речовина», використовуваний тут, означає всі речовини, які можуть бути присутніми у фармацевтичній композиції й не є активними інгредієнтами, такі як, наприклад, носії, зв'язуючі, лубриканти, загущувачі, поверхнево-активні речовини, консерванти, емульгатори, буфери, смакові агенти й барвники.

50 Агенти й композиції, описані тут, можна вводити будь-яким звичайним способом, таким як парентеральне введення, включаючи ін'єкцію або інфузію. Переважно, введення є парентеральним введенням, наприклад, внутрішньовенним, внутрішньартеріальним, підшкірним, інтрадермальним або внутрішньом'язовим.

55 Композиції, що придатні для парентерального введення, звичайно містять стерильний водний або неводний препарат активної сполуки, який переважно є ізотонічним стосовно крові реципієнта. Прикладами сумісних носіїв і розчинників є розчин Рінгера й ізотонічний розчин хлориду натрію. Крім того, звичайно стерильні нелеткі масла використовуються як розчин або суспензійне середовище.

60 Агенти й композиції, описані тут, вводять в ефективних кількостях. «Ефективна кількість» належить до кількості, яка досягає бажаної реакції або бажаного ефекту, окремо або разом з додатковими дозами. При лікуванні конкретного захворювання або конкретного стану, бажана реакція переважно належить до інгібування плинного захворювання. Це включає вповільнення

прогресування захворювання й, зокрема, перериванню або зміні напрямку розвитку захворювання. Бажана реакція при лікуванні захворювання або стану може також являти собою затримку або попередження початку розвитку зазначеного захворювання або зазначеного стану.

Ефективна кількість агента або композиції, описаної тут, буде залежати від стану, що підлягає лікуванню, вазі захворювання, індивідуальних параметрів пацієнта, включаючи вік, фізіологічний стан, розмір і вага, тривалості лікування, типу супровідної терапії (у випадку присутності), конкретного шляху введення й подібних факторів. Відповідним чином, дози агентів, що вводяться, описаних тут, можуть залежати від цих різних параметрів. У випадку, якщо реакція в пацієнта недостатня після введення початкової дози, можуть бути введені більш високі дози (або, фактично, більш високі дози досягаються іншим, більш локалізованим способом уведення).

Агенти й композиції, описані тут, можуть бути введені пацієнтами, наприклад, *in vivo*, для лікування або попередження різних порушень, таких як описані тут порушення. Кращі пацієнти включають пацієнтів-людей, що мають порушення, які можуть бути скоректовані або ослаблені шляхом уведення агентів і композицій, описаних тут. Це включає порушення, у які залучені клітини, що характеризуються зміненою картиною експресії CLDN, такого як CLDN18.2 і/або CLDN6.

Наприклад, в одному варіанті здійснення агенти, описані тут, можуть бути використані для лікування пацієнта з раковим захворюванням, наприклад раковим захворюванням, описаним тут, що характеризується присутністю ракових клітин, експресуючих CLDN.

Фармацевтичні композиції й способи лікування, описані відповідно до винаходу, можуть бути також використані для імунізації або вакцинації для попередження захворювання, описаного тут.

Фармацевтична композиція за винаходом може бути введена разом з додатковими посилюючими імунітет речовинами, такими як один або декілька ад'ювантів, і може містити одну або кілька підвищуючих імунітет речовин для додаткового збільшення їх ефективності, переважно, для досягнення синергічного ефекту імуностимуляції. Термін «ад'ювант» належить до сполук, які продовжують або підсилюють, або прискорюють імунну відповідь. Різні механізми можливі щодо цього залежно від різних типів ад'ювантів. Наприклад, сполуки, які забезпечують можливість дозрівання DC, наприклад ліпополісахариди або ліганд CD40, утворюють перший клас підходящих ад'ювантів. Як правило, будь-який агент, який впливає на імунну систему типу «сигнал небезпеки» (LPS, GP96, dsRNA і т.д.), або цитокіни, такі як GM-CSF, може бути використаний як ад'ювант, який забезпечує можливість посилення імунної відповіді й/або вплив на імунну відповідь контрольованим чином. Олігодеоксинуклеотиди можуть необов'язково використовуватися в цьому випадку, хоча їх побічні ефекти, які виникають при певних обставинах, як зазначено вище, підлягають уточненню. Особливо кращі ад'юванти являють собою цитокіни, такі як монокіни, лімфокіни, інтерлейкіни або хемокіни, наприклад IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, INF α , INF γ , GM-CSF, LT- α , або фактори росту, наприклад hGH. Наступні відомі ад'юванти являють собою гідроксид алюмінію, ад'ювант Фрейнда або олію, таку як Montanide®, найбільше переважно Montanide® ISA51. Ліпопептиди, такі як Pam3Cys, також є придатними для використання як ад'ювантів у фармацевтичній композиції за даним винаходом.

Агенти й композиції, забезпечені тут, можуть застосовуватися окремо або в комбінації із традиційними формами лікування, такими як хірургія, опромінення, хіміотерапія й/або трансплантація кісткового мозку (аутологічна, сингенна, алогенна або неспоріднена).

Лікування раку представляє область, у якій комбіновані стратегії є особливо бажаними, оскільки часто об'єднана дія двох, трьох, чотирьох або навіть більше протиракових лікарських засобів/терапій створює синергічні ефекти, які є більш сильними в порівнянні з ефектами при монотерапевтичному підході. Таким чином, в іншому варіанті здійснення даного винаходу лікування раку, у якому використовуються основані на імунітеті або вакцинуванні механізми, такі як способи й фармацевтичні композиції за даним винаходом, можуть бути ефективно об'єднані з різними іншими лікарськими засобами й/або способами, що мають подібний або інший механізм спрямованого впливу. У їхнє число входять, наприклад, комбінації із традиційними терапіями пухлин, стратегії мультиепітопів, додаткова імунотерапія й лікувальні підходи, що направлено впливають на ангіогенез або апоптоз (для огляду дивися, наприклад, Andersen et al. 2008: Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies. Cancer Immunology Immunotherapy, 57(11): 1735-1743.). Послідовне введення різних агентів може інгібувати ріст ракових клітин у різні моменти часу, тоді як інші агенти можуть, наприклад, інгібувати неоангіогенез, виживаність злоякісних клітин або метастазів, потенційно переводячи рак у

хронічне захворювання. Наступний перелік представляє деякі необмежуючі приклади протиракових лікарських засобів і терапій, які можуть бути використані в комбінації з даним винаходом:

1. Хіміотерапія

Хіміотерапія є стандартом лікування безлічі типів раку. Найпоширеніші хіміотерапевтичні агенти діють шляхом знищення клітин, які швидко діляться, що є одним з основних особливостей ракових клітин. Таким чином, комбінування із загальновизнаними хіміотерапевтичними лікарськими засобами, такими як, наприклад, алкілюючі агенти, антиметаболіти, антрацикліни, алкалоїди рослин, інгібітори топоізомерази й інші протипухлинні агенти, які впливають на клітинний поділ або синтез ДНК, може значно поліпшити терапевтичні ефекти за даним винаходом шляхом очищення супресорних клітин, відновлення імунної системи шляхом наділення пухлинних клітин більшою сприйнятливостю до імунозумовленого знищення, або шляхом додаткової активації клітин імунної системи. Синергічна протиракова дія хіміотерапевтичних і основаних на вакцинуванні імунотерапевтичних лікарських засобів було продемонстровано в багатьох дослідженнях (дивися, наприклад, Quoix et al. 2011: Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial. *Lancet Oncol.* 12(12): 1125-33.; дивися також Liseth et al. 2010: Combination of intensive chemotherapy and anticancer vaccines in the treatment of human malignancies: the hematological experience. *J Biomed Biotechnol.* 2010: 6920979; дивися також Hirooka et al 2009: A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 38(3): e69-74). Існують сотні доступних хіміотерапевтичних засобів, які в основному придатні для комбінованої терапії. Деякими (необмежуючі) прикладами хіміотерапевтичних лікарських засобів, які можна застосовувати в комбінації з даним винаходом, є карбоплатин (параплатин), цисплатин (платинол, платинол-AQ), циклофосфамід (цитоксан, неозар), доцетаксел (таксотер), доксорубіцин (адриаміцин), ерлотиніб (тарцева), етопозид (вепезид), фторурацил (5-FU), гемцитабін (гемзар), іматиніба мезилат (глібек), іринотекан (камптозар), метотрексат (фолекс, мексат, аметоптерин), паклітаксел (таксол, абраксан), сорафініб (нексавар), сунитиніб (сутент), топотекан (гікамтин), вінкрестин (онковін, вінказар PFS), і вінбластин (велбан).

2. Хірургія

Хірургія раку – операція з видалення пухлини – залишається основою для лікування раку. Хірургія може бути комбінована з іншими терапіями раку для видалення будь-яких, що залишилися пухлинних клітин. Комбінування хірургічних способів з наступним імунотерапевтичним лікуванням є багатообіцяючим підходом, який був неодноразово продемонстрований.

3. Опромінення

Радіаційна терапія залишається важливим компонентом у лікуванні раку, при цьому приблизно 50 % усіх ракових пацієнтів одержують радіаційну терапію в процесі їх захворювання. Основною метою радіаційної терапії є позбавлення ракових клітин їх потенціалу до розмноження (клітинний поділ). Типи опромінення, використовувані для лікування раку, яляють собою опромінення фотонами (рентгенівські промені й гама промені) і опромінення частками (електронні, фотонні й нейтронні пучки). Існує два способи доставки випромінювання в місце локалізації злоякісної пухлини. Опромінення зовнішнім пучком доставляється від джерел, розташованих поза організмом шляхом націлювання високоенергетичних променів (фотонів, протонів або опромінення частками) у місце локалізації пухлини. Внутрішнє опромінення або брахітерапія доставляється від радіоактивних джерел, розташованих поза організмом, розміщується в герметичні катетери, або вводиться безпосередньо в ділянку пухлини. Методи променевої терапії, які можна застосовувати в комбінації з даним винаходом, представляють собою фракціонування (сеанси променевої терапії в режимі фракціонування, наприклад, щоденні фракції від 1,5 до 3 Гр протягом декількох тижнів), 3 D-конформну променеву терапію (3DCRT; доставка випромінювання в макроскопічний обсяг пухлини), променеву терапію з модульованою інтенсивністю (IMRT; комп'ютеризоване модулювання інтенсивності пучків променів), променеву терапію під візуальним контролем (IGRT; метод, що складається в створенні зображень через короткі проміжки часу в ході сеансу променевої терапії, що дозволяє робити коректування), і стереотаксична радіотерапія (SRBT, доставляє дуже високі дози випромінювання лише за декілька фракцій). Для огляду променевої терапії дивися Baskar et al. 2012: Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int. J Med Sci.* 9(3): 193-199.

4. Антитіла

Антитіла (переважно моноклональні антитіла) досягають свого терапевтичного ефекту

проти ракових клітин за допомогою різних механізмів. Антитіла можуть мати безпосередній вплив на апоптоз або програмовану загибель клітин. Антитіла можуть блокувати компоненти шляхів сигнальної трансдукції, такі як, наприклад, рецептори факторів росту, ефективно пригнічуючи проліферацію пухлинних клітин. У клітинах, які експресують моноклональні антитіла, вони можуть сприяти утворенню антиідіотипових антитіл. Непрямі ефекти включають рекрутинг клітин, які мають цитотоксичність, таких як моноцити й макрофаги. Цей тип опосередкованої антитілом загибелі клітин називається антитілозалежна клітинно-опосередкована цитотоксичність (ADCC). Антитіла також зв'язують комплемент, що приводить до прямої клітинної токсичності, відомої як комплемент-залежна цитотоксичність (CDC). Комбінування хірургічних методів з імунотерапевтичними лікарськими засобами й методами є успішним підходом, як продемонстровано, наприклад, в Gadri et al. 2009: Synergistic effect of dendritic cell vaccination and anti-Cd20 antibody treatment in the therapy of murine lymphoma. *J Immunother.* 32(4): 333-40. Наступний перелік забезпечує деякі необмежуючі приклади протиракових антитіл і потенційних мішеней антитіл (у дужках), які можна застосовувати в комбінації з даним винаходом: абаговумаб (CA-125), абциксимаб (CD41), адекватумаб (Ерсат), афутуумаб (CD20), алацизумаб пегол (VEGFR2), алтумомаб пентетат (CEA), аматуксимаб (Morab-009), анатумомаб мафенатокс (TAG-72), аполізумаб (HLA-DR), арцитумомаб (CEA), бавитуксимаб (фосфатидилсерин), бектумомаб (CD22), белімунаб (BAFF), бевацизумаб (VEGF-A), біватузумаб мертанзин (CD44 v6), блінатумомаб (CD19), брентуксимаб ведотин (CD30 TNFRSF8), кантузумаб мертанзин (муцин Canag), кантузумаб равтанзин (MUC1), капромаб пендетид (клітини карциноми передміхурової залози), карлумаб (CNT0888), катумаксомаб (Ерсат, CD3), цетуксимаб (EGFR), цитатузумаб богатокс (Ерсат), циксутумумаб (рецептор IGF-1), клаудиксимаб (клаудин), кліватузумаб тетракетан (MUC1), конатумумаб (TRAIL-R2), дацетузумаб (CD40), долатузумаб (рецептор інсулінподібного фактора росту I), деносунаб (RANKL), детумомаб (клітини В-лімфоми), дрозитунаб (DR5), екротексимаб (гангліозид GD3), едрекломаб (Ерсат), елотузумаб (SLAMF7), енаватузумаб (PDL192), енситуксимаб (NPC-1 C), епратузумаб (CD22), ертумаксомаб (HER2/neu, CD3), етарацизумаб (інтегрин $\alpha\upsilon\beta 3$), фарлетузумаб (фолатний рецептор 1), FBTA05 (CD20), фіклатузумаб (SCH 900105), фігітумумаб (IGF-1 рецептор), фланвотумаб (глікопротеїн 75), фрезолімунаб (TGF- β), галіксимаб (CD80), ганітумаб (IGF-I), гемтузумаб озогаміцин (CD33), гевокизумаб (IL-1 β), гірентуксимаб (карбоангідраза 9 (CA-IX)), глембатумумаб ведотин (GPNMB), ібритумомаб тіуксетан (CD20), ікрукумаб (VEGFR-1), іговома (CA-125), індатуксимаб равтанзин (SDC1), інтетумумаб (CD51), інотузумаб озогаміцин (CD22), іпілімунаб (CD 152), іратумумаб (CD30), лабетузумаб (CEA), лексатумумаб (TRAIL-R2), лібівірумаб (поверхневий антиген гепатиту В), лінтузумаб (CD33), лорвотузумаб мертанзин (CD56), лукатумумаб (CD40), луміліксимаб (CD23), мапатумумаб (TRAIL-R1), матузумаб (EGFR), меполізумаб (IL-5), мілатузумаб (CD74), мітумомаб (GD3 гангліозид), могамулізумаб (CCR4), моксетумомаб пасудотокс (CD22), наколомаб тафенатокс (антиген C242), наптумомаб естафенатокс (5T4), нарнатумаб (RON), нецитумумаб (EGFR), німотузумаб (EGFR), ніволумаб (IgG4), офатумумаб (CD20), оларатумаб (PDGF-R α), онартузумаб (кіназа рецептора фактора росту гепатоцитів людини), опортузумаб монатокс (Ерсат), ореговумаб (CA-125), окселумаб (OX-40), панітумумаб (EGFR), патритумаб (HER3), пемтумома (MUC1), пертузумаб (HER2/neu), пінтумомаб (антиген аденокарциноми), притумумаб (віментин), пакотумомаб (N-гліколілнейрамінова кислота), радретумаб (екстра домен В фібронектину), рафівірумаб (глікопротеїн вірусу сказу), рамуципунаб (VEGFR2), рилотумумаб (HGF), ритуксимаб (CD20), робатумумаб (рецептор IGF-1), самализумаб (CD200), сібротузумаб (FAP), сілтуксимаб (IL-6), табалумаб (BAFF), такатузумаб тетраксетан (альфа-фетопропротеїн), таплітумомаб паптокс (CD 19), тенатумомаб (тенасцин С), тепротумумаб (CD221), тицилимумаб (CTLA-4), тігатузумаб (TRAIL-R2), TNX-650 (IL-13), тозітумомаб (CD20), трастузумаб (HER2/neu), TRBS07 (GD2), тремелімунаб (CTLA-4), тукотузумаб целмолейкін (Ерсат), ублітуксимаб (MS4A1), урелумаб (4-1BB), волоциксимаб (інтегрин $\alpha 5\beta 1$), вотумумаб (пухлинний антиген STAA16.88), залутумумаб (EGFR), занолімунаб (CD4).

5. Цитокини, хемокини, коstimуляторні молекули, білки злиття

Комбіноване використання антиген-кодуючих фармацевтичних композицій за даним винаходом із цитокинами, хемокинами, коstimуляторними молекулами й/або їх білками злиття для викликання сприятливого імунного модулювання або ефектів інгібування пухлини є іншим варіантом здійснення даного винаходу. Для збільшення інфільтрації імунних клітин у пухлині й сприяння руху антиген-презентуючих клітин у дренажальні пухлину лімфатичні вузли можуть бути використані різні хемокини зі структурами С, СС, СХС і СХ3С. Деякими із самих багатообіцяючих хемокинів є, наприклад, CCR7 і його ліганди CCL19 і CCL21, крім того, CCL2, CCL3, CCL5 і CCL16. Іншими прикладами є CXCR4, CXCR7 і CXCL12. Крім того, можна

застосовувати костимуляторні або регуляторні молекули, такі як, наприклад, ліганди B7 (B7.1 і B7.2). Також, можна застосовувати інші цитокіни, такі як, наприклад, інтерлейкіни (наприклад від IL-1 до IL17), інтерферони (наприклад від *lfnalpa1* до *lfnalpa8*, *lfnalpa10*, *lfnalpa13*, *lfnalpa14*, *lfnalpa16*, *lfnalpa17*, *lfnalpa21*, *lfnbeta1*, IFNW, IFNE1 і IFNK), гематопоетичні фактори, TGF (наприклад TGF- α , TGF- β і інші члени сімейства TGF) і, нарешті, рецептор сімейства фактора некрозу пухлин і його ліганди, а також інші стимуляторні молекули, що містять, але без обмеження, 4-1BB, 4-1BB-L, CD 137, CD137L, CTLA-4GITR, GITRL, Fas, Fas-L, TNFR1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, p75NGF-R, DR6, LT.beta.R, RANK, EDAR1, XEDAR, Fnl I4, Troy/Trade, TAJ, TNFR11, HVEM, CD27, CD30, CD40, 4- 1BB, OX40, GITR, GITRL, TACI, BAFF-R, BCMA, RELT і CD95 (Fas/APO-1), глюкокортикоїд-індуковані TNFR-зв'язані білки, TNF рецептор-зв'язаний апоптоз-опосередковуючий білок (TRAMP) і рецептор клітинної загибелі-6 (DR6)., CD40/CD40L і OX40/OX40L є особливо важливими мішенями для комбінованої імунотерапії завдяки їхньому прямому впливу на Т-клітинну виживаність і проліферацію. Для огляду дивися Lechner et al. 2011: Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. Immunotherapy 3 (11), 1317-1340.

6. Бактеріальні терапії

Дослідники використовували анаеробні бактерії, такі як *Clostridium novyi*, для поглинання внутрішньої частини бідних киснем пухлин. Бактерії потім гинуть при контакті з оксигенованими сторонами пухлини, що означає, що вони не будуть впливати на інший організм. Іншою стратегією є використання анаеробних бактерій, які були трансформовані ферментом, який може перетворювати нетоксичні проліки в токсичний лікарський засіб. При проліферації бактерій у некротичних і гіпоксичних областях пухлини фермент експресується тільки в пухлині. Таким чином, системно застосовувані проліки метаболізуються в токсичний лікарський засіб тільки в пухлині. Це було продемонстровано як ефективне з непатогенними анаеробними спорогенами *Clostridium*.

7. Інгібітори кінази

Інша більша група потенційних мішеней для комплементарної терапії раку включає інгібітори кіназ, тому що ріст і виживаність ракових клітин тісно пов'язана з розрегулюванням кіназної активності. Для відновлення нормальної кіназної активності й, отже, зменшення росту пухлини застосовують широкий ряд інгібіторів. Група цільових кіназ включає рецепторні тирозинкінази, наприклад, BCR-ABL, B-Raf, EGFR, HER-2/Erbb2, IGF-IR, PDGFR- α , PDGFR- β , c-kit, Flt-4, Flt3, FGFR1, FGFR3, FGFR4, CSF1R, c-met, RON, c-ret, ALK, цитоплазматичні тирозинкінази, наприклад, c-src, c-yes, Abl, JAK-2, серин/треонінкінази, наприклад, ATM, Aurora A & B, Cdk5, mtor, Pkci, Plks, b-raf, S6K, STK1 1/LKB1 і ліпідні кінази, наприклад, PI3K, SK1. Низькомолекулярні інгібітори кіназ представляють собою, наприклад, PHA-739358, нілотиніб, дазатиніб і PD166326, NSC 743411, лапатиніб (GW-572016), канертиніб (CI-1033), семаксиніб (SU5416), ваталаніб (PTK787/ZK222584), сутент (SU1 1248), сорафеніб (BAY 43-9006) і лєфлуномід (SU101). Для додаткової інформації дивися, наприклад, Zhang et al. 2009: Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. Nature Reviews Cancer 9, 28-39.

8. Toll-подібні рецептори

Члени сімейства Toll-подібних рецепторів (TLRs) є ключовим з'єднанням між уродженим і адаптивним імунітетом, і ефект багатьох ад'ювантів оснований на активації TLR. Велика кількість розроблених вакцин проти раку включає ліганди для TLR8, для викликання відповідей на вакцини. Крім TLR2, TLR3, TLR4, особливо TLR7 і TLR 8 досліджували відносно терапії раку в пасивних імунотерапевтичних підходах. Близькоспоріднені TLR7 і TLR8 сприяють протипухлинним відповідям шляхом впливу на клітини імунної системи, пухлинні клітини й мікрооточення пухлини, і можуть бути активовані структурами нуклеозидних аналогів. Усі TLR застосовуються як окремі імунотерапевтичні засоби або ад'юванти протиракових вакцин і можуть бути синергічно комбіновані з лікарськими формами й способами за даним винаходом. Для більш докладної інформації дивися van Duin et al. 2005: Triggering TLR signaling in vaccination. Trends in Immunology, 27(1):49-55.

9. Інгібітори ангіогенеза

Додатково до терапій, які направлено впливають на імунні модуляторні рецептори, що знаходяться під впливом пухлиноопосередкованих механізмів вислизання й імунної супресії, існують терапії, які направлено впливають на оточення пухлини. Інгібітори ангіогенеза запобігають надлишковому росту кровоносних судин (ангіогенез), які потрібні пухлинам для виживання. Ангіогенез, стимульований пухлинними клітинами для задоволення їх зростаючих потреб у поживних речовинах і кисні, може бути блокований шляхом спрямованого впливу на різні молекули. Необмежуючі приклади ангіогенез-опосередкованих молекул або інгібіторів ангіогенеза, які можуть бути комбіновані з даним винаходом, включають розчинний VEGF

(VEGF, ізоформи VEGF121 і VEGF165, рецептори VEGFR1, VEGFR2 і корецептори нейроплін-1 і нейроплін-2) 1 і NRP-1, ангіопоетин 2, TSP-1 і TSP-2, ангіостатин і споріднені молекули, ендостатин, вазостатин, калретикулін, тромбоцитарний фактор-4, TIMP і CD41, Meth-1 і Meth-2, IFN- α , - β і - γ , CXCL10, IL-4, -12 і -18, протромбін (крингл-домен 2), фрагмент антитромбіну III, пролактин, VEGI, SPARC, остеопонтин, маспін, канстатин, проліферин-зв'язаний білок, рестин і лікарські засоби, такі як наприклад, бевацизумаб, ітраконазол, карбоксиамідотриазол, TNP-470, CM101, IFN- α , тромбоцитарний фактор-4, сурамін, SU5416, тромбоспондин, антагоністи VEGFR, ангіостатичні стероїди + гепарин, інгібуючі фактори ангіогенезу в хрящовій тканині, інгібітори матричної металопротеїнази, 2-метоксіестрадіол, текогалан, тетратиомолібдат, талідомід, тромбоспондин, інгібітори пролактину $\alpha\beta 3$, ліномід, препарат «tasquinimod». Для огляду дивися Schoenfeld і Dranoff 2011: Anti-angiogenesis immunotherapy. Hum Vaccin. (9):976-81.

10. Низькомолекулярні лікарські засоби таргетної терапії

У цілому, низькомолекулярні лікарські засоби таргетної терапії являють собою інгібітори доменів ферментів на мутованих, надекспресованих або іншим способом важливих білках у раковій клітині. Відомими й необмежуваними прикладами є інгібітори тирозинкінази іматиніб (Gleevec/Glivec) і гефінініб (Iressa). Використання малих молекул, наприклад сунитинібу малату й/або сорафенібу тозилату, що направлено впливають на деякі кінази, у комбінації з вакцинами для терапії раку, також описане в більш ранній заявці на патент US2009004213.

11. Вакцини на основі вірусів

Існує ряд протиракових вакцин на основі вірусів, доступних або, що знаходяться на стадії розробки, які можна застосовувати в комбінованому терапевтичному підході разом з лікарськими формами за даним винаходом. Однією перевагою використання таких вірусних векторів є їхня вроджена здатність ініціювати імунні відповіді, при цьому запальні реакції, що виникають у результаті вірусної інфекції, створюють сигнал небезпеки, необхідний для імунної активації. Ідеальний вірусний вектор повинен бути безпечним і не повинен приводити до антивекторної імунної відповіді для того, щоб забезпечити можливість бустер-імунізації протипухлинних специфічних відповідей. Рекombінантні віруси, такі як вірус осповакцини, віруси простого герпеса, аденовіруси, аденоасоційовані віруси, ретровіруси й віруси роду Avіroх використовували у тваринних пухлинних моделях і на основі їх обнадійливих результатів були ініційовані клінічні дослідження на людині. Особливо важливими вакцинами на основі вірусів є вірусоподібні частки (VLP), малі частки, які містять певні білки із зовнішньої оболонки вірусу. Вірусоподібні частки не містять якого-небудь генетичного матеріалу вірусу й не можуть викликати інфекцію, але вони можуть бути сконструйовані для представлення пухлинних антигенів на своїй оболонці. VLP можуть бути отримані з різних вірусів, таких як, наприклад, вірус гепатиту В або інші сімейства вірусів, включаючи Parvoviridae (наприклад аденоасоційований вірус), Retroviridae (наприклад, ВІЛ) і Flaviviridae (наприклад, вірус гепатиту С). Для загального огляду дивися Sorensen і Thompson 2007: Virus-based immunotherapy of cancer: what do we know and where are we going? APMIS 115(11):177-93; вірусоподібні частки проти раку описані в Buonaguro et al. 2011: Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer. Expert Rev Vaccines 10(11):1569-83; і в Guillen et al. 2010: Virus-like particles as vaccine antigens and adjuvants: application to chronic disease, cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies. Procedia in Vaccinology 2 (2), 128-133.

12. Стратегії на основі мультиепітопів

Використання мультиепітопів показало багатообіцяючі результати відносно вакцинації. Технології швидкого секвенування в комбінації із системами інтелектуального алгоритму дозволяють використовувати мутаному пухлини й можуть забезпечити мультиепітопи для індивідуальних вакцин, які можуть бути комбіновані з даним винаходом. Для більш докладної інформації дивися 2007: Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides. J Immunother 30: 762-772; додатково, Castle et al. 2012: Exploiting the mutanome for tumor vaccination. Cancer Res 72 (5): 1081-91.

13. Адоптивне Т-клітинне перенесення

Наприклад, комбінація вакцинації пухлинного антигену й Т-клітинного перенесення описана в: Rapoport et al. 2011: Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination on the basis of htert and survivin after ASCT for myeloma. Blood 117(3):788-97.

14. Таргетні терапії на основі пептидів

Пептиди можуть зв'язуватися з рецепторами клітинної поверхні або впливати на позаклітинний матрикс, що оточує пухлину. Радіонукліди, які прикріплені до цих пептидів (наприклад RGD) у підсумку вбивають ракові клітини, якщо нуклід руйнується близько клітини. Оліго- або мультимери цих з'єднувальних мотивів становлять особливий інтерес, тому що це

може привести до підвищення пухлинної специфічності й авидності. Для огляду необмежуваних прикладів дивися Yamada 2011: Peptide-based cancer vaccine therapy for prostate cancer, bladder cancer, and malignant glioma. *Nihon Rinsho* 69(9): 1657-61.

15. Інші терапії

Існує ряд інших терапій раку, які можуть бути комбіновані з лікарськими формами й способами за даним винаходом для створення синергічних ефектів. Необмежуваними прикладами є терапії, спрямовані на апоптоз, гіпертермію, гормональну терапію, терапію тіломеразою, потенційовану інсулінову терапію, генну терапію й фотодинамічну терапію.

Даний винахід додатково проілюстрований наступними прикладами, які не повинні розглядатися як обмежуючі обсяг винаходу.

Приклади

Приклад 1: Створення й тестування біспецифічних з'єднувальних агентів, що направлено впливають на CLDN18.2 і CD3

а. Походження послідовності, дизайн конструкцій bi-scFv і клонування в експресійні вектори

Готовили конструкції тандемного біспецифічного одноланцюгового антитіла (bi-scFv), що містять з'єднувальні домени, специфічні відносно компонента CD3 людського Т-клітинного рецептора й людських пухлиноасоційованих антигенів (TAA). Відповідні варіабельні області важкого ланцюга (VH) і відповідні варіабельні області легкого ланцюга (VL) для кожної конструкції специфічно розташовані в напрямку від N- до C-кінця в наступному порядку:

N - VHaCLDN^{18.2} - VLαCLDN^{18.2} - VHaCD³ - VLαCD^{3-C} (1BiMAB, 18PHU5, no.11-15)

N - VHaCD³ - VLαCD³ - VHaCLDN^{18.2} - VLαCLDN^{18.2-C} (18PHU3, no.16-20)

У таблиці 1 представлені всі конструкції bi-scFv, специфічні відносно TAA CLDN18.2 і PLAC1, які були створені в рамках винаходу. Конструкції bi-scFv були створені шляхом генного синтезу Geneart AG (Geneart/Life Technologies GmbH, Regensburg, Germany) з використанням послідовностей VH і VL відповідних антитіл. Оптимізації кодонів, таких як Homo sapiens (HS), Mus musculus (MM) або клітини яєчника китайського хом'ячка (Chinese Hamster Ovary, CHO) були реалізовані за допомогою програмного забезпечення GeneArt's GeneOptimizer®, і перераховано в таблиці 1. Інформація зі специфічності, походження послідовності з моноклональних антитіл (MAB), використання кодонів, додаткових відмінних рис послідовностей і посилення на всі, що застосовуються домени узагальнено в таблиці 2. Походження послідовностей варіабельного домена відповідних антитіл CD3 наведено в таблиці 2. Завдяки високій гомології людських і мишачих TAA, однакові послідовності VH і VL анти-TAA можуть бути використані для створення конструкцій bi-scFv для тестів на мишах, але в комбінації з послідовностями VH, VL клону 145-2C1 мишачого специфічного анти-CD3 антитіла.

Клонування ДНК і конструювання експресійного вектора проводили згідно зі стандартними процедурами (Green/Sambrook, Molecular Cloning, 2012), добре відомими фахівцем у даній області. Коротко, основні ДНК-послідовності bi-scFv містили сайти рестрикції 5' HindIII і 3' XhoI (HindIII і XbaI у випадку 1BiMAB bi-scFv) для клонування в експресійні плазміди. Послідовність сигналу секреції вводили на 5'-кінці (вище) послідовності bi-scFv для секреції білка із клітинної цитоплазми в культуральне середовище. Послідовність, що кодує гнучкий гліцин-сериновий пептидний лінкер, що складається з 15-18 амінокислот, вставляли для з'єднання доменів VH і VL для композиції одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіла (scFv), з яких один зв'язується з CD3 і інший з TAA. Для формування біспецифічного одноланцюгового антитіла послідовності двох доменів scFv з'єднували послідовністю, що кодує короткий пептидний лінкер (GGGGS). Разом із цією послідовністю лінкера сайт рестрикції BamHI вводили для обмінів доменів scFv для клонування наступних конструкцій bi-scFv. Зокрема, 5' scFv-домени можуть бути замінені на сайти рестрикції HindIII і BamHI і 3' scFv-домени на рестрикцію BamHI і XhoI. Схему конструкції дивися також на фігурі 1.

Усі використовувані конструкції антитіла bi-scFv клонували в стандартний експресійний вектор ссавця pcDNATM3.1/мус-His (+) (Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). C-кінцева 6 xHis-мітка може бути використана для метал-афінного очищення білка й аналізів на виявлення. Усі конструкції підтверджували шляхом секвенування через сервіс по секвенуванню одиночних прочитань (MWG single read sequence service) (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany).

Таблиця 1

Короткий опис конструкцій біспецифічних одноланцюгових антитіл, специфічних до ТАА і CD3

Внутрішнє найменування	ТАА	Специфічність	5'-VH-VL	3'-VH-VL	Використання кодонів
1B1MAB	CLDN18.2	людина	mCLDN18.2ab	TR66	HS
no.11	CLDN18.2	миша	mCLDN18.2ab	145-2C11	CHO
no.12	CLDN18.2	людина	mCLDN18.2ab	UCHT1-HU	CHO
no.13	CLDN18.2	людина	mCLDN18.2ab	UCHT1	CHO
no.14	CLDN18.2	людина	mCLDN18.2ab	CLB-T3	CHO
no.15	CLDN18.2	людина	mCLDN18.2ab	TR66	CHO
no.16	CLDN18.2	миша	145-2C11	mCLDN18.2ab	CHO
no.17	CLDN18.2	людина	UCHT1-HU	mCLDN18.2ab	CHO
no.18	CLDN18.2	людина	UCHT1	mCLDN18.2ab	CHO
no.19	CLDN18.2	людина	CLB-T3	mCLDN18.2ab	CHO
no.20	CLDN18.2	людина	TR66	mCLDN18.2ab	CHO
18PHU5	CLDN18.2	людина	mCLDN18.2ab	TR66	HS
18PHU3	CLDN18.2	людина	TR66	mCLDN18.2ab	HS
18PMU5	CLDN18.2	миша	mCLDN18.2ab	145-2C11	MM
18PMU3	CLDN18.2	миша	145-2C11	mCLDN18.2ab	MM
контрольне bi-scFv					
no.35	PLAC1	людина	78H11	TR66	CHO

CHO, клітини яєчника китайського хом'ячка; HS, Homo-sapiens; HU, гуманізоване; MM, Mus

Таблиця 2

Коротка інформація з конструкцій bi-scFv

з'єднувальний фрагмент CD3			з'єднувальний фрагмент TAA					
Внутр. найм.	Походж. mab	Реактивн різновидн.	TAA	Походж. mab.	Реактивн. Різновидн.	5'-VH-VL	3'-VH-VL	Короткий лінкер
1Bimab	TR66	Людина	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	mcldn18.2ab	TR66	GGGGS
no.11	145-2C11	миша	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	mcldn18.2ab	145-2C11	SGGGGS
no.12	UCHT1-HU	Людина	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	mcldn18.2ab	UCHT1-HU	SGGGGS
no.13	UCHT1	Людина	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	mcldn18.2ab	UCHT1	SGGGGS
no.14	CLB-T3	Людина	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	mcldn18.2ab	CLB-T3	SGGGGS
no.15	TR66	Людина	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	mcldn18.2ab	TR66	SGGGGS
no.16	145-2C11	миша	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	145-2C11	mcldn18.2ab	SGGGGS
no.17	UCHT1-HU	Людина	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	UCHT1-HU	mcldn18.2ab	SGGGGS
no.18	UCHT1	Людина	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	UCHT1	mcldn18.2ab	SGGGGS
no.19	CLB-T3	Людина	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	CLB-T3	mcldn18.2ab	SGGGGS
no.20	TR66	Людина	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	TR66	mcldn18.2ab	SGGGGS
18PHU5	TR66	Людина	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	mcldn18.2ab	TR66	SGGGGS
18PHU3	TR66	Людина	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	TR66	mcldn18.2ab	SGGGGS
18PMU5	145-2C11	миша	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	mcldn18.2ab	145-2C11	SGGGGS
18PMU3	145-2C11	миша	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	145-2C11	mcldn18.2ab	SGGGGS
no.35	TR66	Людина	PLAC1	78H11	людина, миша	78H11	TR66	SGGGGS

Продовження Таблица 2

Внутр. Най-мен...	5'-довгий лінкер	3'-довгий лінкер	Сигнал секреції	Викор. Кодонів	Анти-CD3 mab посилання
1Bimab	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
no.11	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	CHO	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
no.12	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	CHO	Shalaby et al., J Exp Med 1992
no.13	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	CHO	Beverley et al., Eur J Immunol 1981
no.14	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	CHO	Van Lier et al., Immunology 1989
no.15	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
no.16	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVLTCLKGIQG	CHO	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
no.17	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	CHO	Shalaby et al., J Exp Med 1992
no.18	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVLTCLKGIQG	CHO	Beverley et al., Eur J Immunol 1981
no.19	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNFGLSLIFLALILKGVQC	CHO	Van Lier et al., Immunology 1989
no.20	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MEWSWIFLFLSVTTGVHS	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
18PHU ₅	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
18PHU ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
18PMU ₅	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVATATGVHS	MM	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
18PMU ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVLTCLKGIQG	MM	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
no.35	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWLWNLLFLMAAAQSAQA	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987

CHO означає клітини яєчника китайського хом'ячка; HS, Homo-sapiens; MAB, моноклональне антитіло; MM, Mus musculus; TAA, пухлиноасоційований антиген.

5 б. Генерація стабільних клітинних ліній-продуцентів

Для генерації стабільних клонів клітин-продуцентів CLDN18.2-специфічних білків bi-scFv використовували клітинну лінію ембріональних нирок людини HEK293 (ATCC CRL-1573) і клітинну лінію яєчника китайського хом'ячка CHO-K1 (ATCC CCL-61).

Трансфекція HEK293

10 1×10^7 клітин HEK293 засівали за два дні до трансфекції на чашки Петрі 14,5 см в 20 мл повного середовища DMEM (DMEM/F-12 GlutaMax, доповненого 10 % термоінактивованої FBS і

0,5 % пеніциліну-стрептоміцину; усі реагенти від фірми Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). Перед трансфекцією клітини промивали фосфатно-сольовим буфером Дульбекко (DPBS), доповненим 2 мМ EDTA, потім додавали 20 мл чистого середовища DMEM без додавання FBS або антибіотиків. 20 мкг лінеаризованої ДНК конструкцій, описаних у прикладі 1, розбавляли в 0,5 мл чистого середовища DMEM/F-12. 75 мкл розчину лінійного PEI при концентрації 1 мг/мл (поліетиленімін; Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany) додавали в розведену ДНК і енергійно перемішували на вортексі. Через 15 хв. інкубації за кімнатної температури (RT) у клітини краплями додавали комплекси ДНК/PEI, чашки для клітинних культур обережно перемішували обертовим рухом і потім інкубували при 37 °C, 5 % CO₂. Через 24 год після трансфекції середовище міняли. Відбір трансфікованих клітин починали через 48 год після трансфекції за допомогою сульфату G418 (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) у кінцевій концентрації 0,8 мг/мл. G418 безупинно додавали в культуральне середовище для вирощування клітин.

Трансфекція CHO-K1

1 × 10⁶ клітин CHO-K1 засівали за день до трансфекції в 6-лункові тканинні культуральні планшети в 2 мл повного середовища DMEM (DMEM/F-12 Glutamax, доповненого 10 % термоінактивованої FBS, без антибіотиків; усі реагенти від фірми Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). Перед трансфекцією клітини промивали DPBS, доповненим 2 мМ EDTA, потім додавали 1,5 мл звичайного середовища DMEM без додавання FCS або антибіотиків. 4 мкг лінеаризованої ДНК конструкцій, описаних у прикладі 1.a, розбавляли в 0,25 мл звичайного середовища DMEM/F-12 і обережно перемішували. У другій реакційній пробірці 2,5 мкл ліпофектаміна 2000 (Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) розбавляли в 0,25 мл звичайного середовища DMEM/F-12, обережно перемішували й інкубували протягом 5 хв. за кімнатної температури (RT). Суміш ДНК і суміш ліпофектаміна поєднували в співвідношенні 1:1, обережно перемішували й інкубували протягом 20 хв. за кімнатної температури (RT). У клітини краплями додавали комплекси ДНК/ліпофектамін 2000, чашки для клітинних культур обережно перемішували обертовим рухом і потім інкубували при 37 °C, 5 % CO₂. Через 6 год після трансфекції середовище заміняли повним середовищем DMEM/F-12. Клітини розщеплювали наступного дня в співвідношенні 1:10. Відбір трансфікованих клітин починали через 48 год після трансфекції за допомогою сульфату G418 (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) у кінцевій концентрації 0,5 мг/мл. G418 безупинно додавали в культуральне середовище для вирощування клітин.

с. Відбір HEK293 як клітин-продуцентів

Експресію білків bi-scFv стабільно трансфікованими клітинними лініями HEK293 і CHO-1, описаними в прикладі 1.b, характеризували за допомогою імуофлуоресцентного фарбування для детекції експресії bi-scFv згідно зі стандартними процедурами (Current Protocols in Immunology, 2012). Коротко, 2 × 10⁵ клітин вирощували на предметних склах протягом 24 год і потім пермеабілізували 2 % PFA. DPBS, доповнений 5 % BSA і 0,2 % сапоніном, використовували як блокувальний буфер. Після промивання за допомогою DPBS і блокування за допомогою блокувального буфера клітини інкубували з первинним антитілом Anti-his Epitope-Tag (Dianova GmbH, Hamburg, Germany) у розведенні 1:500 у блокувальному буфері протягом 30 хв. при RT. Після відмивання блокувальним буфером додавали вторинне кон'юговане з Cy3 козяче антимишаче IgG (H+L) антитіло (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, England) у розведенні 1:500 у блокувальному буфері й інкубували протягом 3 год при RT. Після промивання блокувальним буфером і H₂O клітини занурювали в DAKO-закріплююче середовище (Dako, Carpinteria, CA, USA), доповнене барвником Hoechst 33342 (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Зрізи досліджували й робили знімки за допомогою флуоресцентного мікроскопа Nikon-Eclipse Ti для виявлення присутності bi-scFv-позитивних клітин (дані не показані). Клітини HEK293 показали кращу загальну експресію білків bi-scFv у порівнянні із клітинами CHO-K1 і, таким чином, були відібрані як клітинна лінія-продуцента.

d. Продукція й детекція білка 1BiMAB bi-scFv за допомогою клону #28 HEK293

1BiMAB bi-scFv був відібраний як перший білок bi-scFv, який підлягає одержанню, очищенню й використанню для проведення різних аналізів. Для цієї мети клональні клітинні лінії всіх клітин HEK293, стабільно експресуючих 1BiMAB (дивися Приклад 1.b), одержували шляхом сортиру окремих клітин з використанням клітинного сортера FACS Aria cell sorter (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Після розмноження близько 40 клональних ліній кращий клон-продуцент був відібраний за допомогою імуофлуоресценції, як описано в Прикладі 1.c.

Відібраний клон-продуцент #28 розмножували й культивували в 10-шаровій клітинній фабриці (Nunc, Roskilde, Denmark) у середовищі DMEM/F-12 Glutamax, доповненому 10 % FBS, 0,5 % пеніциліну-стрептоміцину й 0,8 мг/мл G418 (усі реагенти від фірми Gibco/Life Technologies

Gmbh, Darmstadt, Germany) відповідно до інструкцій виробника. На конфлюентній стадії клітини промивали DPBS і середовище заміняли на DMEM/F-12 з антибіотиками, але без FBS. Клітинний супернатант, що містить білок 1BiMAB bi-scFv, збирали кожні 3-5 днів протягом 4 тижнів. Супернатант фільтрували за допомогою 500 мл Steritor Filter Units (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) і зберігали при 4 °C до FPLC-очищення.

Перед FPLC-очищенням присутність bi-scFv у супернатанте клітинної культури тестували шляхом електрофореза на поліакриламідному гелі з наступним фарбуванням кумаси й вестерн-блот-аналізом, виконуваним стандартним способом (Current Protocols in Protein Science, 2012). Супернатант концентрували 5x - 10x за допомогою обладнань Centricon Centrifugal Filter Devices -10K MWCO (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) відповідно до протоколу виробника. Концентровані й неконцентровані супернатанти розділяли на Nupage Novex 4 – 12 % Bis-Tris Gels (Invitrogen/Life Technologies Gmbh, Darmstadt, Germany). Потім гелі фарбували розчином кумаси брильянтового синім згідно зі стандартними процедурами для детекції білка 1BiMAB bi-scFv у діапазоні від 50 до 60 kD і інших білків, що містяться в супернатанті клітинної культури. Вестерн-блот-аналіз виконували для специфічної детекції білка 1BiMAB bi-scFv за допомогою його 6xHis-мітки. Коротко, після блотинга білків на PVDF мембрані й блокування за допомогою PBST/3% сухого молока мембрану інкубували протягом 1 год при 4 °C з первинним антитілом Anti-His Epitope-Tag (Dianova Gmbh, Hamburg, Germany) у розведенні 1:500 у блокувальному буфері. Після промивання блокувальним буфером мембрану інкубували з Fc-специфічним вторинним козячим-антимишачим IgG антитілом, кон'югованим з пероксидазою (Sigma Aldrich, Germany), у розведенні 1:10000 у блокувальному буфері протягом 1 год при 4 °C. Після промивання блокувальним буфером сигнали визуалізували за допомогою Supersignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) і записували за допомогою Imagequant LAS 4000 Imager (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany). Сигнали bi-scFv детектували в діапазоні від 50 до 60 kD у порівнянні із внутрішніми стандартами молекулярної маси (дивися фігуру 3 A і B).

е. Очищення й кількісне визначення білка 1BiMAB bi-scFv

Супернатант клітинної культури клону #28 HEK293 білок, що містить 1BiMAB bi-scFv (описаний у прикладі I.d), піддавали афінній хроматографії з використанням іммобілізованих металів (IMAC) з використанням стандартних процедур (Current Protocols in Protein Science, 2012). Коротко, фільтрований супернатант клітинної культури наносили на стовпчик His Trap FF 5 мол, з'єднану із системою AKTA Purifier 10 FPLC system (обидві фірми GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany). Промивний буфер PBS містив 10 мМ імідазола, елююючий буфер PBS містив 500 мМ NaCl, 50 мМ NaH₂PO₄ і 250 мМ імідазола, pH обох буферів було доведено до 7,4. Елюювання виконували з використанням східчастого градієнта. Елюований білок 1BiMAB bi-scFv відразу ж піддавали діалізу проти 1x PBS з використанням Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassette 10K MWCO (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Після діалізу проти 1x PBS, bi-scFv піддавали діалізу проти 200 мМ аргінінового буфера на основі H₂O (L-аргінін-моногідрохлорид; Roth, Karlsruhe, Germany).

Концентрацію bi-scFv визначали шляхом вимірювання при 280 нм за допомогою Nanodrop 2000с, враховуючи коефіцієнт екстинкції й молекулярну масу білка 1BiMAB bi-scFv, визначені за допомогою інструмента ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>). Очищений білок розділяли на аліквоти і зберігали при -80 °C для тривалого зберігання або при 4 °C для негайного використання.

Якість і чистоту білка 1BiMAB bi-scFv тестували шляхом фарбування кумаси й вестерн-блот-аналізу, як описано в Прикладі I.d (дивися також фігури 3A і B). Стандартне розведення BSA було включено в процедуру фарбування кумаси для попереднього підтвердження концентрації, обмірюваної за допомогою Nanodrop (дані не показані).

f. Проведення аналізу ELISA

Для кількісного визначення 1BiMAB у супернатанті клітинної культури клітин HEK 293 проводили специфічний аналіз ELISA. Для цієї мети використовували супернатант із Прикладу I.d і очищений білок 1BiMAB bi-scFv, описаний у Прикладі I.e. Попередньо блоковані BSA колонках Ni-NTA (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) використовували для іммобілізації білка 1BiMAB bi-scFv за допомогою його 6xhis-мітки. Усі стадії промивання виконували три рази 200 мкл 1x PBS/0,05 % Tween (промивний буфер) на лунку й усі стадії виконували за кімнатної температури. Як стандарт використовували очищений білок 1BiMAB, розведений у 1x PBS у діапазоні 10 - 500 нг/мл. Супернатанти розбавляли в співвідношенні 1:10 в 1x PBS. У кожну лунку переносили по 100 мкл розведеного білка або супернатанта й інкубували протягом однієї години при струшуванні. Після промивання антидіотипове антитіло проти доменів V_H-V_L mCLDN18.2ab розбавляли до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл в 1x PBS/3% BSA. У кожну лунку

додавали по 100 мкл розчину анти-mCLDN18.2ab і інкубували протягом однієї години при струшуванні. Після промивання AP-кон'юговане антимишаче-Fc антитіло (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, England) розбавляли до кінцевої концентрації 300 нг/мл в Іх PBS/3% BSA. У кожну лунку додавали по 100 мкл цього розчину вторинного антитіла й інкубували додатково протягом години при струшуванні. Як негативні контролю використовували тільки вторинне антитіло, 1BiMAB плюс вторинне антитіло, і анти-mCLDN18.2ab плюс вторинне антитіло. Крім того, в аналіз був включений супернатант клітин HEK293 без білка bi-scFv. На закінчення, після промивання в кожну лунку додавали по 50 мкл розчину Ap-Субстрату (1,5 мг рnpp на мл субстратного буфера, Applichem GmbH, Darmstadt, Germany). Через 5, 15 і 30 хв інкубації в умовах темряви вимірювали поглинання при 405 нм із довжиною хвилі випущення 492 нм за допомогою мікропланшетного рідера Infinite M200 Tecan (Tecan, Männedorf, Switzerland). Концентрацію білка bi-scFv у супернатанті визначали шляхом розрахунків проти стандартного ряду (дані не показані).

g. Тимчасова трансфекція CLDN18.2-специфічних білків bi-scFv для порівняльних досліджень

Для тимчасової генерації переважно високих кількостей CLDN18.2-специфічних білків bi-scFv використовували клітинну лінію ембріональних нирок людини HEK293T (ATCC CRL-11268) для трансфекції.

1×10^7 клітин HEK293T засівали за два дні до трансфекції на чашки Петрі 14,5 см в 20 мл повного середовища DMEM (DMEM/F-12 Glutamax, доповненого 10 % термоінативованого FBS і 0,5 % пеніциліну-стрептоміцину; усі реагенти від фірми Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). Перед трансфекцією клітини промивали DPBS, доповненим 2 mM EDTA, потім додавали 20 мл звичайного середовища DMEM без FBS або антибіотиків. 20 мкг кільцевих ДНК-конструкцій 1BiMAB, по. 11 - 20 і по.35 (описаних у Прикладі I.b), розбавляли в 0,5 мл звичайного середовища DMEM/F-12. У розведену ДНК додавали 75 мкл розчину лінійного PEI (поліетиленімін; Polysciences Europe GmbH, Erpelheim, Germany) при концентрації 1 мг/мл і енергійно перемішували на вортексі. Через 15 хв. інкубації за кімнатної температури (RT) у клітини краплями додавали комплекси ДНК/PEI, чашки для клітинних культур обережно перемішували обертовим рухом і потім інкубували при 37 °C, 5% CO₂ протягом 24 год. Після заміни середовища на звичайне DMEM/F-12 клітини інкубували додатково протягом 48 год при 33 °C, 5 % CO₂. Клітинний супернатант збирали після інкубації й стерильно фільтрували за допомогою 0,2 мкм шприцевих фільтрів Minisart syringe filters (Sigma-Aldrich, Germany). Потім білки bi-scFv очищали в малому масштабі із супернатантів клітинних культур за допомогою спин-стовпчиків Ni-NTA відповідно до протоколу виробника (Qiagen, Hilden, Germany). Концентрації білка bi-scFv оцінювали за допомогою ELISA, як описано в прикладі 1.f, і підтверджували за допомогою вестерн-блот аналізу, як описано в прикладі I.e (дані не показані). Очищені білки зберігали при 4 °C для негайного використання.

Приклад 2: Проведення функціональних аналізів для контролю специфічної активації Т-клітин і лізису клітин-мішеней за допомогою переспрямованих Т-клітин, опосередкованих білками bi-scFv.

FPLC-очищений білок 1BiMAB bi-scFv використовували для проведення аналізів in vitro для контролю здатності білків bi-scFv специфічно перенаправляти людські ефекторні клітини на ТАА-позитивні клітини-мішені. Метою є візуалізація ефектів і кількісна оцінка активації людських Т-клітин і специфічного лізису клітин-мішеней.

a. Мікроскопічний аналіз Т-клітин, переспрямованих на клітини-мішені за допомогою білка bi-scFv

Для візуалізації функціональності білка bi-scFv проводили аналіз для демонстрації перенаправлення ефекторних клітин на CLDN18.2-які експресують клітини-мішені білками bi-scFv за допомогою мікроскопа. Для цієї мети як клітинну лінію-мішень використовували клітинну лінію карциноми шлунка NucC4, яка ендогенно експресує порівняно високі рівні людського CLDN18.2 (Sahin U. et al, Clin Cancer Res. 2008 Dec 1 ;14(23):7624-34).

Людські ефекторні клітини свіжоізолювали з людської крові здорових донорів згідно зі стандартними процедурами (Current Protocols in Immunology, 2012): коротко, кров розбавляли DPBS, наносили шарами на Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany) і центрифугували. Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) збирали з інтерфази, промивали холодним DPBS, доповненим 2 мм EDTA і підраховували. Людські Т-клітини потім відокремлювали шляхом відділення магнітно-активованих клітин (MACS) від PBMC за допомогою набору Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany) відповідно до протоколу виробника.

1×10^5 клітин NucC4 засівали на лунку в тканинні культуральні 6-лункові планшети. Людські

клітини готовили, як описано вище, і додавали в співвідношенні ефектора до мішені (Е:Т) 5:1. Середовище RPMI 1640, доповнене 5 % термоінактивованою людською АВ сироваткою, 0,5 % пеніциліну-стрептоміцину, 1 x NEAA і 1 мМ пірувата натрію (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany), використовували для всіх клітин, і кінцевий обсяг кожної лунки доводили до 2 мл на лунку. Контрольні зразки містили клітини-мішені або Т-клітини з білком bi-scFv або без нього. Тканинні культуральні планшети потім інкубували при 37 °С, 5 % CO₂. Спостереження за ходом аналізу проводили в безперервному режимі на інвертаційному мікроскопі Wilovert S inverted microscope (Hund, Wetzlar, Germany) в інтервалі від 6 год до 48 год спільної інкубації. Значні ефекти відносно утворення кластерів Т-клітин на клітинах-мішенях, формування імунологічного синапса й знищення клітин-мішеней у присутності білка 1BiMAB bi-scFv спостерігали через 24 год. Через 48 год життєздатні клітини-мішені із труднощами могли бути виявлені. Знімки робили через 24 год на інвертаційному мікроскопі Nikon Eclipse TS 100 (Nikon, Japan). Дивися також фігуру 5.

Цей аналіз надалі використовували як візуальний контроль у всіх аналізах на цитотоксичність у різних форматах лунок.

b. Залежна від мішені активація Т-клітин білком 1BiMAB bi-scFv

Для детекції специфічної активації людських Т-клітин білками bi-scFv проводили аналіз методом проточної цитометрії. Для детекції активації Т-клітин маркер ранньої активації CD69 і маркер пізньої активації CD25 минулого відібрані для фарбування антитілами, кон'югованими із флуоресцентними мітками. Для детекції людських Т-клітин у суміші клітин-мішеней і Т-клітин, CD3 на Т-клітинах фарбували.

Порядок проведення аналізу був вибраний з наведеного вище прикладу (Приклад 2.а). Коротко, клітини-мішені NugC4 засівали з людськими Т-клітинами в співвідношенні Е:Т, рівному 5:1, в 2 мл повного середовища, і білок 1BiMAB bi-scFv додавали в концентрації з діапазоні 0,001 - 1000 нг/мл. Контрольні зразки містили клітини-мішені або Т-клітини з білком 1BiMAB bi-scFv або без нього. Через 24 год і/або 48 год - залежно від результату візуального контролю – усі клітини збирали шляхом обережного зішкрябування за допомогою Cell Scrapers (Sarstedt AG & Co, Niimbrecht, Germany) і переносили в пробірки із круглим дном обсягом 5 мл (BD Falcon, Heidelberg, Germany). Клітини центрифугували й промивали DPBS. Для фарбування клітин використовували мишачі антилюдські CD3-FITC, мишачі антилюдські CD69-APC і мишачі антилюдські CD25-PE антитіла (усі антитіла фірми BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Клітинні опади ресуспендували в 50 мкл FACS-буфера (DPBS, доповнений 5 % FBS), що містить антитіла кон'юговані із флуоресцентними мітками. Після інкубації протягом 20 хв при 4 °С в умовах темряви зразки промивали 4 мл DPBS і клітинний осад ресуспендували в 200 мкл FACS-буфера, що містить йодид пропідію (PI) або 7-AAD (обидві фірми Sigma Aldrich, Germany) у кінцевому розведенні 1:1000 для детекції загиблених клітин. Зразки зберігали на льоду й в умовах темряви протягом проведення вимірювання. Аналіз виконували за допомогою FacsCalibur, наступні виміри виконували за допомогою проточного цитометра Facsanto II (обидва фірми BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Дані аналізів оцінювали за допомогою програмного забезпечення Flowjo software (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

Як показано на фігурах 6А і В, 1 BiMAB-опосередкованої активації Т-клітин не виявляється під час відсутності клітин-мішеней, підтверджуючи строгу залежність функціональності bi-scFv від мішені. Значна активація Т-клітин у присутності клітин-мішеней виникала тільки при концентрації 1BiMAB, що становить 0,01 нг/мл, через 24 год. Максимальна ефективність була досягнута з використанням 100 нг/мл 1BiMAB.

Крім дослідження активації Т-клітин, даний аналіз забезпечує також кількісні аналізи опосередкованих bi-scFv ефектів відносно знищення клітин-мішеней, шляхом гейтування популяції клітин-мішеней і оцінки процентного вмісту PI- або 7-AAD-позитивних клітин-мішеней (дані відсутні). Усі аналізи виконували з використанням програмного забезпечення Flowjo (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

c. Аналіз на цитотоксичність із використанням люциферази

Для визначення відмінностей у потенціалі білків bi-scFv, спрямованих проти CLDN18.2 і CD3, знищувати клітини-мішені, повинен бути розроблений високочутливий аналіз. Ціль полягала в проведенні аналізу, за допомогою якого можна було високопродуктивним чином кількісно контролювати знищення клітин-мішеней. Для досягнення цієї мети був вибраний цитотоксичний аналіз із використанням люциферази. За допомогою даного аналізу вимірювання експресії люциферази життєздатними клітинами-мішенями забезпечує можливість непрямого визначення лізису клітин-мішеней, опосередкованого цитотоксичними ефекторними клітинами в присутність антитіла.

Спочатку клітини NugC4 (описані вище) трансдукували лентивірусним вектором, що несуть

люциферазу світлячка, репортерний ген EGFP і маркер селекції антибіотика. Після антибіотичного відбору трансдукованих клітин, клітини, які експресують на високому рівні EGFP, піддавали сортингу за допомогою клітинного сортера Facsaria (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), аналізували на високу експресію люциферази й потім розмножували для наступних досліджень.

Людські ефекторні клітини готували, як описано в прикладі 2.а. Аналіз проводили при концентрації білка 1BiMAB bi-scFv у діапазоні 1-100 нг/мл, при цьому було виявлено, що концентрація 5 нг/мл забезпечувала високоефективні й відтворені результати, і надалі була використана як стандартна концентрація. Клітини NugC4, стабільно які експресують люциферазу (описану вище), використовували як клітини-мішені. У кожну лунку засівали 1×10^4 клітин-мішеней у білі плоскодонні 96-лункові планшети. Людські Т-клітини (приготовлені, як описано в Прикладі 2.а) додавали в співвідношенні Е:Т, рівному 5:1. Використовували середовище, описане вище (Приклад 2.а), і кінцевий обсяг кожної лунки доводили до 100 мкл. Тестовані зразки й контрольні зразки засівали щонайменше у трьох повторностях. Клітинні культуральні мікропланшети інкубували протягом 24 год і 48 год при 37 °C, 5 % CO₂. Для аналізу 50 мкл водяного розчину, що містить 1 мг/мл люциферину (BD Monolight, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) і 50 мМ HEPES додавали в кожну лунку, і планшети потім інкубували протягом 30 хв. в умовах темряви при 37 °C. Люмінесценцію, що виникає в результаті окиснення люциферина люциферазою, яка експресує життєздатні клітини, вимірювали на мікропланшетному рідері (Infinite M200, Tecan, Mannedorf, Switzerland). Відсоток специфічного лізису клітин-мішеней розраховували за наступною формулою: % специфічного лізису = $[1 - (\text{люмінесценція тестованій зразок} - L_{\max}) / (L_{\min} - L_{\max})] \times 100$, де «L» означає лізис. $L_{\min}$ належить до мінімального лізису під час відсутності bi-scFv, і $L_{\max}$ до максимального лізису (рівного числу імпульсів спонтанної люмінесценції) під час відсутності bi-scFv, досягнутого шляхом додавання Triton X-100 (кінцева концентрація 2 %).

Потенційні прямі ефекти білків bi-scFv на клітини-мішені незалежно від ефекторних клітин визначали шляхом засівання клітин-мішеней без людських Т-клітин, включаючи всі контролю, такі як $L_{\min}$ і $L_{\max}$. Даний аналіз використовували для наступних досліджень для вивчення специфічного лізису клітин-мішеней, опосередкованого Т-клітинами. Модифікації здійснювали, наприклад, шляхом зміни концентрацій bi-scFv, білків bi-scFv, співвідношення Е:Т або ефекторних клітин (CD8+, CD4+ Т-клітини, PBMC).

Приклад 3: Відбір лідерного кандидата CLDN18.2-специфічного bi-scFv

Аналіз на цитотоксичність із використанням люциферази з різними CLDN18.2-специфічними білками bi-scFv для відбору найбільш сильного варіанта bi-scFv

Усі 10 кодон-оптимізованих конструкцій CHO (но. 11-20), специфічних відносно TAA CLDN18.2, тестували в порівнянні з оптимізованим по кодонах людським білком 1BiMAB bi-scFv в аналізі на цитотоксичність із використанням люциферази із клітинами-мішенями NugC4, які ендогенно експресують CLDN18.2 і ектопічно експресують люциферазу (дивися також приклад 2.с). Характеристики використовуваних білків bi-scFv представлено в таблиці 2. Bi-scFv no.35, специфічний відносно TAA PLAC1, використовували як контроль ізо типу, тому що PLAC1 не експресується клітинами NugC4. Активність зв'язування з CD3 на людських Т-клітинах була підтверджена в аналізі зв'язування FACS (дані не показані). Усе білки bi-scFv генерували, як описано в прикладі 1.г, і використовували для аналізу на цитотоксичність, як описано в прикладі 2.с.

Усі білки bi-scFv використовували в кінцевій концентрації 5 нг/мл. Для визначення $L_{\min}$, контрольний білок bi-scFv no.35 засівали із клітинами-мішенями й Т-клітинами в дев'яти повторностях, тестовані зразки засівали в шести повторностях. На кожний момент часу один планшет готували для аналізу.

Специфічний лізис у кожний аналізований момент часу (8 год, 16 год, 24 год) показаний залежно від використовуваних білків bi-scFv. Було доведено, що білки 1BiMAB bi-scFv (SEQ ID NO: 39) і no.15 (SEQ ID NO: 41) - які сконструйовані в однаковій орієнтації й містять однакову послідовність анти-CD3 (TR66), і відрізняються тільки за використанням їх кодонів на рівні нуклеїнової кислоти й за послідовностями лінкера - є найбільш сильними антитілами відносно опосередкування лізису клітин-мішеней (дивися фігуру 2). Тому що 1BiMAB і no.15 рівнозначні по ефективності, найбільше добре вивчений на сьогоднішній день білок 1BiMAB bi-scFv був відібраний для всіх наступних аналізів. Конструкції 18PHU3 і 18PHU5 (дивися таблицю 1 і 2) порівнювали в більш пізній момент часу з 1BiMAB. Ефективність 18PHU5 була еквівалентна 1BiMAB, 18PHU3 був менш сильним (дані не показані).

Приклад 4: З'єднувальна здатність білка 1BiMAB bi-scFv

Проведення аналізу на зв'язування на основі FACS

Аналіз методом проточної цитометрії використовували для оцінки з'єднувальної здатності CLDN18.2 і фрагментів білків bi-scFv, що направлено впливають на CD3. CLDN18.2, ендегенно експресований клітинами NugC4, використовували для вивчення анти-CLDN18.2 сайту й людські Т-клітини використовували для вивчення анти-CD3 сайту.

Для вивчення з'єднувальної здатності анти-CLDN18.2, клітини NugC4 трипсинували, промивали повним середовищем RPMI 1640 і потім DPBS. Усі промивні стадії виконували шляхом центрифугування при 1200 об/хв. протягом 6 хв. при 4 °C. $2,5 \times 10^5$ клітин NugC4 переносили в круглодонні пробірки обсягом 5 мл і інкубували з 50 мкг/мл FPLC-очищеного білка 1BiMAB в FACS-буфері протягом 30 хв. при 4 °C. Клітини промивали 2 мл FACS-буфера й потім інкубували з 3,3 мкг/мл моноклонального антитіла Anti-HIS Epitope-Tag (Dianova GmbH, Hamburg, Germany) протягом 30 хв. при 4 °C. Після промивання 2 мл FACS-буфера, клітинний осад інкубували з APC-кон'югованим козячим-антимішачим вторинним антитілом (Jackson Immunoresearch Europe, Suffolk, England) у розведенні 1:200 в FACS-буфері протягом 20 хв. при 4 °C в умовах темряви. Клітини двічі промивали 2 мл FACS-буфера й на закінчення ресуспендували в 150 мкл FACS-буфера, доповненого 1 мкг/мл PI (Sigma Aldrich, Germany) для контрастного фарбування загублених клітин. Інше фарбування було включено з використанням такої ж процедури за допомогою 50 мкг/мл 1BiMAB і APC-кон'югованого козячого-антимішачого вторинного антитіла (1:200), але без Anti-HIS Epitope-Tag антитіла. Негативні контрольні зразки включали вторинне козяче-антимішаче антитіло, кон'юговане з алофікоціаніном (APC), моноклональне антитіло Anti-HIS Epitope-Tag плюс вторинне козяче-антимішаче антитіло, кон'юговане з APC. Як позитивний контроль використовували 10 мкг/мл моноклонального CLDN18.2-специфічного антитіла mCLDN18.2ab, пофарбованого вторинним козячим-антилюдським антитілом, кон'югованим з APC (Jackson Immunoresearch Europe, Suffolk, England), і його вторинного антитіла.

Зразки вимірювали за допомогою проточного цитометра Facscalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) і аналізували за допомогою програмного забезпечення Flowjo Software (Tree Star, San Carlos, CA, USA). Сильні сигнали детектували шляхом послідовного фарбування 1BiMAB, Anti-HIS Epitope-Tag і козячим-антимішачим APC. Інтенсивність сигналу була порівнянна з позитивним контролем mCLDN18.2ab з козячим-антилюдським APC. Низький рівень прямого зв'язування козячого-антимішачого APC з 1BiMAB спостерігали в зразку, пофарбованому 1BiMAB і козячим-антимішачим APC без Anti-HIS Epitope-Tag (дивися фігуру 4 А).

Для всіх наступних аналізів FACS-зв'язування для дослідження з'єднувальної здатності білків bi-scFv використовували послідовний протокол, фарбуючи bi-scFv, Anti-HIS Epitope-Tag і козячим-антимішачим APC (дивися фігуру 4В, С і D). Для виключення неспецифічного зв'язування 1BiMAB, клітини-мішені, які не експресують CLDN18.2, що підтверджується даними RT-PCR (дані не показані), піддавали аналізу на зв'язування на основі FACS. Неспецифічного зв'язування 1BiMAB не було виявлено, як показано на фігурі 4D.

Для вивчення з'єднувальної здатності анти-CD3 плеча білка 1BiMAB bi-scFv використовували людські Т-клітини, 1×10^6 Т-клітин, отриманих, як описано в прикладі 2.а, переносили в круглодонні пробірки обсягом 5 мл і інкубували з FPLC-очищеним білком 1BiMAB при концентрації в діапазоні 0,002 - 2 мкг/мл в FACS-буфері протягом 30 хв. при 4 °C. Наступна процедура фарбування описана вище. Контрольні зразки включали тільки вторинне козяче-антимішаче APC антитіло й моноклональне антитіло Anti-HIS Epitope-Tag плюс вторинне козяче-антимішаче APC антитіло. Вимірювання й аналіз проводили, як описано вище. Значний сигнал був отриманий при 2 мкг/мл 1BiMAB (дивися фігуру 4С).

Приклад 5: Вивчення високоспецифічної, залежної від мішені активації Т-клітин білком 1BiMAB bi-scFv

Лінії ракових клітин, які ендегенно експресують високі або низькі рівні CLDN 18.2, і лінії ракових клітин, які не експресують CLDN18.2, відбирали для підтвердження строгої залежності від мішені білка 1BiMAB bi-scFv в аналізі in vitro цитотоксичності. Відібрані клітинні лінії являли собою два основні типи карциноми, які експресують CLDN18.2: карциному шлунка (NugC4, MKN7, SNU-1) і підшлункової залози (Dang, KP-4). Клітинну лінію раку молочної залози MCF7 використовували як негативний контроль.

а. Аналіз методом RT-PCR CLDN18.2 клітинних ліній злоякісних новоутворень

Загальну РНК екстрагували із клітинних ліній карциноми, зазначених вище, за допомогою набору Rneasy Mini Kit згідно із процедурою відповідно до протоколу виробника (Quiagen, Hilden, Germany). 5 мкг РНК використовували для синтезу кДНК із використанням зворотної транскриптази Superscript II (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany).

Аналізи RT-PCR проводили із застосуванням системи ABI Prism 7300 Real Time PCR System

(Applied Biosystems/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) з використання барвника Sybr Green і наступних праймерів:

CLDN18.2: для TGGCTCTGTGTCGACACTGTG; rev GTGTACATGTTAGCTGTGGAC HPRT: для TGACACTGGCAAACAATGCA; rev GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

5 Величину дельта Ct розраховували шляхом вирахування величини Ct гена домашнього господарства HPRT з величини Ct CLDN18.2 (результати показано на фігурі 7 A).

b. Ексклюзивна активація Т-клітин у присутність CLDN18.2

Аналіз цитотоксичності проводили, як описано в прикладі 2.a. Клітинні лінії карциноми, досліджені відносно транскриптів CLDN18.2 згідно із прикладом 5.a за допомогою кількісної RT-PCR, використовували як клітини-мішені. Концентрація білка 1BiMAB bi-scFv у даному аналізі складала 5 нг/мл. Клітини-мішені засівали з людськими Т-клітинами й 1BiMAB у двох повторностях для аналізу активації Т-клітин. Для контролю будь-якої потенційної алореактивності Т-клітин проти клітин-мішеней незалежно від білка 1BiMAB bi-scF, клітини-мішені й Т-клітини засівали без 1BiMAB у двох повторностях. Клітини безупинно спостерігали під мікроскопом на утворення кластерів Т-клітин і зв'язування клітин-мішеней. У випадку клітинної лінії NucC4, яка високо експресує CLDN18.2, значний ефект виникав через 2 год; через 48 год життєздатні клітини-мішені були ледве видимими. У випадку низької експресії CLDN18.2 клітинною лінією Dang перші ефекти спостерігалися через 96 год і значні ефекти через 120 год. У випадку CLDN18.2-негативних клітинних ліній ефекти, що вказують на яку-небудь активацію Т-клітин, були відсутні навіть через 144 год. Т-клітини всіх зразків аналізували через 144 год спільної інкубації із клітинами-мішенями за допомогою проточної цитометрії, як описано в прикладі 2.a для маркера CD69 ранньої активації Т-клітин і маркера CD25 пізньої активації, контрастно пофарбованих CD3 для Т-клітинної популяції й PI для загиблих клітин. Дивним чином, до 100 % Т-клітин, спільно інкубованих з NucC4 і 1BiMAB, були CD 25-позитивними, але CD 69-негативними, що вказувало на тривалу активацію Т-клітин, коли знижуюча регуляція CD69 уже виникла. Приблизно 75 % Т-клітин, спільно інкубованих з Dang і 1BiMAB, було активовано, з яких приблизно 40 % одночасно експресували CD25 і CD69, що вказувало на активацію Т-клітин, яка усе ще триває. Т-клітини, спільно інкубовані з CLDN18.2-негативними клітинними лініями, не показали якої-небудь ознаки індукції активації Т-клітин: експресія CD69 і CD25 не була значно підвищеною в порівнянні з рівнями експресії зразків без 1BiMAB (дивися також фігуру 7B).

Приклад 6: Дослідження індукованої білком 1BiMAB bi-scFv функції Т-клітин

a. Індукція проліферації Т-клітин

Проліферація Т-клітин є ознакою активації Т-клітин. Для демонстрації проліферації Т-клітин у відповідь на білок 1BiMAB bi-scFv у присутності CLDN18.2-позитивних клітин-мішеней використовували аналіз методом проточної цитометрії. Коротко, 1×10^6 людських Т-клітин виділяли, як описано в прикладі 2.a, фарбували в умовах темряви при 37 °C протягом 10 хв. із 0,5 мкМ карбоксифлуоресцеїну діацетату сукцинімідилового складного ефіру (Celltrace CFSE, Invitrogen/Life Technologies GmbH, Germany), розчиненого в DPBS. Фарбування зупиняли шляхом додавання 5 обсягів холодного повного середовища RPMI 1640. Клітини зберігали на льоді протягом 5 хв. і промивали 3 рази повним середовищем RPMI (5% термоінактивованої людської сироватки АВ, 0,5 % пеніциліну-стрептоміцину, 1x NEAA і 1 мМ пірувату натрію) і потім ресуспендували до 1×10^5 клітин на мл. Аналіз на цитотоксичність, описаний у прикладі 2.b, проводили з CLDN18.2, ендегенно експресуючим клітини NucC4, і людськими Т-клітинами як ефекторними клітинами. У клітини додавали 50 ОД IL-2 на мл середовища. Зразки включали тільки Т-клітини, Т-клітини з 1 нг/мл 1BiMAB, Т-клітини й клітини NucC4, і Т-клітини з 1 нг/мл 1BiMAB і клітинами NucC4. Через 120 год спільної інкубації Т-клітини відбирали, збирали в круглодонні пробірки обсягом 5 мл, промивали й фарбували розчином 7-AAD DPBS у розведенні 1:1000 для контрастного фарбування загиблих клітин протягом 15 хв. при 4 °C. Після промивання DPBS клітини ресуспендували в FACS-буфері й аналізували за допомогою Facsanto II (BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

Проліферацію Т-клітин детектували за зменшенням CFSE-сигналу тільки в присутності клітин-мішеней і білка 1BiMAB bi-scFv (дивися також фігуру 8 A).

b. Індукція серинпротеази Granzyme B

Для демонстрації підвищувального регулювання протеолітичних молекул після активації Т-клітин, опосередкованої білком 1BiMAB bi-scFv у присутності CLDN18.2-позитивних клітин-мішеней, вибрали детекцію серинпротеази Granzyme B за допомогою аналізу методом проточної цитометрії. Аналіз на цитотоксичність, описаний у прикладі 2.b, проводили з CLDN18.2, ендегенно експресуючим клітини NucC4, і людськими Т-клітинами як ефекторними клітинами. Зразки включали тільки Т-клітини, Т-клітини з 5 нг/мл 1BiMAB, Т-клітини й клітини NucC4, і Т-клітини з 5 нг/мл 1BiMAB і клітинами NucC4. Через 96 год спільної інкубації Т-клітини

відбирали, збирали в круглодонні пробірки обсягом 5 мл, промивали й фарбували розчином 7-AAD DPBS у розведенні 1 : 1000 для контрастного фарбування загиблих клітин протягом 15 мн при 4 °С. Після промивання DPBS клітини фіксували 100 мкл розчину Cytoperm/Cytofix протягом 20 хв. за кімнатної температури (RT). Клітини промивали Іх Perm/Wash і потім фарбували Ре-кон'югованим мишачим антилюдським Granzyme В антитілом протягом 20 хв. при RT. Після промивання клітини ресуспендували в FACS-буфері й аналізували на приладі Facscanto II (усі реагенти й FACS machine BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

Підвищувальну регуляцію Granzyme В у Т-клітинах детектували тільки в присутності клітин-мішеней і білка 1BiMAB bi-scFv (дивися також фігуру 8В).

Приклад 7: Визначення EC50 білка 1BiMAB bi-scFv в аналізі in vitro на цитотоксичність

Аналіз на цитотоксичність із використанням люциферази

Для визначення половини максимальної ефективної дози білка 1BiMAB bi-scFv, ряд титрувань 1BiMAB тестували в аналізі in vitro на цитотоксичність із використанням люциферази, головним чином, як описано в прикладі 2.с.

Стабільно експресуючі люциферазу клітини NugC4, описані в прикладі 2.с, інкулювали з людськими Т-клітинами й білком 1BiMAB bi-scFv у концентраціях у діапазоні від 1 пг/мл до 1 мкг/мл (10 кроків) і без 1BiMAB для визначення величин L_{min} . Люмінесценцію життєздатних клітин вимірювали на планшетному рідері Infinite M200 Тесла через 24 год і 48 год після початку аналізу. Специфічний лізис клітин-мішеней розраховували за формулою, наведеною у прикладі 2.с.

Максимальний лізис був досягнутий через 48 год з використанням 1 - 10 нг/мл 1BiMAB. Певна величина EC50 через 48 год у цьому аналізі склала 10 пг/мл (дивися також фігуру 9). Результат цього аналізу залежить значною мірою від активності людських Т-клітин, яка різниться залежно від імунного статусу донора, як описано в інших роботах (наприклад, Lutterbuese, R et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010 Jul 13; 107(28): 12605- 10). Крім того, використовувана лінія клітин-мішеней NugC4 показує мінливу експресію CLDN18.2, також впливаючи на результат. Таким чином, у ході винаходу спостерігалось відхилення величин EC50 білка 1BiMAB bi-scFv у діапазоні 10 - 300 пг/мл.

Приклад 8: Ефективність у мишачій моделі ксенотрансплантата

Для дослідження терапевтичного потенціалу білка 1BiMAB bi-scFv in vivo був вибраний мишачий штам NOD.Cg-Prkdcid IL2rgtmlwj/Szj або короткий NSG (Jackson laboratory, Bar Harbour, ME, USA). Для описаного дослідження щеплення людських ефекторних клітин і людських Т-лімфоцитів у мишей необхідно для дослідження ефектів Т-клітинного захоплення bi-scFv in vivo. Через повну відсутність В-, Т- і NK-клітин мишачий штам NSG є підходящим для цього виду досліджень ксенотрансплантата. Мишача модель із привитими, головним чином, людськими Т-клітинами після ін'єкції PBMC становить частину винаходу.

а. Лікування з пізнім початком пухлин на пізній стадії, високоекспресуючих CLDN18.2, у мишей за допомогою білка 1BiMAB bi-scFv

В описаному дослідженні 40 самкам мишей NSG у віці 8 тижнів підшкірно інокулювали 1×10^7 клітин HEK293, стабільно експресуючих високі рівні людського CLDN18.2 (HEK293-CLDN18.2). Через 5 днів після інокуляції пухлинних клітин мишей розподіляли відповідно до обсягу їх пухлин на лікувальні групи, при цьому миші, у яких ріст пухлини був відсутній, були виключені. У той же день мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) виділяли з людської крові здорових донорів методом центрифугування в градієнті щільності фікола, як описано в прикладі 2.а, і використовували як ефекторні клітини in vivo. 2×10^7 PBMC, розведених в 300 мкл DPBS, ін'єктували інтраперитонеально в день виділення експериментальним лікувальним групам, позначеним «PBMC». Лікувальні групи, позначені «PBS», одержували 300 мкл простого DPBS інтраперитонеально й служили як контроль без людських ефекторних клітин. За допомогою контрольних груп «PBS» можна досліджувати потенційний ефект на ріст пухлини самого 1BiMAB або будь-які потенційні побічні ефекти, які викликані 1BiMAB або носієм, але не людськими ефекторними клітинами, проти мишачої тканини (тобто реакція трансплантат проти хазяїна, викликана людськими ефекторними клітинами, проти мишачої тканини). Група «PBS/носії» включала 4 мишей (n=4), «PBS/1BiMAB» 5 мишей (n=5), «PBMC/носії» 13 мишей (n=13) і «PBMC/1BiMAB» 15 мишей (n=15). Терапію починали через 1 день після застосування DPBS або PBMC: групи «PBS/1BiMAB» і «PBMC/1BiMAB» одержували інтраперитонеально 5 мкг очищеного білка 1BiMAB bi-scFv, розведеного в 200 мкл DPBS на тварину. Групи «PBS/носії» і «PBMC/носії» одержували інтраперитонеально 200 мкл буферного носія (200 мМ L-аргініну моногідрохлориду, розчиненого в H₂O, стерильно фільтрованого), розведеного в DPBS. Лікувальні групи коротко описано в таблиці 3. Терапію проводили на щоденній основі протягом 22 днів. Двічі в тиждень

- вимірювали розмір пухлин за допомогою цифрового каліброваного каліпера, і обсяг пухлин розраховували за формулою $\text{мм}^3 = \text{довжина} \times \text{ширина} \times (\text{ширина}/2)$. На фігурах 10A і B показано інгібування росту пухлини й зменшення пухлини у два рази в мишей групи «PBMC/1BiMAB» тільки за допомогою антитіла в присутності людських ефекторних клітин. Мишей забивали шляхом зсуву шийних хребців, коли обсяг пухлини перевищував 500 мм^3 , або у випадку серйозних клінічних проявів (у деяких мишей спостерігалися симптоми реакції трансплантат проти хазяїна).

Таблиця 3

Лікувальні групи

Лікувальна група (G)	Кіл-у мишей (n)	Ефекторні клітини	Білок bi-scFv	мкг білка bi-scFv / миша
G1	4	-	-	-
G2	5	-	1Bimab	5
G3	13	PBMC	-	-
G4	15	PBMC	1Bimab	5

- b. Визначення впливу терапії на масу тіла
- Масу тіла кожної миші вимірювали два рази на тиждень із використанням лабораторних ваг. Жодна з мишей у будь-якій групі не показала зниження маси тіла протягом періоду лікування (дані не показані). Деякі миші в обох групах «PBMC» виявили симптоми реакції трансплантат проти хазяїна через 4 тижні після ін'єкції PBMC і через кілька днів після завершення лікування. Ефекти самого 1BiMAB на масу тіла або інші побічні ефекти, що належать до стану здоров'я мишей, не спостерігалися.

c. Консервація тканини й виділення спленоцитів

- Після забиття мишей пухлини видаляли, і тканину відразу ж фіксували в 10 мл 4% Roti-Histofix (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) для імуногістохімічного аналізу. Крім того, селезінки видаляли для детекції приживлення людських клітин за допомогою проточної цитометрії. Виділення спленоцитів виконували відразу ж після видалення селезінок, продавлиючи їх через клітинний фільтр із розміром гнізд 70 мкм, поміщений у реакційну пробірку обсягом 50 мл зі стерильним поршнем 3-5 мл шприца, і повторного промивання клітинного фільтра теплим DPBS. Виділені спленоцити центрифугували, DPBS декантували й осад спленоцитів ресуспендували в 1 мл термоінактивованої фетальної бичачої сироватки, доповненої 10 % 10 % DMSO. Зразки негайно заморожували при -80°C і зберігали до одержання зразків спленоцитів від усіх мишей.

d. Аналіз приживлення людських Т-лімфоцитів у мишачих селезінках

- Спленоцити від усіх мишей збирали й заморожували, як описано в Прикладі 8.c. Повну колекцію зразків спленоцитів відтавали одночасно, усі клітини промивали двічі теплим DPBS, і 1×10^6 спленоцитів на зразок інкубували з антитілами, кон'югованими із флуоресцентними мітками, протягом 20 хв. при 4°C в умовах темряви для детекції приживлення людських клітин шляхом фарбування анти-CD45 і процентного вмісту людських клітин шляхом фарбування анти-CD3, анти-CD4 і анти-CD8. Аналіз методом проточної цитометрії проводили на проточному цитометрі FacsCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Приживлення людських Т-клітин в обох групах «PBMC» може підтверджуватися високим процентним вмістом двічі CD45-CD 3-позитивних спленоцитів, як показано на фігурі 10D.

Приклад 9: Генерація й тестування біспецифічних з'єднувальних агентів, що направлено впливають на CLDN6 і CD3

- a. Походження послідовності, розробка конструкцій bi-scFv і клонування в експресійні вектори

- Конструкції біспецифічного тандемного одноланцюгового антитіла (bi-scFv) містили з'єднувальні домени, специфічні відносно компонента CD3 людського Т-клітинного рецептора й людських пухлиноасоційованих антигенів (TAA). Відповідні варіабельні області важкого ланцюга (VH) і відповідні варіабельні області легкого ланцюга (VL) розташовані для кожної конструкції специфічно в напрямку від N- до C-кінця в наступному порядку:

N-VHαCLDN6⁺ - VLαCLDN6⁺ VHαCD3⁺ - VLαCD3⁺ - C (6PHU5; SEQ ID NO: 43)

N- VHαCD3⁺ - VLαCD3⁺ - VHαCLDN6⁺ - VLαCLDN6⁺ C (6PHU5; SEQ ID NO:45)

- У таблиці 4 коротко описані всі конструкції bi-scFv, специфічні відносно TAA CLDN6, які були генеровані в рамках винаходу. CLDN18.2-специфічну конструкцію 1BiMAB bi-scFv

використовували як контрольне антитіло. Конструкції bi-scFv генерували шляхом генного синтезу Geneart AG (Geneart/Life Technologies GmbH, Regensburg, Germany) з використанням послідовностей VH і VL відповідних антитіл. Оптимізації кодонів, такі як Homo sapiens (HS) або Mus musculus (MM) були реалізовані за допомогою програмного забезпечення GeneArt's GeneOptimizer®, і перераховано в таблиці 5. Інформація зі специфічності, походження послідовностей з моноклональних антитіл (MAB), використанню кодону, додатковим відмітним ознакам послідовностей і посиланням на всі, що застосовуються домени коротко описано в таблиці 5. Походження послідовностей варіабельного домена відповідних антитіл CD3 перераховано в таблиці 5. Завдяки високій гомології людських і мишачих TAA, можуть бути використані послідовності VH і VL того самого анти-TAA для генерації конструкцій bi-scFv для мишачих аналізів, але в комбінації з VH, VL послідовностями мишачого специфічного клону 145-2C11 анти-CD3 антитіла.

Клонування ДНК і конструювання експресійних векторів проводили у відповідності зі стандартними процедурами (Sambrook, 1989), добре відомими фахівцям в даній області. Коротко, Послідовність Λ -послідовності-днк-послідовності bi-scFv містили рестрикцію 5' HindIII і 3' BamHI для клонування в експресійні плазмиди. Послідовність сигналу секреції вводили на 5' кінці (вище) послідовності bi-scFv для секреції білка із клітинної цитоплазми в культуральне середовище. Послідовність, що кодує гнучкий гліцин-сериновий пептидний лінкер, що складається з 15-18 амінокислот, вставляли для з'єднання доменів VH і VL для композиції одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіла (scFv), з яких один зв'язується з CD3 і інший з TAA. Для формування біспецифічного одноланцюгового антитіла послідовності двох доменів scFv з'єднували послідовністю, що кодує короткий пептидний лінкер (GGGGS). Разом із цією послідовністю лінкера сайт рестрикції BamHI вводили для обмінів доменів scFv для клонування наступних конструкцій bi-scFv. Зокрема, 5' scFv-домени можуть бути замінені на сайти рестрикції HindIII і BamHI і 3' scFv-домени на рестрикцію BamHI і XhoI. Схему конструкції дивися також на фігурі 1.

Усі використовувані конструкції антитіла bi-scFv клонували в стандартний експресійний вектор ссавця pcDNATM3.1/myc-His (+) (Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). С-кінцеву 6xHis-мітку використовували для метал-афінного очищення білка й аналізів на виявлення. Усі конструкції підтверджували шляхом секвенування через сервіс по секвенуванню одиночних прочитань (MWG single read sequence service) (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany).

Таблиця 4

Короткий опис конструкцій біспецифічного одноланцюгового антитіла, специфічного до TAA і CD3

Внутрішнє найменування	TAA	Специфічність	5'-VH-VL	3'-VH-V	Використання кодонів
1Bimab	CLDN18.2	людина	mcldn18.2ab	TR66	HS
6PHU5	CLDN6	людина	mcldn6ab	TR66	HS
6PHU3	CLDN6	людина	TR66	mcldn6ab	HS
6PMU5	CLDN6	миша	mcldn6ab	145-2C11	MM
6PMU3	CLDN6	миша	145-2C11	mcldn6ab	MM

HS, Homo-sapiens; MM, Mus musculus; TAA, пухлиноасоційований антиген.

Таблиця 5

Коротка інформація з конструкції bi-scFv

	CD3 з'єднувальний фрагмент		TAA з'єднувальний фрагмент					
Внутр. найм.	Походж. mab	Реактивн. різновид.	TAA	Походж. mab	Реактивн. різновид	5'-VH-VL	3'-VH-VL	Короткий лінкер
1Bimab	TR66	людина	CLDN18.2	mcln18.2ab	людина, миша	mcln18.2ab	TR66	GGGGS
6PHU5	TR66	людина	CLDN6	mcln6ab	людина, миша	mcln6ab	TR66	SGGGGS
6PHU3	TR66	людина	CLDN6	mcln6ab	людина, миша	TR66	mcln6ab	SGGGGS
6PMU5	145-2C11	миша	CLDN6	mcln6ab	людина, миша	mcln6ab	145-2C11	SGGGGS
6PMU3	145-2C11	миша	CLDN6	mcln6ab	людина, миша	145-2C11	mcln6ab	SGGGGS

Продовження Таблиця 5

Внутр. найм	5 –довгий лінкер	3 –довгий лінкер	Сигнал секреції	Викор. кодоні в	Анти-CD3 mab посилення
1Bimab	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6PHU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6PHU3	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6PMU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVATATGVHS	MM	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
6PMU3	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVLTCLKGIQG	MM	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987

5 HS, Homo-sapiens; MAB, моноклональне антитіло; MM, Mus musculus; TAA, пухлиноасоційований антиген.

b. Генерація стабільних клітинних ліній-продуцентів

Для генерації стабільних клонів клітин-продуцентів CLDN 6-специфічних білків bi-scFv використовували клітинну лінію ембріональних нирок людини HEK293 (ATCC CRL-1573).

10 1×10^7 клітин HEK293 засівали за два дні до трансфекції на чашки Петрі 14,5 см в 20 мл повного середовища DMEM (DMEM/F-12 Glutamax, доповненого 10% термоінактивованої FBS і 0,5% пеніциліну-стрептоміцину; усі реагенти від фірми Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). Перед трансфекцією клітини промивали DPBS, доповненим 2 мМ EDTA, потім додавали 20 мл звичайного середовища DMEM без додавання FBS або антибіотиків. 20 мкг лінеаризованої ДНК конструкцій pcDNA3.1/6PHU5 і pcDNA3.1/6PHU3 (описаних у прикладі 9.а),

15 розбавляли в 0,5 мл звичайного середовища DMEM/F-12. 75 мкл розчину лінійного PEI при концентрації 1 мг/мл (поліетиленімін; Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany) додавали в розведену ДНК і енергійно перемішували на вортексі. Через 15 хв. інкубації за кімнатної температури (RT) у клітини краплями додавали комплекси ДНК/PEI, чашки для клітинних культур обережно перемішували обертотним рухом і потім інкубували при 37 °C, 5 % CO₂. Через

20 24 год після трансфекції середовище міняли. Селекцію трансфікованих клітин починали через 48 год після трансфекції за допомогою сульфату G418 (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) у кінцевій концентрації 0,8 мг/мл. G418 безупинно додавали в культуральне середовище для вирощування клітин.

с. Одержання в малому масштабі білків 6PHU5 і 6PHU3 bi-scFv за допомогою поліклональних клітин HEK293

Білки 6PHU5 і 6PHU3 bi-scFv одержували в малому масштабі й очищали із супернатантів поліклональних клітин HEK293 для порівняння *in vitro*.

5 Коротко, у конфлюентному стані супернатант без FBS збирали з поліклональних клітинних ліній, описаних у прикладі 9.b, і фільтрували через фільтруючу насадку з діаметром пор 0,2 мкм Minisart (Sigma-Aldrich, Germany), використовуючи шприц. Потім білки bi-scFv очищали в малому масштабі із супернатантів клітинних культур на спин-колонках Ni-NTA відповідно до протоколу виробника (Qiagen, Hilden, Germany). Концентрації білків bi-scFv визначали шляхом вимірювання поглинання при 280 нм за допомогою Nanodrop 2000c, враховуючи коефіцієнт екстинкції й молекулярну масу – визначені за допомогою інструмента ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)- білків 6PHU5 і 6PHU3 bi-scFv. Очищені білки зберігали при 4 °C для негайного використання.

15 Білки bi-scFv тестували шляхом піддавання електрофорезу в поліакриламідному гелі з наступним фарбуванням кумаси й вестерн-блот-аналізом, виконаним з використанням стандартних процедур (Current Protocols in Protein science, 2012). Очищені в малому масштабі білки розділяли на NuPage Novex 4-12 % Bis-Tris Gels (Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). Потім гелі фарбували розчином кумаси брильянтовим синім у відповідності зі стандартними процедурами (Current Protocols in Protein Science, 2012) для детекції білків 6PHU5 і 6PHU3 bi-scFv, і інших білків, що містяться в супернатанті клітинної культури. Вестерн-блот аналіз виконували для специфічної детекції білків 6PHU5 і 6PHU3 bi-scFv за допомогою їх 6xHis-мітки. Коротко, після блотинга білків на PVDF мембрані й блокування PBST/3% сухим молоком мембрани інкубували протягом 1 год при 4 °C з первинним антитілом Anti-His Epitope-Tag (Dianova GmbH, Hamburg, Germany), розведеним у співвідношенні 1:500 у блокувальному буфері. Після промивання блокувальним буфером мембрани інкубували з Fc-специфічним вторинним козячим-анти-мишачим IgG антитілом, кон'югованим з пероксидазою, (Sigma Aldrich, Germany) у розведенні 1:10000 у блокувальному буфері протягом 1 год при 4 °C. Після повторного промивання блокувальним буфером сигнали визуалізували за допомогою Supersignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) і записували на Imagequant LAS 4000 Imager (GE Healthcare life sciences, Munich, Germany). Сигнали білків bi-scFv детектували в діапазоні від 50 і 60 kd, отримані при порівнянні із внутрішнім стандартом молекулярної маси.

d. Одержання у великому масштабі білків 6PHU3 bi-scFv за допомогою поліклональних клітин HEK293

35 Поліклональну клітинну лінію-продуцент вирощували в 10-шаровій клітинній фабриці (Nunc, Roskilde, Denmark) в DMEM/F-12 Glutamax, доповненого 10 % FBS і 0,5 % пеніциліну-стрептоміцину й 0,8 мг/мл G418 (усі реагенти від фірми Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) відповідно до інструкцій виробника. На конфлюентній стадії клітини промивали DPBS і середовище заміняли на DMEM/F-12 з антибіотиками, але без FBS. Клітинний супернатант, що містить білок 6PHU3 bi-scFv, збирали кожні 3-5 днів аж до 3 тижнів. Супернатант фільтрували за допомогою 500 мл Steritop Filter Units (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) і зберігали при 4 °C до FPLC-Фільтрації.

45 Перед FPLC-фільтрацією присутність bi-scFv у супернатанті клітинних культур тестували за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі з наступним фарбуванням кумаси й вестерн-блот аналізом, виконаним за допомогою стандартних процедур, як коротко описано в прикладі 9.c.

e. Очищення й кількісне визначення білка 6PHU3 bi-scFv

50 Клітинний культуральний супернатант поліклональних клітин HEK293, що містить білка 6PHU3 bi-scFv (описано в прикладі 9.b), піддавали афінній хроматографії з іммобілізованим металом (IMAC) з використанням стандартної процедури (Current Protocol in Protein Science, 2012). Коротко, супернатант клітинної культури наносили на стовпчик His Trap FF 5 мл, з'єднаний із системою AKTA Purifier 10 FPLC (обидва від фірми GE Healthcare Life Science, Munich, Germany). Промивний буфер PBS містив 10 мМ імідазола, PBS-буфер для елюювання містив 500 мМ NaCl, 50 мМ NaH₂PO₄ і 250 мМ імідазола, pH обох буферів доводили до 7,4. Елюювання проводили з використанням східчастого градієнта. Елюований білок 6PHU3 bi-scFv негайно діалізували проти 1x PBS з використанням Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassette 10K MWCO (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Після PBS діалізу bi-scFv діалізували проти 200 мМ аргінінового буфера (L-аргінін-моногідрохлорид; Roth, Karlsruhe, Germany) на основі H₂O.

60 Концентрацію bi-scFv визначали шляхом вимірювання поглинання при 280 нм за допомогою

Nanodrop 2000c с обліком коефіцієнта екстинкції й молекулярної маси білка 6PHU3bi-scFv. Очищений білок розділяли на аліквоти і зберігали при -80 °C для тривалого зберігання або при 4 °C для негайного використання.

Якість і чистоту білка 6PHU3 bi-scFv тестували шляхом фарбування кумаси й вестерн-блот-аналізу, як описано в прикладі 9.с. BSA у стандартному розведенні включали в процедуру фарбування кумаси для приблизного підтвердження концентрації, обмірюваної за допомогою Nano Drop (дані не показані).

Приклад 10: Ефективність кандидатів 6PHU5 і 6PHU3 bi-scFv, що направлено впливають на CLDN6

а. Мікроскопічний аналіз Т-клітин, переспрямованих на клітини-мішені за допомогою білків 6PHU5 і 6PHU3 bi-scFv

Для візуалізації перенаправлення ефекторних клітин на CLDN 6-які експресують клітини-мішені за допомогою білків 6PHU5 і 6PHU3 bi-scFv за допомогою мікроскопічного аналізу, виконували аналіз на цитотоксичність in vitro. Очищені на колонці Ninta білки 6PHU3 і 6PHU5 bi-scFv (дивися приклад 9.с) використовували для порівняння цих двох варіантів відповідно до їхньої ефективності. Використовували лінію клітин-мішеней, клітинну лінію тератокарциноми яєчників PA-1, яка ендogenно експресує високі рівні людського CLDN6.

Людські ефекторні клітини виділяли зі свіжовідібраної людської крові здорових донорів згідно зі стандартними процедурами (Current Protocols in Protein Science, 2012): коротко, кров розводили DPBS, пошарово наносили на Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany) і центрифугували. Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) збирали з інтерфази, промивали холодним DPBS, доповненим 2 мМ EDTA, і підраховували. Людські Т-клітини потім відокремлювали від PBMC шляхом магнітно-активованого поділу клітин (MACS) за допомогою набору Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany) згідно інструкцій виробника.

1×10^5 клітин PA-1 на лунку засівали в тканинні культуральні 6-лункові планшети. Людські клітини готували, як описано вище, і додавали в співвідношенні ефектора до мішені (Е:Т) 5:1. Середовище MEM, доповнене 10% термоінактивованої FBS, 5% пеніциліну-стрептоміцину, 1х NEAA, 1 мМ бікарбонату натрію й 1 мМ пірувата натрію (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany), використовували для всіх клітин і кінцевий обсяг кожної лунки доводили до 2 мл. Використовувана в даному аналізі концентрація білка bi-scFv склала 50 нг/мл. Контрольні зразки містили клітини-мішені або тільки Т-клітини без білка bi-scFv. Тканинні культуральні планшети потім інкубували при 37 °C, 5 % CO₂. У ході аналізу проводили безперервне спостереження на інвертаційному мікроскопі Wilovert S (Hund, Wetzlar, Germany) в інтервалі від 6 год до 24 год спільної інкубації. Значні ефекти відносно утворення кластерів Т-клітин на клітинах-мішенях, формування імунологічного синапса й загибель клітин-мішеней у присутності білків 6PHU5 і 6PHU3 bi-scFv спостерігали через 24 год і робили знімки за допомогою інвертаційного мікроскопа Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japan). Обидва білка bi-scFv показали сильну агрегацію Т-клітин і загибель клітин-мішеней, як показано на фігурі 12.

А. Активація Т-клітин, опосередкована білками 6PHU5 і 6PHU3 bi-scFv

Для детекції активації Т-клітин і визначення відмінностей в ефективності двох варіантів bi-scFv, специфічних відносно CLDN6, використовували аналіз активації Т-клітин на основі FACS. Маркер ранньої активації CD69 і маркер пізньої активації CD25 було вибрано для фарбування антитіл, кон'югованих із флуоресцентними мітками. Для детекції людських Т-клітин у суміші клітин-мішеней і Т-клітин, проводили фарбування CD3 на Т-клітинах.

У цілому, були вибрані умови аналізу, зазначені вище (Приклад 10.а). Коротко, клітини-мішені PA-1, які ендogenно експресують CLDN6, засівали людськими Т-клітинами в співвідношенні Е:Т, рівному 5:1, в 2 мл повного середовища, і білки 6PHU5 і 6PHU3 bi-scFv додавали при концентрації в діапазоні 5-200 нг/мл. Контрольні зразки містили тільки клітини-мішені або Т-клітини разом з білками bi-scFv або без них. Через 24 год і 48 год Т-клітини збирали шляхом споліскування й переносили в круглодонні пробірки обсягом 5 мл (BD Falcon, Heidelberg, Germany). Клітини центрифугували й промивали DPBS. Для фарбування клітин використовували мишачі антилюдські CD3-FITC, мишачі антилюдські CD69-APC і мишачі антилюдські CD25-PE антитіла (усі антитіла фірми BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Клітинний осад ресуспендували в 50 мкл FACS-Буфера (DPBS, доповнений 5% FBS) антитіла, що містить, флуоресцентними із флуоресцентними мітками, і 2 мкл 7-AAD (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Після інкубації протягом 20 хв. при 4 °C у умовах темряви зразки промивали 4 мл DPBS, і клітинний осад ресуспендували в 200 мкл FACS-буфера. Зразки зберігали на льоді й в умовах темряви протягом вимірювання за допомогою проточного цитометра Facscanto II (обоє від фірми BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Результати

аналізу оцінювали за допомогою програмного забезпечення Flowjo (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

Обидва варіанти CDLN 6-специфічних bi-scFv привели до ефективної активації Т-клітин аж до 60 %. Варіант 6PHU3 (bi-scFv CD3 x CLDN6) був більш сильним у діапазоні низьких концентрацій 5-10 нг/мл (дивися також фігуру 13), і був, отже, вибраний для подальших досліджень.

Приклад 11: З'єднувальна здатність 6PHU3bi-scFv

Аналіз зв'язування FACS

Для оцінки з'єднувальної здатності фрагментів білка 6PHU3 bi-scFv, що направлено впливають на CLDN6 і CD3, використовували аналіз методом проточної цитометрії. Клітини PA-1 і OV-90, які ендogenно експресують CLDN6, використовували для вивчення сайту анти-CLDN6, і людські Т-клітини використовували для вивчення сайту анти-CD3. CLDN 6-негативні клітини NugC4 використовували як контрольні клітини.

Для вивчення з'єднувальної здатності анти-CLDN6, CLDN 6-позитивні клітини (PA-1, OV-90) і CLDN 6-негативні клітини (NugC4) трипсинізували, промивали повним середовищем і потім DPBS. Усі промивні стадії виконували шляхом центрифугування при 1200 об/хв. протягом 6 хв. при 4 °С. 1×10^5 клітин переносили в круглодонні пробірки обсягом 5 мл і інкубували з 0,01-10 мкг/мл FPLC-очищеного білка 6PHU3 або контрольного білка 1BiMAB bi-scFv в FACS-буфері протягом 30 хв. при 4 °С. Клітини промивали 2 мл FACS-буфера й потім інкубували з 3,3 мкг/мл моноклонального антитіла Anti-His Epitope-Tag (Dianova GmbH, Hamburg, Germany) протягом 30 хв. при 4 °С. Після промивання 2 мл FACS-буфера клітинний осад інкубували з APC-кон'югованим козячим-анти-мишачим вторинним антитілом (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, England) у розведенні 1:200 в FACS-Буфері протягом 20 хв. при 4°C у умовах темряви. Клітини промивали двічі 2 мл FACS-буфера й на закінченні ресуспендували в 150 мкл FACS-буфера, доповненого 1 мкг/мл PI (Sigma Aldrich, Germany) для контрастного фарбування загіблх клітин. Негативні контрольні зразки включали тільки вторинне козяче-анти-мишаче APC антитіло. Як позитивний контроль 10 мкг/мл моноклонального CLDN 6-специфічного антитіла mCLDNab фарбували вторинним козячим-анти-людським APC антитілом (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, England) і підходящим контрольним вторинним антитілом.

Зразки вимірювали за допомогою проточного цитометра Facscalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) і аналізували за допомогою програмного забезпечення Flowjo Software (Tree Star, San Carlos, CA, USA). Інтенсивність сигналу 10 мкг/мл 6PHU3 була в 4-9 раз нижче, чим позитивного контролю mCLDN6ab (дивися фігуру 15A). Неспецифічне зв'язування 6PHU3 з CLDN 6-негативною клітинною лінією NugC4 не було детектоване (Фіг. 15C).

Для вивчення з'єднувальної здатності анти-CD3 плеча білка 6PHU3 bi-scFv використовували людські Т-клітини. 5×10^5 Т-клітин переносили в 5 мл пробірки із круглим дном і інкубували з FPLC-очищеним білком 6PHU3 при концентрації в діапазоні 100 нг/мл – 10 мкг/мл в FACS-буфері протягом 30 хв. при 4 °С. Наступна процедура фарбування була такою ж, як описано вище. Контрольні зразки включали тільки вторинне козяче-анти-мишаче APC антитіло й моноклональне антитіло Anti-His Epitope-Tag плюс вторинне козяче-анти-мишаче PE антитіло. Вимірювання і аналіз виконували, як описано вище. Значний сигнал був отриманий при 100 нг/мл 6PHU3 (дивися також фігуру 15B).

Приклад 12: Дослідження залежної від мішені активації Т-клітин за допомогою bi-scFv 6PHU3

Аналіз на цитотоксичність виконували, як описано в прикладі 10.a й b. Коротко, клітини-мішені PA-1, які ендogenно експресують CLDN6, засівали з людськими Т-клітинами в співвідношенні Е:Т, рівному 5:1, в 2 мл повного середовища, і білок 6PHU3 bi-scFv додавали в концентрації в діапазоні 0,001-1000 нг/мл. Для аналізу залежності від мішені активації Т-клітин, опосередкованої bi-scFv, Т-клітини засівали без клітин-мішеней, але інкубували з такими ж концентраціями bi-scFv 6PHU3, що й зразки клітин-мішеней з Т-клітинами. Через 24 год і 48 год Т-клітини збирали й переносили в 5 мл пробірки із круглим дном (BD Falcon, Heidelberg, Germany). Фарбування клітин і аналіз виконували, як описано в прикладі 10.b.

Як показано на фігурах 16A і B, активації Т-клітин, опосередкованої 6PHU3, не було детектовано під час відсутності клітин-мішеней, що вказує на пряму строгу залежність функціональності bi-scFv від мішені. Значна активація Т-клітин виникала тільки з 0,1 нг/мл 6PHU3 через 48 год.

Приклад 13: Визначення EC50 6PHU3 bi-scFv в аналізі на цитотоксичність in vitro

Аналіз на цитотоксичність із використанням люциферази

Для визначення половини максимальної ефективної дози білка 6PHU3 bi-scFv ряд титрувань 6PHU3 тестували в аналізі на цитотоксичність із використанням люциферази in vitro.

Стабільно експресуючі люциферазу клітини PA-1 і людські Т-клітини в співвідношенні Е:Т, рівному 5:1, інкубували з концентраціями білка 6PHU3 bi-scFv у діапазоні від 1 пг/мл до 1 мкг/мл (10 кроків) або без 6PHU3 для визначення величин L_{min} .

Клітинні культуральні мікропланшети інкубували протягом 24 год і 48 год при 37°C, 5% CO₂.
 5 Для аналізу 50 мкл водяного розчину, що містить 1 мг/мл люциферина (BD Monolight, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) і 50 мМ HEPES додавали в кожну лунку й планшети потім інкубували протягом 30 хв. в умовах темряви при 37°C. Люмінесценцію, що виникає в результаті окиснення люциферина люциферазою, яка експресує життєздатні клітини, вимірювали за допомогою мікропланшетного рідера Infinite M200 Tecan (Tecan, Männedorf, Switzerland).
 10 Відсоток специфічного лізису клітин-мішеней розраховували за наступною формулою: % специфічного лізису = $[1 - (\text{люмінесценція}_{\text{тестованій зразок}} - L_{max}) / (L_{min} - L_{max})] \times 100$, де «L» означає лізис. L_{min} належить до мінімального лізису під час відсутності bi-scFv, і L_{max} до максимального лізису (рівному величині спонтанної люмінесценції) під час відсутності bi-scFv, досягнутому шляхом додавання Triton X-100 (у кінцевій концентрації 2 %).

15 Максимальний лізис був досягнутий через 48 год за допомогою 1-10 нг/мл 6PHU3, певна величина EC50 через 48 год складала приблизно 10 пг/мл (дивися також фігуру 17). Результат цього аналізу в значній мірі залежить від сили людських Т-клітин, яка різнилася відповідно до імунного статусу донора, що також було описано в інших роботах (дивися, наприклад, Lutterbuese, R et al., 2010, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 2010 Jul 13;107(28):12605-10). Таким чином,
 20 відхилення величини EC50 білка 6PHU3 bi-scFv на фактор 3 спостерігалось в ході винаходу.

Приклад 14: Ефективність у мишачій моделі ксенотрансплантата

Для дослідження терапевтичного потенціалу білка 6PHU3 bi-scFv *in vivo* був вибраний мишачий штам NOD.Cg-Prkdcid IL2rgtm1wj/Szj або короткий NSG (Jackson laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Для описаного дослідження щеплення людських ефекторних клітин і
 25 людських Т-лімфоцитів у мишей необхідно для дослідження ефектів Т-клітинного захоплення bi-scFv *in vivo*. Через повну відсутність В-, Т- і NK-клітин мишачий штам NSG є підходящим для цього виду досліджень ксенотрансплантата. Мишача модель із привитими, головним чином, людськими Т-клітинами після ін'єкції PBMC становить частину винаходу.

а. Лікування з відстроченим початком пухлин на пізній стадії, високоекспресуючих CLDN6, у
 30 мишей за допомогою білка 6PHU3bi-scFv

В описаному дослідженні 25 мишачих самок і 25 мишачих самців лінії NSG у віці 8-11 підшкірно інокулювали 1×10^7 клітин PA-1, ендогенно експресуючих високі рівні людського CLDN6. Через 5 днів після інокуляції пухлинних клітин мишей розподіляли відповідно до обсягу їх пухлин на лікувальні групи, при цьому миші, у яких ріст пухлини був відсутній, були виключені.
 35 У той же день моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC) виділяли з людської крові здорових донорів методом центрифугування в градієнті щільності фікола й використовували як ефекторні клітини *in vivo*. 2×10^7 PBMC, розведені в 200 мкл DPBS, ін'єктували інтраперитонеально в день виділення експериментальним лікувальним групам, позначеним «PBMC». Лікувальні групи, позначені «PBS», одержували 200 мкл звичайного DPBS
 40 інтраперитонеально й служили як контроль без людських ефекторних клітин. За допомогою контрольних груп «PBS» можна досліджувати потенційний ефект на ріст пухлини самого 6PHU3 або будь-які потенційні побічні ефекти, які викликані 6PHU3 або носієм, але не людськими ефекторними клітинами, проти мишачої тканини (тобто реакція трансплантат проти хазяїна, викликана людськими ефекторними клітинами, проти мишачої тканини). Група «PBS/носії»
 45 включала 8 мишей (n=8), «PBS/6PHU3» 8 мишей (n=8), «PBMC/носії» 7 мишей (n=7), «PBMC/6PHU3» 7 мишей (n=7) і «PBMC/1BiMAB» 8 мишей (n=8). Терапію починали через 7 днів після застосування DPBS або PBMC: групи «PBS/6PHU3», «PBMC/6PHU3» і «PBMC/1BiMAB» одержували інтраперитонеально 5 мкг очищеного білка 6PHU3 bi-scFv або 1BiMAB, розведеного в 200 мкл DPBS на тварина. Групи «PBS/носії» і «PBMC/носії» одержували
 50 інтраперитонеально 200 мкл буферного носія (200 мМ L-аргініну моногідрохлориду, розчиненого в H₂O, стерильно фільтрованого), розведеного в DPBS. Лікувальні групи коротко описано в таблиці 3. Терапію проводили на щоденній основі протягом 26 днів. Двічі в тиждень вимірювали розмір пухлин за допомогою цифрового каліброваного каліпера, і обсяг пухлин розраховували за формулою $\text{мм}^3 = \text{довжина} \times \text{ширина} \times (\text{ширина}/2)$. На фігурах 18А і В показане
 55 інгібування росту пухлини у всіх мишей групи «PBMC/6PHU3» за допомогою антитіла в присутності людських ефекторних клітин. Мишей забивали шляхом зсуву шийних хребців, коли обсяг пухлини досягав 1500 мм³, або у випадку серйозних клінічних проявів (у деяких мишей спостерігалися симптоми реакції трансплантат проти хазяїна).

Таблиця 6

Лікувальні групи

Лікувальна група (G)	Кіл-ть мишей	Ефекторні клітини	Білок bi-scFv	мкг білка bi-scFv/миша
G1	8	-	-	-
G2	8	-	6PHU3	5
G3	7	PBMC	-	-
G4	7	PBMC	6PHU3	5
G5	8	PBMC	1Bimab	5

b. Визначення впливу терапії на масу тіла

- Масу тіла кожної миші вимірювали два рази в тиждень за допомогою лабораторних ваг.
 5 Жодна з мишей до будь-якої групи не показала втрату маси протягом лікування (дані не показані).

c. Консервація тканини й виділення спленоцитів

- Після забиття мишей пухлини видаляли, і тканину відразу ж фіксували в 10 мл 4 % Roti-Histofix (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) для імуногістохімічного аналізу. Крім того, селезінки видаляли для детекції приживлення людських клітин за допомогою проточної цитометрії.
 10 Виділення спленоцитів виконували відразу ж після видалення селезінок, продавлюючи їх через клітинний фільтр із розміром гнізд 70 мкм, поміщений у реакційну пробірку обсягом 50 мл зі стерильним поршнем 3-5 мл шприца, і повторного промивання клітинного фільтра теплим DPBS. Виділені спленоцити центрифугували, DPBS декантували й осад спленоцитів ресуспендували в 1 мл термоінактивованої фетальної бичачої сироватки, доповненої 10 % 10 %
 15 DMSO. Зразки негайно заморожували при -80 °C і зберігали до одержання зразків спленоцитів від усіх мишей.

d. Аналіз приживлення людських Т-лімфоцитів у мишачих селезінках

- Спленоцити від усіх мишей збирали й заморожували, як описано в Прикладі 14.с. Повну колекцію зразків спленоцитів відтавали одночасно, усі клітини промивали двічі теплим DPBS, і 1×10^6 спленоцитів на зразок інкубували з антитілами, кон'югованими із флуоресцентними мітками, протягом 20 хв. при 4 °C в умовах темряви для детекції приживлення людських клітин шляхом фарбування анти-CD45 і процентного вмісту людських клітин шляхом фарбування анти-CD3, анти-CD4 і анти-CD8. Аналіз методом проточної цитометрії проводили на проточному цитометрі FacsCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Приживлення людських Т-клітин в обох групах «PBMC» може підтверджуватися високим процентним вмістом двічі CD45-CD 3-
 20 позитивних спленоцитів, як показано на фігурі 18D.

e. Імуногістохімія для визначення експресії клітин-мішеней і Т-клітинної інфільтрації

- Пухлини фіксували після видалення з використанням 4% буферного розчину формальдегіду (Roti-Histofix, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) протягом 48 год при 4°C. Фіксовані пухлини розділяли на дві частини й переносили в автоматизований вакуумний тканинний процесор ASP200 для дегідрування (Leica Microsystems Gmbh, Wetzlar, Germany) з наступним розміщенням у парафін (Paraplast, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) за допомогою парафінової диспенсерної станції MPS/C (Slee Medical Gmbh, Mainz, Germany). Для імуногістохімічних фарбувань зрізи товщиною 3 мкм фіксованих у формаліні й розміщених у парафін тканин одержували з використанням роторної мікротомі RM2255 (Leica Microsystems Gmbh, Wetzlar, Germany). Депарафінізацію й регідрування виконували в білінійному обладнанні для фарбування Stainmate Max (Thermo Ficher Scientific, Rockford, IL, USA) з наступним відокремленням термоіндукованого епітопа в 10 мМ лимонному буфері, pH 6, з 0,05 % Tween 20 протягом 10 хв. при 120 °C. Активність ендогенних пероксидаз гасили шляхом занурення в 0,1 % розчин H₂O₂ в PBS протягом 15 хв. (Carl Roth) з наступною інкубацією з 10% козячою сироваткою в PBS (PAA Laboratories Gmbh/GE Healthcare, Pasching, Austria) протягом 30 хв. для блокування неспецифічних сайтів зв'язування антитіла. ТАА клаудина 6 детектували шляхом інкубації з поліклональним первинним антитілом Anti-Mouse Claudin 6 (C) Rabbit (lbi-america, Minneapolis, MN, USA) при 4 °C протягом ночі; Т-клітини детектували на послідовних зрізах з використанням поліклонального анти-CD3 AB (Abcam, Cambridge, UK) при 4 °C протягом ночі з наступною інкубацією з анти-кролячим вторинним антитілом, кон'югованим з полімером Bright Vision HRP (Immunologic, Duiven, Netherlands). Реакції зв'язування візуалізували з використанням набору Vector Novared kit (Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK) відповідно до інструкцій виробника з наступним контрастним фарбуванням гематоксином (Carl Roth),
 30
 35
 40
 45

дегідруванням і розміщенням у середовище. Аналізи й реєстрацію виконували з використанням установки для візуалізації Axio Imager M2 або сканера Mirax scanner (обоє від фірми Carl Zeiss Microscopy GmbH, Goettingen, Germany).

Як показано на фігурі 19, найвищу інфільтрацію Т-клітин детектували в пухлинах групи «РВМС/6РНУ3» шляхом CD-3 фарбування, особливо в граничних областях експресії CLDN6. Картина гетерогенної експресії TAA CLDN6 у контрольних групах (фігури 19А, В, С і D) змінювалася в більш компактні області експресії CLDN6 у пухлинах групи «РВМС/6РНУ3» у результаті терапії (Фіг. 19D).

Приклад 15: Створення й тестування біспецифічних з'єднувальних агентів, що направлено впливають на CLDN18.2 і CD3

а. Вихідні послідовності, дизайн конструкцій bi-scFv і клонування матрицю вектора

Готовили конструкції біспецифічного тандемного одноланцюгового антитіла (bi-scFv), що містять з'єднувальні домени, специфічні відносно компонента CD 3-епсилон людського Т-клітинного рецептора, і пухлиноасоційованих антигенів (TAA). Відповідні варіабельні області важкого ланцюга (VH) і відповідні варіабельні області легкого ланцюга (VL) для кожної конструкції специфічним чином були розташовані в напрямку від 5'- до 3'-кінця в наступному порядку:

pST1-hAgKozak-VH^αCLDN18.2-VL^αCLDN18.2-VH^αCD3- VL^αCD3-His-2hBgUTR-A120
(1BiMAB, 18RHU5, no. 1-5)

20 pST1-hAgKozak-VH^αCD3-VL^αCD3-VH^αCLDN18.2-VL^αCLDN18.2-His-2hBgUTR-A120
(18RHU3, no. 6-10)

У таблиці 7 коротко описані всі конструкції bi-scFv, специфічні відносно TAA CLDN18.2 і PLAC1, які були генеровані в рамках винаходу. Конструкції bi-scFv генерували шляхом генного синтезу Geneart AG (Geneart/Life Technologies GmbH, Regensburg, Germany) з використанням послідовностей VH і VL відповідних антитіл. Оптимізації кодонів, такі як Homo sapiens (HS) або Mus musculus (MM) або клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), були реалізовані за допомогою програмного забезпечення GeneArt's GeneOptimizer®, і перераховані в таблиці 7. Інформація зі специфічності, походження послідовностей з моноклональних антитіл (MAB), використанню кодону, додаткових відмітних ознак послідовностей і посиленням на всі, що застосовуються домени коротко описано в таблиці 8. Походження послідовностей варіабельного домена відповідних антитіл CD3 перераховано в таблиці 8. Завдяки високій гомології людських і мишачих TAA, можуть бути використані послідовності VH і VL того самого анти-TAA для генерації конструкцій bi-scFv для мишачих аналізів, але в комбінації з VH, VL послідовностями мишачого специфічного клону 145-2C11 анти-CD3 антитіла.

Клонування ДНК і конструювання експресійних векторів проводили у відповідності зі стандартними процедурами (Sambrook, 1989), добре відомими фахівцям в даній області. Коротко, основні ДНК-послідовності bi-scFv містили сайт рестрикції 5'-BsmBI і 3'-XhoI для клонування в рST1-плазмиди. Послідовність сигналу секреції вводили на 5' кінці (вище) послідовності bi-scFv для секреції білка. Послідовність, що кодує гнучкий гліцин-сериновий пептидний лінкер, що складається з 15-18 амінокислот, вставляли для з'єднання доменів VH і VL для композиції одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіла (scFv), з яких один зв'язується з CD3 і інший з TAA. Для формування біспецифічного одноланцюгового антитіла послідовності двох доменів scFv з'єднували послідовністю, що кодує короткий пептидний лінкер (GGGGS). Разом із цією послідовністю лінкера сайт рестрикції BamHI вводили для обмінів доменів scFv для клонування наступних конструкцій bi-scFv. Коротко, 5' scFv-домени заміняли на рестрикцію BsmBI і XhoI і 3' scFv-домени на рестрикцію BamHI і XhoI. С-кінцеву 6 xHis-мітку використовували для аналізів на виявлення трансльованого білка. Нетрансльовані області людського альфа-глобін 5' і людського бета-глобін 3' послідовності bi-scFv були присутні у векторі рST1 (дивися більш докладно в WO2007/036366A2: Waggoner, S. et al. (2003) Exp. Biol. Med. (Maywood) 228 (4), pp. 387-395).

Для одержання вектора реплікона 1BiMAB повну послідовність 1BiMAB, включаючи сигнал секреції й 6xHis-мітку, субклонували в напрямку від 3' від субгеномного промотору вектора реплікона вірусу лісу Семліки (pSFV), люб'язно наданого K. Lundstrom (Lundstrom, K. et al. (2001) Histochem. Cell Biol. 115 (1), pp. 83-91; Ehrenguber, M.U. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (12), pp. 7041-7046).

Усі конструкції підтверджували шляхом секвенування через сервіс по секвенуванню одиночних прочитань (MWG single read sequence service) (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) і використовували конструкції тільки із правильною послідовністю й полі(А)-хвостом, що складаються із більш ніж 100 аденінів, для in vitro транскрипції РНК.

Схеми конструкцій представлені також на фігурі 20А.

Таблиця 7

Короткий опис конструкцій мРНК-матриць біспецифічного одноланцюгового антитіла, специфічного відносно ТАА й CD3

Внутрішнє найменування	ТАА	Специфічність	5'-VH-VL	3'-VH-VL	Використання кодонів
1Bimab	CLDN18.2	людина	mcldn18.2ab	TR66	HS
no.1	CLDN18.2	миша	mcldn18.2ab	145-2C11	CHO
no.2	CLDN18.2	людина	mcldn18.2ab	UCHT1-HU	CHO
no.3	CLDN18.2	людина	mcldn18.2ab	UCHT1	CHO
no.4	CLDN18.2	людина	mcldn18.2ab	CLB-T3	CHO
no.5	CLDN18.2	людина	mcldn18.2ab	TR66	CHO
no.6	CLDN18.2	миша	145-2C11	mcldn18.2ab	CHO
no.7	CLDN18.2	людина	UCHT1-HU	mcldn18.2ab	CHO
no.8	CLDN18.2	людина	UCHT1	mcldn18.2ab	CHO
no.9	CLDN18.2	людина	CLB-T3	mcldn18.2ab	CHO
no.10	CLDN18.2	людина	TR66	mcldn18.2ab	CHO
18RHU5	CLDN18.2	людина	mcldn18.2ab	TR66	HS
18RHU3	CLDN18.2	людина	TR66	mcldn18.2ab	HS
18RMU5	CLDN18.2	миша	mcldn18.2ab	145-2C11	MM
18RMU3	CLDN18.2	миша	145-2C11	mcldn18.2ab	MM
контрольне bi-scFv					
no.25	PLAC1	людина	78H11	TR66	CHO

bi-scFv означає біспецифічний одноланцюговий варіабельний фрагмент; CHO, клітини яєчника китайського хом'ячка; HS, Homo-sapiens; HU, гуманізоване; MM, Mus musculus; ТАА, пухлиноасоційований антиген; VH, варіабельний домен важкого ланцюга, VL, варіабельний домен легкого ланцюга.

Таблиця 8

Коротка інформація з конструкції мРНК-матриці bi-scFv

	CD3 з'єднувальний фрагмент		ТАА з'єднувальний фрагмент.					кер
Внутр найм.	Походж mab.	Реак- тивн. Різно- вид.	ТАА	Походж. mab	Реактивн різновид	5'-VH-VL	3' VH-VL	Короткий лін
1Bimab	TR66	люди- на	CLDN18.2	mcldn18.2ab	Людина, миша	mcldn18.2ab	TR66	GGGGS
no.1	145- 2C11	миша	CLDN18.2	mcldn18.2ab	Людина, миша	mcldn18.2ab	145-2C11	SGGGGS
no.2	UCHT1- HU	люди- на	CLDN18.2	mcldn18.2ab	Людина, миша	mcldn18.2ab	UCHT1-HU	SGGGGS
no.3	UCHT1	людина	CLDN18.2	mcldn18.2ab	Людина, миша	mcldn18.2ab	UCHT1	SGGGGS
no.4	CLB-T3	Люди- на	CLDN18.2	mcldn18.2ab	Людина, миша	mcldn18.2ab	CLB-T3	SGGGGS
no.5	TR66	Люди- на	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	mcldn18.2ab	TR66	SGGGGS
no.6	145- 2C11	миша	CLDN18.2	mcldn18.2ab	Люди-на, миша	145-2C11	mcldn18.2ab	SGGGGS
no.7	UCHT1- HU	Люди- на	CLDN18.2	mcldn18.2ab	Люди-на, миша	UCHT1-HU	mcldn18.2ab	SGGGGS
no.8	UCHT1	Люди- на	CLDN18.2	mcldn18.2ab	Людина, миша	UCHT1	mcldn18.2ab	SGGGGS
no.9	CLB-T3	Люди- на	CLDN18.2	mcldn18.2ab	Людина, миша	CLB-T3	mcldn18.2ab	SGGGGS
no.10	TR66	Люди- на	CLDN18.2	mcldn18.2ab	людина, миша	TR66	mcldn18.2ab	SGGGGS
18RHU5	TR66	Люди- на	CLDN18.2	mcldn18.2ab	Людина, миша	mcldn18.2ab	TR66	SGGGGS
18RHU3	TR66	Люди- на	CLDN18.2	mcldn18.2ab	Людина, миша	TR66	mcldn18.2ab	SGGGGS
18RMU5	145- 2C11	миша	CLDN18.2	mcldn18.2ab	Людина, миша	mcldn18.2ab	145-2C11	SGGGGS
18RMU3	145- 2C11	миша	CLDN18.2	mcldn18.2ab	Людина, миша	145-2C11	mcldn18.2ab	SGGGGS
no.25	TR66	Люди- на	PLAC1	78H11	Людина, миша	78H11	TR66	SGGGGS

Продовження Таблица 8

Внутр. найм.	5'-довгий лінкер	3'-довгий лінкер	Сигнал секреції	Викор кодонів	Анти-CD3 mab посилання
1Bimab	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVATATG VHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
no.1	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATG VHS	CHO	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
no.2	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATG VHS	CHO	Shalaby et al., J Exp Med 1992
no.3	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATG VHS	CHO	Beverley et al., Eur J Immunol 1981
no.4	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATG VHS	CHO	Van Lier et al., Immunology 1989
no.5	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATG VHS	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
no.6	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVLTLLK GIQG	CHO	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
no.7	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATG VHS	CHO	Shalaby et al., J Exp Med 1992
no.8	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVLTLLK GIQG	CHO	Beverley et al., Eur J Immunol 1981
no.9	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNFGLSLIFLALILKGV QC	CHO	Van Lier et al., Immunology 1989
no.10	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MEWSWIFLFLSVTT GVHS	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
18RHU 5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVATATG VHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
18RHU 3	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATG VHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
1RPM U5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVATATG VHS	MM	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
18RMU 3	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVLTLLK GIQG	MM	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
no.25	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWLWNLLFLMAAA QSAQA	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987

CHO означає клітини яєчника китайського хом'ячка; HS, Homo sapiens; MAB, моноклональне антитіло; MM, Mus musculus; TAA, пухлиноасоційований антиген.

5 b. Синтез IVT-РНК

Для створення анти-CLDN18.2-специфічних IVT-матриць bi-scFv, плазмиди лінеаризували даунстрим полі(A)-хвоста з використанням ендонуклеази класу IIS. Лінеаризовану матрицю ДНК очищали екстракцією сумішшю фенол/хлороформ і осаджували ацетатом натрію, як описано в літературних джерелах (Holtkamp, S. et al. (2006) *Blood* 108 (13), pp. 4009-4017).

10 Лінеаризовані матриці ДНК піддавали in vitro транскрипції з використанням наборів Megascript Kits (Ambion/Life Technologies, Darmstadt, Germany) відповідно до інструкцій виробника: матриці pST1 транскрибували за допомогою набору Megascript T7 Kit і матриці pSFV за допомогою набору Megascript SP6 Kit. Для реакцій з кеп-аналогом концентрацію GTP зменшували до 1,5 мМ і 6 мМ ARCA, бета-S-ARCA(D1) або в реакцію додавали бета-S-ARCA(D2), синтезований, як описано в літературі (Kowalska, J. et al. (2008) *RNA* 14 (6), pp. 1119-1131; Grudzien, E. et al. (2004) *RNA* 10 (9), pp. 1479-1487; Stepinski, J. et al. (2001) *RNA* 7 (10), pp.

1486-1495). Очищення IVT-мРНК виконували за допомогою набору Megaclear Kit (Ambion/Life Technologies, Darmstadt, Germany) відповідно до інструкції. Концентрацію і якість IVT-РНК оцінювали за допомогою спектрофотометрії й аналізували на біоаналізаторі 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

5 Приклад 16: Активація Т-клітин у відповідь на секрецію bi-scFv клітинами-мішенями, трансфікованими різними CLDN18.2-специфічними IVT-мРНК

Для дослідження функціональності IVT-мРНК CLDN18.2-специфічного bi-scFv клітинну лінію карциноми шлунка NugC4, яка ендегенно експресує порівняно високі рівні людського CLDN18.2 (Sahin, U. et.al. (2008) Clin. Cancer Res. 14 (23), pp. 7624-7634), використовували як клітинну

10 лінію-мішень.
Клітини-Мішені NugC4 – які тестували звичайним способом на експресію ТАА за допомогою FACS-аналізу перед кожним випробуванням – двічі промивали крижаним середовищем X-Vivo 15 (LONZA, Basel, Switzerland) і ресуспендували до щільності 2×10^7 клітин/мл. 250 мкл клітинної суспензії переносили в попередньо охолоджені кювети 0,4 см Gene Pulser/Micropulser Cuvettes (Bio-Rad, Dreieich, Germany) і додавали 20 мкг/мл IVT-мРНК. Використовували наступні IVT-мРНК: 1BiMAB, no. 2, no. 3, no. 4, no. 5, no. 7, no. 8, no. 9 і no. 10. Для більш докладної інформації про варіанти bi-scFv дивися таблиці 7 і 8. Після обережного перемішування клітини трансфікували за допомогою електропоратора BTX ECM 830 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) з використанням наступних умов: 250 В, 2 імпульсу, тривалість імпульсу 12 мс, пауза між імпульсами 40 мс. Відразу ж після електропорації кювети поміщали на лід на короткий проміжок часу, і потім клітинні суспензії переносили в нагріте до кімнатної температури аналітичне середовище (середовище RPMI 1640, доповнене 5% термоінактивованою людською сироваткою АВ, 0,5% пеніциліну-стрептоміцину, 1x NEAA і 1 mM пірувата натрію (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany)) у пробірки обсягом 15 мл. Трансфіковані клітини-мішені підраховували і їх концентрацію доводили до 1×10^5 клітин на мл.

Людські ефекторні клітини виділяли зі щойновзятої крові здорових донорів-людей у відповідності зі стандартними процедурами (Current Protocols in Immunology, 2012): коротко, кров розводили DPBS, наносили на Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany) і центрифугували. Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) збирали з інтерфази, відмивали холодним DPBS, доповненим 2 mM EDTA і підраховували. Людські цитотоксичні Т-клітини виділяли шляхом магнітно-активованого клітинного сортування (MACS) з PBMC за допомогою набору CD8+ T cell Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany) відповідно до інструкцій виробника. Відділені ефекторні клітини тестували звичайним способом на успішне виділення Т-клітин за допомогою FACS-аналізу (CD4, CD8 фарбування). Т-клітини доводили до 5×10^5 клітин на мл в аналітичному середовищі.

1 x 10^5 клітин-мішеней засівали на лунку 6-лункового планшета й людські цитотоксичні Т-клітини додавали до співвідношення Е:Т, рівного 5:1. Кінцевий обсяг на лунку склав 2 мл. Контрольні зразки, що містять ефекторні клітини й клітини-мішені, містили клітини-мішені, секретуючі no.25, chCLDN18.2ab батьківського MAB IgG і білок 1BiMAB як позитивний контроль в кінцевій концентрації 5 нг/мл. Контролі включали тільки піддані електропорації клітини-мішені або тільки Т-клітини з білком 1BiMAB і без нього. Через 48 год Т-клітини й клітини-мішені збирали, мітили й аналізували методом проточної цитометрії. Коротко, усі клітини збирали шляхом обережного зіскрябування за допомогою клітинного шкребка Cell scrapers (Sarstedt AG & Co, Numbrecht, Germany) і переносили в 5 мл пробірки із круглим дном (BD Falcon, Heidelberg, Germany). Клітини центрифугували й відмивали DPBS. Для фарбування клітин використовували мишачі антилюдські CD3-FITC, мишачі антилюдські CD69-APC і мишачі антилюдські CD25-PE (усі антитіла фірми BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Клітинний осад ресуспендували в 50 мкл FACS-буфера (DPBS, доповнений 5% FBS) що містить антитіла, кон'юговані із флуоресцентними мітками. Після інкубації протягом 20 хв. при 4 °C в умовах темряви зразки промивали 4 мл DPBS і клітинний осад ресуспендували в 200 мкл FACS-буфера, що містить йодид пропідію (PI) (Sigma Aldrich, Germany) у кінцевому розведенні 1:1000 для детекції загинулих клітин. Зразки зберігали на льоду й в умовах темряви до вимірювання. Аналіз виконували з використанням приладу Facscalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Результати аналізу оцінювали за допомогою програмного забезпечення Flowjo software (Tree Star, San carlos, CA, USA).

55 Як показано на фігурі 21А, кожний CLDN18.2-специфічний IVT-мРНК викликав секрецію білка bi-scFv, як видно з ефективною активації Т-клітин. Найбільш сильними варіантами лише з незначними розбіжностями в Т-клітинній активації були no.5 > no.8 > no.10 > no.3 > 1BiMAB у порядку зменшення. Усі ці варіанти приводили до загальної активації Т-клітин, що становить

60 більше 55%, тоді як варіанти no.2, no.4, no.7 і no.9 приводили до загальної активації Т-клітин,

що становить від 40 до 50%.

Специфічний лізис клітин-мішеней розраховували за формулою: % лізис = (% PI⁺ клітин-мішеней зразок - % PI⁺ клітин-мішеней ЕР порівняння), де «зразок» означає спільно інкубовані ефекторні клітини й клітини-мішені, і «ЕР порівняння» тільки піддані електропорації клітини-мішені кожної індивідуальної електропорації IVT-mRNA. Як показано на фігурі 21В, лізис клітин-мішеней вище 65% був досягнутий варіантами 1BiMAB > no.5 > no.8 > no.3 у порядку зменшення. Інші варіанти опосередковували лізис клітин-мішеней, що становить 55-64%. Найбільш сильний CLDN18.2-специфічний bi-scFv містить домени V_H і V_L TR66 (1BiMAB, no.5, no.10) або UCHT1 (no.3, no.8). Відносно орієнтацій доменів значної відмінності не спостерігалось на відміну від варіантів білка bi-scFv (дивися приклад 3). Відповідно до досліджень білка, IVT-mPHK, що кодує 1BiMAB, був вибраний для наступних досліджень.

Конструкції 18RHU5 і 18RHU3 (дивися таблиці 7 і 8) порівнювали в більш пізній момент часу з 1BiMAB. Ефективність 18RHU5 була еквівалентна 1BiMAB, 18RHU3 був менш сильним (дані не показані).

Приклад 17. Мікроскопічний аналіз Т-клітин, переспрямованих на клітини-мішені, секретуючі CLDN18.2-специфічний 1BiMAB bi-scFv

Порядок проведення аналізу по суті був таким, як описано в прикладі 2.а.

Людські цитотоксичні Т-клітини відокремлювали, використовуючи MACS, від PBMC, виділених зі свіжовідібраної крові, за допомогою набору CD8⁺ T Cell Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany) відповідно до інструкцій виробника.

Клітини-мішені NugC4 готували й трансфікували, як описано в прикладі 16, за винятком того, що використовували 80 мкг/мл 1BiMAB IVT-mPHK або 80 мкг/мл no.25 IVT-mPHK. Трансфіковані клітини-мішені підраховували й доводили до 2×10^5 клітин на мл. 1×10^4 клітин-мішеней засівали в кожну лунку 96-лункового планшета й людські цитотоксичні Т-клітини додавали при співвідношенні Е:Т, рівному 5:1. Кінцевий обсяг на лунку склав 100 мкл. Контрольні зразки містили тільки трансфіковані клітини-мішені для підтвердження лікувальних властивостей після електропорації й контрольні трансфіковані bi-scFv клітини-мішені з ефекторними клітинами. Тканинні культуральні планшети потім інкубували при 37°C, 5% CO₂. Значні ефекти відносно утворення кластерів Т-клітин на клітинах-мішенях, формування імунологічного синапса й загибелі клітин-мішеней у зразках, що містять трансфіковані 1BiMAB клітини-мішені, спостерігали через 24 год і записували за допомогою інвертаційного мікроскопа Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japan). Утворення кластерів Т-клітин або лізису клітин-мішеней не спостерігалось в контрольному зразку з no.25 трансфікованими клітинами-мішенями, що свідчить про строгу залежність від експресії ТАА для індукції активації Т-клітин. Дивися також фігуру 22.

Приклад 18: Аналіз методом проточної цитометрії залежної від концентрації активації Т-клітин CLDN18.2-специфічним 1BiMAB bi-scFv

Для дослідження залежної від концентрації bi-scFv активації Т-клітин у присутності ТАА-експресуючих клітин-мішеней серії трикратних розведень застосовували для процесу трансфекції.

Клітини-мішені NugC4 готували й трансфікували, як описано в прикладі 16, але з кінцевою концентрацією IVT-mPHK, що становить 40 мкг/мл. Концентрації 1BiMAB IVT-mPHK змінювалися від 0,4 до 40 мкг/мл і були доповнені відповідними кількостями IVT-mPHK люциферази з метою піддання всіх клітин однаковому рівню стресу відносно кількостей IVT-mPHK.

1×10^5 трансфікованих клітин-мішеней і людські цитотоксичні Т-клітини (виділені, як описано в прикладі 16) засівали в співвідношенні Е:Т, рівному 10:1, в 2 мл аналітичного середовища в 6-лунковому форматі. Контрольні зразки, що містять клітини-мішені, трансфікували 40 мкг/мл IVT-mPHK люциферази, але не IVT-mPHK 1BiMAB. Через 24 год і 48 год спільної інкубації клітин-мішеней і ефекторних клітин, клітини збирали, фарбували й аналізували, як описано в прикладі 16.

Як показано на фігурах 23 А і В, значну активацію Т-клітин спостерігали в зразках, які містять клітини -мішені, трансфіковані 4 мкг/мл IVT-mPHK 1BiMAB. Максимальна активація Т-клітин у цьому аналізі була досягнута за допомогою 40 мкг/мл IVT-mPHK 1BiMAB. Експресія CD69 і CD25 різнилася залежно від часу інкубації (Фіг. 23 від А до В) і концентрації IVT-mPHK. Більш високі кількості IVT-mPHK 1BiMAB (12 і 40 мкг/мл) приводили до більш швидкої ініціації механізму активації Т-клітин, яка спостерігалася, наприклад, при підвищеній експресії CD25 у порівнянні з експресією CD69 на фігурі 23В. Загальна активація Т-клітин не перевищувала ~40%.

Приклад 19: Аналіз методом проточної цитометрії залежного від концентрації, опосередкованого Т-клітинами лізису клітин-мішеней за допомогою CLDN18.2-специфічного 1BiMAB bi-scFv

Для дослідження залежного від концентрації bi-scFv опосередкованого Т-клітинами лізису клітин-мішеней використовували спосіб, описаний у прикладі 18. Крім зразків спільно інкубованих ефекторних клітин і клітин-мішеней («зразок»), також засівали тільки окремо індивідуально піддані електропорації клітини-мішені. Останні служили як зразки порівняння («ЕР порівняння») для вирахування клітин-мішеней, що загинули в результаті процесу електропорації, із клітин-мішеней, лізованих Т-клітинами.

Збір і фарбування виконували відповідно до прикладу 18. Клітини-мішені на завершення аналізували за допомогою введення в них пропідію йодида за допомогою Facscalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

Процентний специфічний лізис клітин-мішеней визначали шляхом двостадійного вирахування вихідних загиблих клітин:

1. % опосередкованого Т-клітинами лізису = (% PI^+ клітин-мішеней зразок - % PI^+ клітин-мішеней ЕР порівняння)

2. % специфічного лізису = (% опосередкованого Т-клітинами лізису зразок - % опосередкованого Т-клітинами лізису контроль)

«Опосередкований Т-клітинами лізис контроль» віднімається від різниці PI^+ клітин-мішеней контрольних зразків (40 мкг/мл тільки IVT-мРНК люциферази) з ефекторними клітинами й без них.

За допомогою цього розрахунку максимальний специфічний лізис, що становить 55,5% +/- 5,6% досягається за допомогою 12 мкг/мл IVT-мРНК 1BiMAB у даному експерименті. Завдяки чутливості клітин мішеней NugC4 до стресу, викликаного електропорацією, і пов'язаної з ним неминучої загибелі вихідних клітин-мішеней, які віднімаються, відзначений на графіку специфічний лізис клітин-мішеней може бути нижчим за цих експериментальних умов, ніж фактичний процентний лізис.

Приклад 20: Проліферація Т-клітин у відповідь на трансфекцію IVT-мРНК 1BiMAB

Проліферація Т-клітин є ознакою активації Т-клітин. Для демонстрації проліферації Т-клітин bi-scFv, кодуєний 1BiMAB IVT-мРНК у присутності CLDN18.2-позитивних клітин-мішеней, використовували аналіз методом проточної цитометрії. Коротко, 1×10^7 людських Т-клітин, виділених як описано в прикладі 16, фарбували 1 мкМ карбоксифлуоресцеїну діацетату сукцинімідилового складного ефіру (Celltrace CFSE, Invitrogen/Life Technologies GmbH, Germany), розчиненого в DPBS, в умовах темряви за кімнатної температури протягом 5 хв.

Клітини промивали двічі DPBS /5%FCS і ресуспендували в аналітичному середовищі до 2×10^6 клітин на мл. Як клітини-мішені були вибрані клітини NugC4, лентивіально трандуковані людським CLDN18.2 і – для тестування специфічності - CLDN18.2-негативна клітинна лінія раку молочної залози MDA-MB-231. 20 мкг/мл 1BiMAB IVT-мРНК або нетаргетний контроль використовували для електропорації. Електропорацію NugC4 виконували, як описано в прикладі 16. Електропорацію MDA-MB-231 виконували з використанням наступних умов: 400 В, тривалість імпульсу 3 мс, 1 імпульс, інтервал між імпульсами 400 мс в 0,4 см кюветах Gene Pulser/Micropulser Cuvettes (Bio-Rad, dreieich, Germany). Аналіз на цитотоксичність, описаний у прикладі 16, проводили із трансфікованими клітинами-мішенями й людськими CFSE-міченими Т-клітинами як ефекторними клітинами. Як негативні контролю використовували тільки Т-клітини й нетрансфіковані або контрольні трансфіковані клітини-мішені плюс Т-клітини. Як позитивний контроль служили тільки Т-клітини, стимульовані 5 мкг/мл OKT3 (Bio X Cell, West Lebanon, NH, USA) і 2 мкг/мл анти-CD28 (Biolegend, fell, Germany). Білок 1BiMAB у концентрації 5 нг/мл наносили на нетрансфіковані клітини-мішені плюс Т-клітини для підтвердження валідності аналізу. Зразки, об'єднані з нетаргетним білком bPHU3 bi-scFv, включали як контроль специфічності. Усі зразки готували в трьох повторностях у загальному обсязі 0,2 мл аналітичного середовища в 96 лунках. Через 72 год спільної інкубації Т-клітини збирали, переносили в 5 мл пробірки із круглим дном, промивали й фарбували при 4°C протягом 30 хв. 2 мкл анти-CD45-APC для диференціації людських Т-клітин від пухлинних клітин, і 0,25 мкл eFluor506 (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) для контрастного фарбування загиблих клітин в 200 мкл DPBS. Після відмивання DPBS клітини ресуспендували в FACS-буфері й аналізували за допомогою Facscanto II (BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

Проліферацію Т-клітин детектували за зменшенням CFSE-сигналу тільки в присутності CLDN18.2-позитивних клітин-мішеней і 1BiMAB bi-scFv (дивися також фігуру 25). Крім позитивного контролю, проліферацію Т-клітин, яка складала 42-48%, можна було спостерігати в присутності CLDN18.2-позитивних клітин-мішеней у комбінації з білком 1BiMAB. Таргетні позитивні клітини, трансфіковані IVT-мРНК 1BiMAB, привели до 22% +/- 3%. Більш низька проліферація у відповідь на IVT-мРНК, ніж на білок, можливо обумовлена низькою ефективністю трансфекції, що досягається клітинами-мішенями NugC4. Т-клітини, інкубовані з

CLDN18.2-негативними клітинами-мішенями MDA-MB-231, не показали значної проліферації в будь-яких умовах, а також Т-клітини без клітин-мішеней, за винятком позитивного контролю.

Приклад 21: Титрування співвідношень ефектора до мішені для визначення ефективного співвідношення

5 Для визначення придатного співвідношення Е:Т для проведення аналізу цитотоксичності *in vitro* на основі FACS-аналізу, співвідношення Е:Т у діапазоні від 0,3:1 до 10:1 вибирали за 3 стадії.

Клітини-мішені NugC4 готували й трансфікували, як описано в прикладі 16, з концентрацією IVT-мРНК, що становить 40 мкг/мл. Один препарат трансфікованих IVT-мРНК 1BiMAB клітин використовували для всіх тестованих зразків. Трансфекція 40 мкг/мл IVT-мРНК люциферази була вибрана як негативний контроль.

10 Людські цитотоксичні Т-клітини відокремлювали PBMC, виділених зі свіжовідібраної крові, як описано в прикладі 16, і служили як ефекторні клітини. 1×10^5 трансфікованих клітин-мішеней спільно інкубували із цитотоксичними Т-клітинами в 6-лункових планшетах у двох повторностях у наступних співвідношеннях ефектора до мішені: 0,3:1 – 1:1 – 3:1 – 10:1. Крім того, людські цитотоксичні Т-клітини вирощували за відсутності клітин-мішеней для визначення вихідної активзації Т-клітин. Клітини-мішені, трансфіковані контрольним IVT-мРНК або IVT-мРНК 1BiMAB, також вирощували за відсутності ефекторних клітин для визначення вихідних загиблених клітин шляхом піддання стресу електропорації. Люциферазний негативний контроль засівали тільки в 20 максимальному співвідношенні Е:Т, рівному 10:1. Через 48 год спільної інкубації клітини відбирали, мітили й аналізували, як описано в прикладі 16.

На фігурі 26А показана специфічна активація цитотоксичних Т-клітин у відповідь на секрецію 1BiMAB клітинами-мішенями NugC4. Незалежно від кількості Т-клітин у зразках, була виявлена загальна активація 50-60 %. Крім того, розподіл експресії CD25 і CD69 у зразках є у високому 25 ступені співвідносним. Це вказує на те, що в популяції цитотоксичних Т-клітин є фіксований відсоток Т-клітин, які можуть бути активовані.

На фігурі 26В залежність ефективного лізису клітин-мішеней від кількості цитотоксичних Т-клітин стає очевидною. Навіть якщо клітини-мішені лізовані в співвідношенні Е:Т, рівному тільки 0,3:1, активний лізис починається при співвідношенні 3:1.

30 Приклад 22: Аналіз активації Т-клітин і лізис клітин-мішеней в аналізі на основі FACS з використанням трансфікованих IVT-мРНК 1BiMAB ефекторних клітин

У цьому експерименті метою було тестування здатності людських ефекторних клітин продукувати і секретувати 1BiMAB після трансфекції IVT-мРНК. Раціональною основою був гіпотетичний варіант розвитку подій у пацієнта, де власні Т-клітини пацієнта можуть бути трансфіковані bi-scFv з наступним повторним перенесенням в організм пацієнта.

Людські цитотоксичні Т-клітини – ізольовані як описано в прикладі 16 – промивали двічі середовищем X-Vivo 15 (LONZA, Basel, Switzerland) і ресуспендували до щільності 2×10^7 клітин/мл. 250 мкл клітинної суспензії переносили в попередньо охолоджені 0,4 см кювети Gene Pulser/Micropulser Cuvettes (Bio-Rad, dreieich, Germany) і додавали 80 або 240 мкг/мл IVT-мРНК. Використовуваними IVT-мРНК були 1BiMAB і eGFP як контроль. Після обережного перемішування клітини електропорували з використанням електропоратора BTX ECM 830 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) з використанням наступних умов: 500 В, 1 імпульс, тривалість імпульсу 3 мс, інтервал між імпульсами 400 мс. Відразу ж після електропорації кювети поміщали на лід на короткий проміжок часу й потім клітинні суспензії переносили в аналітичне середовище (середовище RPMI 1640, доповнене 5% термоінактивованою людською сироваткою AB, 0,5 % пеніциліну-стрептоміцину, $1 \times \text{NEAA}$ і 1 mM пірувата натрію (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany)), що містить 10 Од/мл IL-2. Трансфіковані ефекторні клітини вирощували протягом ночі при 37 °C, 5 % CO₂. Наступного дня ефективність трансфекції аналізували за допомогою FACS, виявляючи ефективність трансфекції вище 70% для обох концентрацій IVT-мРНК eGFP. Кожний зразок ефекторних клітин підраховували й доводили до 5×10^5 клітин на мл. Клітини-мішені NugC4 збирали для аналізу шляхом трипсинізації, промивали аналітичним середовищем, підраховували й доводили до 1×10^5 клітин на мл. Ефекторні клітини й клітини-мішені змішували й засівали в 6-лункових планшетах у двох повторностях у кінцевому співвідношенні Е:Т, рівному 5:1, і кінцевому обсязі 2 мл. Неопрацьовані Т-клітини засівали без клітин-мішеней для визначення вихідних сигналів активзації. Аналіз проводили, як описано в прикладі 16, через 48 год спільної інкубації при 37 °C, 5 % CO₂.

Значна активація цитотоксичних Т-клітин, трансфікованих IVT-мРНК 1BiMAB і спільно інкубованих із клітинами-мішенями, досягалася, як показано на фігурі 27А. Лізис клітин-мішеней трансфікованими IVT-мРНК 1BiMAB Т-клітинами склав більш 60 %, як показано на фігурі 27В.

Ефекти 80 мкг/мл IVT-мРНК 1BiMAB не могли бути збільшені за допомогою більш високих кількостей РНК.

У результаті цього експерименту можна зробити висновок про те, що ефекторні клітини можуть теоретично бути використані як продукуючі і секретуючі bi-scFv клітини-реципієнти.

5 Приклад 23: Дослідження специфічності відносно мішені IVT-мРНК 1BiMAB в аналізі на цитотоксичність на основі люциферази з використанням CLDN18.2-негативних клітин-мішеней.

Строга специфічність відносно мішені є важливим питанням для запобігання небажаних побічних ефектів у пацієнтів. У цьому первинному дослідженні CLDN18.2-негативну клітинну лінію – клітинну лінію тератокарциноми PA-1 (ATCC CRL-1572) – використовували для

10 дослідження неспецифічного цитолітичного потенціалу 1BiMAB, уведеного у вигляді IVT-мРНК.

Використовувана клітинна лінія PA-1 була стабільно трансдукована лентивірусним вектором на основі люциферази й, таким чином, могла застосовуватися в аналізі на цитотоксичності на основі люциферази. Клітини-мішені PA-1/лус готовили для електропорації, як описано в прикладі 16. Усього було трансфіковано 40 мкг/мл IVT-мРНК на зразок. Використовували наступні IVT-мРНК: 1BiMAB, по. 25 і 6RHU3. По. 25 направлено впливає на PLAC-1 TAA, що не експресується, і 6RHU3 направлено впливає на таргетний CLDN6, що високоекспресується у клітинах PA-1/лус. Для одержання більш докладної інформації, що стосується варіантів bi-scFv, дивися таблиці 7 і 8. По. 25 використовували як доповнення IVT-мРНК у зразках для електропорації 4 мкг/мл IVT-мРНК для забезпечення однакового рівня стресу, викликаного трансфекцією РНК, для всіх зразків клітин-мішеней. Після обережного перемішування клітини трансфікували за допомогою електропоратора BTX ECM 830 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) з використанням наступних умов для 0,4 см кювети: 200 В, 2 імпульса, тривалість імпульсу 12 мс, інтервал між імпульсами 400 мс. Відразу ж після електропорації кювети поміщали на лід на короткий проміжок часу, і потім клітинні суспензії переносили в нагріте до кімнатної

25 температури аналітичне середовище PA-1 (MEM середовище, доповнене 10 % термоінактивованої FCS, 0,5 % пеніциліну-стрептоміцину, 1x NEAA, 1,5 г/л бікарбонату натрію й 1 мМ пірувата натрію (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany)) в 15 мл пробірках. Трансфіковані клітини-мішені підраховували й доводили до 1×10^5 клітин на мл.

Людські ефекторні клітини виділяли, як описано в прикладі 16. Людські цитотоксичні Т-клітини виділяли шляхом магнітно-активованого клітинного сортування (MACS) з RBMC за допомогою набору Pan T Cell Isolation Kit II, human (Miltenyi Biotec, Tererow, Germany) згідно з інструкціями виробника. Т-клітини доводили до 5×10^5 клітин на мл в аналітичному середовищі PA-1.

35 1×10^4 клітин-мішеней засівали в кожну лунку 96-лункового планшета й людські цитотоксичні Т-клітини додавали до співвідношення Е:Т, рівного 5:1. Кінцевий обсяг кожної лунки склав 100 мкл. Контрольні зразки, що містять ефекторні клітини й клітини-мішені, містили як негативний контроль клітини-мішені, секретуючі по. 25, як позитивний контроль білок 6RHU3 або 6RHU3, і білок 1BiMAB. Концентрації білків доводили до кінцевої концентрації 100 нг/мл і поєднували з по.25-трансфікованими клітинами-мішенями для забезпечення однакових умов

40 для використовуваних клітин-мішеней. Контролі мінімального лізису (L_{min}) включали тільки кожний зразок електропорованих клітин-мішеней. Контролі спонтанного лізису (L_{max}) складалися з неопрацьованих клітин-мішеней і ефекторних клітин (L_{max}) для вирахування з L_{test} зразка або тільки неопрацьовані клітини-мішені (L_{max2}) для вирахування з L_{min} . Кожний зразок засівали в трьох повторностях. Аналіз проводили через 72 год інкубації при 37 °C, 5 % CO₂. Контролі спонтанного лізису (L_{max}) обробляли Triton X-100 у кінцевій концентрації 2 %.

45 Для аналізу 50 мкл водяного розчину, що містить 1 мг/мл люциферина (BD Monolight, BD, Biosciences, Heidelberg, Germany) і 50 мМ HEPES, додавали в кожну лунку, і планшети потім інкубували протягом 30 хв. в умовах темряви при 37°C. Люмінесценцію, що виникає в результаті окиснення люциферина люциферазою, яка еспресує життєздатні клітини, вимірювали на мікропланшетному рідері (Infinite M200, Tecan, Mannedorf, Switzerland). Відсоток специфічного лізису клітин-мішеней розраховували за наступною формулою: % специфічного лізису = $[1 - (\text{люмінесценція}_{\text{тестований зразок}} - L_{max}) / (L_{min} - L_{max2})] \times 100$.

На фігурі 28 показаний відсоток специфічного лізису клітин-мішеней. CLDN18.2-негативні клітини PA-1/лус, трансфіковані негативним контролем по. 25 або 1BiMAB, не показують значного лізису навіть після інкубації протягом 72 год. Також, 100 нг/мл білка 1BiMAB не приводить до значного лізису, тоді як лізис, викликаний bi-scFv-секрецією 6RHU3, що направлено впливає на TAA, або 100 нг/мл білка 6RHU3, склав 85-93%. Аналіз також проводили через 24 год і 48 год, який показав еквівалентні результати (дані не показані).

60 Приклад 24: Кількісний аналіз продукції білка 1BiMAB після трансфекції клітин ссавців IVT-мРНК

Для дослідження трансляції РНК у білок у клітинах ссавця вибирали клітинну лінію BHK21 (ATCC CRL-13001) як систему експресії. 2 x 10⁷ клітин BHK21 на мл трансфікували шляхом електропорації, як описано в прикладі 16, при цьому відмінність полягала в тому, що всі стадії виконували за кімнатної температури. 250 мкл клітинної суспензії переносили в 0,4 см кювети Gene Pulser/Micropulser Cuvettes (Bio-rad, Dreiech, Germany) і додавали 40 мкг/мл IVT-mRNA 1BiMAB або IVT-реплікон РНК. Умови електропорації були наступні: 300 В, тривалість імпульсу 16 мс, 1 імпульс, інтервал між імпульсами 400 мс.

Електропоровані клітини ресуспендували в культуральному середовищі за кімнатної температури (RPMI 1640, 10 % FCS) і переносили в 15 см культуральні чашки. Через 5 год після засівання середовище, що містить FCS, заміняли середовищем, що не містить FCS. У прикладах 24 а й б супернатант клітинної культури й клітини збирали для аналізу окремо через 18 год після електропорації. Клітинні осадки лізували в 1x LDS буфері для зразка (номер по каталогу NP0008; Life technologies, Darmstadt, Germany) і нагрівали при 72°C протягом 15 хв. Для аналізу ELISA використовували неконцентрований і приблизно 50-кратно концентрований супернатант. Концентрування проводили за допомогою центрифужного фільтра Amicon ultra-15 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) відповідно до протоколу виробника. У випадку прикладу 24с (тільки IVT-mPHK) супернатант збирали через 48 год після трансфекції й піддавали 40-кратному концентруванню, як описано вище.

а. ELISA з використанням супернатанта

Для аналізу ELISA планшети, покриті нікелем (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Germany) використовували для захоплення аналіта через його His-мітку. Спочатку планшет промивали три рази 200 мкл промивного буфера (0,01 % Tween-20 в 1x PBS) на лунку. Як стандарт очищений білок 1BiMAB розводили в 1,75 % Na-казеїн в 1 x PBS (= розріджувач). Ряд розведень змінювався від 2,34 до 37,50 нг/мл із кроком в 2. 100 мкл на стандартне розведення переносили в лунки в трьох повторностях кожної концентрації. Відповідним чином, 100 мкл зразків переносили в трьох повторностях. Планшет герметично закривали адгезивною плівкою й інкубували при 37 °C протягом 30 хвилин. Після цього планшети промивали три рази 200 мкл промивного буфера на кожну лунку. Для детекції 1BiMAB використовували анти-ідіотипічне моноклональне Ig 8B1F3, яке специфічно зв'язується з VH-VL CLDN18.2ab і, отже, також з 1BiMAB. 8B1F3 змішували з розріджувачем до кінцевої концентрації 1 мкг/мл. 100 мкл розчину анти-ідіотипічного антитіла переносили в кожну лунку з наступною інкубацією протягом 30 хв. при 37 °C. Потім планшет промивали 3-кратно 200 мкл промивного буфера на кожну лунку, і 100 мкл AP-кон'югованого анти-мишачого детекторного антитіла (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA) – у розведенні 1:500 у розріджувачі – додавали в кожну лунку з наступною інкубацією протягом 30 хв. при 37 °C. Після заключної стадії промивання (3 x 200 мкл промивного буфера) у кожну лунку додавали 1,5 мг/мл субстрату pNPP у відповідному субстратному буфері (1M диетаноламін, 0,5 mM MgCl₂, 0,01 % Na-азид, pH 9,8) з наступною інкубацією протягом 30 хв. за кімнатної температури в умовах темряви. Для зупинки ферментативної реакції використовували 100 мкл 3M KIH на кожну лунку. Поглинання вимірювали за допомогою мікропланшетного ридера (Infinite M200, Tecan, Mannedorf, Switzerland). Для двоххвильового аналізу 405 нм установлювали як довжину хвилі вимірювання й 492 нм як довжину хвилі порівняння. Величини поглинання розраховували шляхом вирахування довжини хвилі порівняння з довжини хвилі вимірювання.

На фігурі 29А нанесені середні величини поглинання при 405 нм, включаючи стандартні відхилення. Концентрований супернатант із клітин, трансфікованих IVT-mPHK 1BiMAB і IVT-репліконом, викликав значний сигнал, підтверджуючи трансляцію bi-scFv, що кодує IVT-РНК. Концентрований супернатант із ложно-трансфікованих клітин не викликав якого-небудь сигналу. Фактичні концентрації білка не можуть бути запропоновані через різну токсичність конструкцій IVT-mPHK і IVT-реплікона, і х-кратних концентратів, які незначно відрізняються. Визначена приблизна концентрація білка в неконцентрованому супернатанті знаходилась в межах 1,5 нг/мл для зразків IVT-реплікона й 2,4 нг/мл для зразків IVT-mRNA.

б. Вестерн-блот аналіз супернатанта й клітинного лізату (зразки IVT-mPHK і IVT-реплікона)

Для аналізу методом Вестерн-блотинга концентровані супернатанти й клітинні лізати розділяли на NuPAGE Novex 4-12% Bis-tris Gels (Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). Навантажували супернатант і клітинний лізат клітин BHK21, трансфікованих IVT-mPHK 1BiMAB, IVT-репліконом РНК, або неопрацьованих клітин і позитивного контролю – 0,1 мкг очищеного білка 1BiMAB. Вестерн-блот-аналіз виконували за допомогою стандартних процедур (Current Protocols in Protein Science, 2012). Коротко, після блотинга білків на PVDF-мембрані й блокування за допомогою PBST/3% сухого молока мембрану інкубували протягом 1 год при 4 °C з первинним антитілом Anti-HIS Epitope-Tag (Dianova GmbH, Hamburg, Germany) у

розведенні 1:500 у блокувальному буфері. Після повторного промивання блокувальним буфером мембрани інкубували з Fc-специфічним вторинним козячим-анти-мишачим IgG антитілом, кон'югованим з пероксидазою (Sigma Aldrich, Germany), у розведенні 1:10000 у блокувальному буфері протягом 1 год при 4 °C. Після повторного промивання блокувальним

буфером сигнали визуалізували за допомогою Supersignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) і записували за допомогою ImageQuant LAS 4000 Imager (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany). Сигнали 1BiMAB детектували в діапазоні від 50 до 60 кДа в порівнянні з молекулярною масою внутрішнього стандарту.

Як показано на фігурі 29В слабкі сигнали були детектовані в супернатанті клітин, трансфікованих IVT-мРНК (доріжка 2) і IVT-репліконом РНК (доріжка 3), тоді як сигнал був відсутній у доріжці 4 (супернатант від неопрацьованих клітин). Сильні сигнали можуть бути генеровані клітинними лізатами клітин, трансфікованих IVT-мРНК (лінія 5) і IVT-реплікона РНК (лінія 6). Сигнал знову був відсутній у клітинному лізаті неопрацьованих клітин (доріжка 7). Усі сигнали виникали на такій самій висоті, що й в очищеного контрольного білка 1BiMAB (доріжка 8). Слабкий сигнал у супернатанті й слабка секреція 1BiMAB можливо обумовлені відносно коротким часом інкубації після трансфекції. Через токсичний ефект реплікона РНК більш тривалі періоди інкубації не можуть бути тестовані.

Обидва аналізи є якісними й не можуть бути використані для визначення концентрації білка.

с. Вестерн-блот аналіз супернатанта (зразки IVT-мРНК)

Супернатант, зібраний через 48 год після трансфекції, відокремлювали за допомогою SDS-PAGE з наступним вестерн-блот-аналізом, як описано в прикладі 24b. Як показано на фігурі 29C, по.25 і 1BiMAB, трансльований з IVT-мРНК і секретований у супернатант, детектували за допомогою їх His-мітки. При цьому продукція й секреція 1BiMAB, а також по.25, який використовували як контроль специфічності bi-scFv, можуть бути підтверджені.

Приклад 25: Детекція *in vivo* трансльованого й функціонального білка 1BiMAB після внутрішньом'язової ін'єкції РНК

Мишачих самок і самців лінії NSG у віці 8-16 тижнів відбирали й розподіляли на 4 групи по 5 мишей. Кожній миші в стеговий м'яз ін'єктували 40 мкл розчину РНК. В 40 мкл розчину РНК містилося 1х PBS, 5 мкг D2-кепованого IVT-мРНК 1BiMAB або реплікона, 2 мкг D1-кепованої люциферази IVT-мРНК і 0 або 15 мкг D1-кепованого IVT-мРНК EBK. IVT-мРНК EBK, що кодує білки E3L, B18R і K3L (EBK) вірусу осповакцини, спільно ін'єктували для інгібування відповіді IFN і для протидії активації PKR з метою посилення трансляції РНК (заявка на патент PCT/EP2012/04673). Сигнал люциферази спостерігали через 24 год після ін'єкції Xenogen IVIS 2000 для виключення мишей без сигналу з колекції зразків.

Кров збирали через 2, 4 і 7 днів після ін'єкції. Сироватку збирали й потім заморожували при -80 °C. М'язи мишей із сильним люмінесцентним сигналом вирізали й гістохімічно фіксували для імуногістохімічного аналізу (IHC) або заморожували шляхом шокової заморозки для вестерн-блот-аналізу через 4 дні після ін'єкції РНК.

Аналіз на цитотоксичність

Сироватку мишей NSG аналізували в аналізі на цитотоксичність *in vitro*. Клітини-мішені NucC4, стабільно трансфіковані люциферазою світлячка й людським CLDN18.2 для кращої експресії мішені, засівали людськими Т-клітинами (ізолюваними як описано в прикладі 16) у співвідношенні Е:Т, рівному 30:1, для максимальної чутливості. Аналітичне середовище складалося із середовища RPMI 1640, доповненого 10% термоінактивованою FCS, 0,5% пеніциліну-стрептоміцину, 1х NEAA і 1 мМ пірувата натрію (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). 20 мкл відталої тестованої сироватки додавали в кожну лунку з тестованим зразком. Лунки зі стандартним контрольным білком 1BiMAB, лунки з L_{min} і L_{max} наповнювали 20 мкл сироватки неопрацьованих мишей NSG. Кінцевий обсяг кожної лунки склав 100 мкл. L_{min} засівали дванадцятикратно, L_{max} шестикратно й тестовані зразки в трьох повторностях. Через 48 год інкубації при 37 °C і 5 % CO₂ лунки з L_{max} змішували з 10 мкл 2 % розчину Triton X-100 і інкубували протягом 10 хв. В усі інші лунки додавали 10 мкл аналітичного середовища. Додавали 50 мкл розчину люциферина (дивися приклад 23) і планшети вимірювали – через 30 хв. стадії інкубації при 37 °C у умовах темряви – на мікропланшетному рідері Infinite M200 (TECAN, Männedorf, Switzerland). Розрахунки специфічного лізису клітин-мішеней виконували, як описано в прикладі 23.

На фігурі 30 нанесений відсоток специфічного лізису. Значні цитотоксичні ефекти детектували в кожній групі. Цитотоксичні ефекти збільшилися на фактор 1,7 у лунках мишей, що містять сироватку, ін'єкованих EBK і IVT-mRNA 1BiMAB, і збирали для аналізу через 2 дні після ін'єкції. Значно більш низькі ефекти спостерігалися в зразках, зібраних на 4 або 7 день після

ін'єкції. У випадку зразків 1 BiMAB-реплікона, сироватка, зібрана в більш пізні моменти часу, також генерували сильні цитолітичні ефекти.

Ці дані підтверджують *in vivo* трансляцію 1BiMAB з IVT-мРНК або -реплікона й секрецію в кровоток після внутрішньом'язової ін'єкції.

5 Приклад 26: Генерація й тестування біспецифічних з'єднувальних агентів, що направлено впливають на CLDN6 і CD3

а. Вихідні послідовності, дизайн конструкції bi-scFv і клонування в матрицю вектора

10 Готували конструкції біспецифічного тандемного одноланцюгового антитіла (bi-scFv), що містять з'єднувальні домени, специфічні відносно компонента CD3 людського Т-клітинного рецептора й людських пухлиноасоційованих антигенів (TAA). Відповідні варіабельні області важкого ланцюга (V_H) і відповідні варіабельні області легкого ланцюга (V_L) для кожної конструкції розташовані специфічно в напрямку від 5'- до 3'-кінця в наступному порядку:

pST1-5'AgKozak- $V_H^{\alpha\text{CLDN6}}$ - $V_L^{\alpha\text{CLDN6}}$ - $V_H^{\alpha\text{CD3}}$ - $V_L^{\alpha\text{CD3}}$ -His-2hBgUTR-A120 (6RHU5)

pST1-5'AgKozak- $V_H^{\alpha\text{CD3}}$ - $V_L^{\alpha\text{CD3}}$ - $V_H^{\alpha\text{CLDN6}}$ - $V_L^{\alpha\text{CLDN6}}$ -His-2hBgUTR-A120 (6RHU3)

15 У таблиці 9 коротко описані всі конструкції bi-scFv, специфічні відносно TAA CLDN6, які були генеровані в рамках винаходу. CLDN18.2-специфічну конструкцію 1BiMAB bi-scFv використовували як контрольне антитіло. Конструкції bi-scFv генерували шляхом генного синтезу GeneArt AG (GeneArt/Life Technologies GmbH, Regensburg, Germany) з використанням послідовностей V_H і V_L відповідних антитіл. Оптимізації кодонів, таких як Homo sapiens (HS) або 20 Mus musculus (MM) були реалізовані за допомогою програмного забезпечення GeneArt's GeneOptimizer®, і перераховано в таблиці 9. Інформація, що стосується специфічності, походження послідовностей з моноклональних антитіл (MAB), використання кодонів, додаткових відмітних ознак послідовностей і посилення на всі, що застосовуються домени, узагальнено в таблиці 10. Вихідні послідовності варіабельних доменів відповідних антитіл CD3 перераховано в 25 таблиці 10. Завдяки високій гомології людських і мишачих TAA, однакові послідовності V_H і V_L анти-TAA можуть бути використані для створення конструкцій bi-scFv для аналізів на мишах, але в комбінації з послідовностями V_H , V_L мишачого специфічного клону 145-2C11 анти-CD3 антитіла.

Клонування ДНК і конструювання експресійних векторів проводили у відповідності зі 30 стандартними процедурами (Green/Sambrook, Molecular Cloning, 2012), які добре відомі фахівцям у даній області. Коротко, головні ДНК послідовності bi-scFv містили сайт рестрикції 5'-BsmBI і 3'-XhoI для клонування в плазміді pST1. Послідовність сигналу секреції вводили на 5' кінці (вище) послідовності bi-scFv для секреції білка. Послідовність, що кодує гнучкий гліцин-сериновий пептидний лінкер, що складається з 15-18 амінокислот, вставляли для з'єднання 35 доменів V_H і V_L для композиції одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіла (scFv), з яких один зв'язується з CD3 і інший з TAA. Для формування біспецифічного одноланцюгового антитіла послідовності двох доменів scFv з'єднували послідовністю, що кодує короткий пептидний лінкер (GGGGS). Разом із цією послідовністю лінкера вводили сайт рестрикції BamHI для обміну доменів scFv для клонування наступних конструкцій bi-scFv. Коротко, домени 5'scFv- 40 заміняли шляхом рестрикції BsmBI і BamHI і 3' scFv-домени шляхом рестрикції BamHI і XhoI. С-кінцеву 6 xHis-мітку використовували для аналізів на виявлення трансльованого білка. Для одержання вектора реплікона 6RHU3 повну послідовність 6RHU3, включаючи сигнал секреції й 6 xHis-мітку, субклонували в напрямку від 3' від субгеномного промотору вектора реплікона вірусу лісу Семліки (pSFV), люб'язно наданого K. Lundstrom (Lundstrom, K. et al. (2001) 45 Histochem. Cell Biol. 115 (1), pp. 83-91; Ehrenguber, M.U. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (12), pp. 7041-7046).

Усі конструкції підтверджували шляхом секвенування через сервіс з секвенування 50 одиночних прочитань (MWG single read sequence service) (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) і використовували конструкції тільки із правильною послідовністю й полі(A)-хвостом, що складаються із більш ніж 100 аденінів, для *in vitro* транскрипції РНК.

Схеми конструкцій представлені також на фігурі 31A.

Таблиця 9

Короткий опис конструкцій мРНК-матриці біспецифічного однокланцюгового антитіла, специфічного відносно TAA й CD3

Внутр. наймен.	TAA	Специфічність	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	Використання кодонів
1Bimab	CLDN18.2	людина	mcln18.2ab	TR66	HS
6RHU5	CLDN6	людина	mcln6ab	TR66	HS
6RHU3	CLDN6	людина	TR66	mcln6ab	HS
6RMU5	CLDN6	миша	mcln6ab	145-2C11	MM
6RMU3	CLDN6	миша	145-2C11	mcln6ab	MM

5 bi-scFv означає біспецифічний однокланцюговий варіабельний фрагмент; HS, Homo-sapiens; HU, гуманізоване; MM, Mus musculus; TAA, пухлиноасоційований антиген; V_H, варіабельний домен важкого ланцюга, V_L, варіабельний домен легкого ланцюга

Таблиця 10

Короткий опис конструкції матриці мРНК-bi-scFv

Внутр. найм.	З'єднувальний фрагмент CD3		З'єднувальний фрагмент TAA			5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	Короткий лінкер
	Походж. mab	Реактивн. вид	TAA	Походж. mab	Реактивн. вид			
1Bimab	TR66	Людина	CLDN18.2	mcln18.2ab	людина, миша	mcln18.2ab	TR66	GGGGS
6RHU5	TR66	Людина	CLDN6	mcln6ab	людина, миша	mcln6ab	TR66	SGGGGS
6RHU3	TR66	Людина	CLDN6	mcln6ab	людина, миша	TR66	mcln6ab	SGGGGS
6RMU5	145-2C11	миша	CLDN6	mcln6ab	людина, миша	mcln6ab	145-2C11	SGGGGS
6RMU3	145-2C11	миша	CLDN6	mcln6ab	людина, миша	145-2C11	mcln6ab	SGGGGS

Продовження Таблиця 10

Внутр. найм.	5'-довгий лінкер	3'-довгий лінкер	сигнал секреції	Використання кодонів	посилання по анти-CD3 mab
1Bimab	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCIILFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6RHU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCIILFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6RHU3	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MGWSCIILFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6RMU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCIILFLVATATGVHS	MM	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
6RMU3	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVLTCLKGIQG	MM	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987

HS, Homo sapiens; MAB, моноклональне антитіло; MM, Mus musculus; TAA,

пухлиноасоційований антиген.

b. Синтез IVT-PHK

Для створення анти-CLDN 6-специфічних IVT-матриць bi-scFv, плазміди лінеаризували нижче полі(А)-хвоста з використанням ендонуклеази класу IIs. Лінеаризовану матрицю ДНК

очищали екстракцією сумішшю фенол/хлороформ і осаджували ацетатом натрію, як описано в літературних джерелах (Holtkamp, S. et al. (2006) *Blood* 108 (13), pp. 4009-4017). Лінеаризовані матриці ДНК піддавали *in vitro* транскрипції з використанням наборів MEGAscript Kits (Ambion/Life Technologies, Darmstadt, Germany) відповідно до інструкцій виробника: матриці pST1 транскрибували за допомогою набору MEGAscript T7 Kit і матриці pSFV за допомогою набору MEGAscript SP6 Kit. Для реакцій з кеп-аналогом концентрацію GTP зменшували до 1,5 мМ і 6 мМ ARCA, бета-S-ARCA(D1) або в реакцію додавали бета-S-ARCA(D2), синтезований, як описано в літературі (Kowalska, J. et al. (2008) *RNA* 14 (6), pp. 1119-1131; Grudzien, E. et al. (2004) *RNA* 10 (9), pp. 1479-1487; Stepinski, J. et al. (2001) *RNA* 7 (10), pp. 1486-1495). Очищення IVT-мРНК виконували за допомогою набору MEGAClear Kit (Ambion/Life Technologies, Darmstadt, Germany) відповідно до інструкцій. Концентрацію і якість IVT-PHK оцінювали за допомогою спектрофотометрії й аналізували на біоаналізаторі 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Приклад 27: Мікроскопічний аналіз Т-клітин, переспрямованих на клітини-мішені, секретуючі CLDN 6-специфічний bi-scFv 1BiMAB

Порядок проведення аналізу по суті був таким, як описано в прикладі 2.а.

Як лінії клітин-мішеней використовували субклон клітинної лінії тератокарциноми яєчників PA-1 (ATCC CRL-1572), яка ендегенно експресує високі рівні людського CLDN6. Людські цитотоксичні Т-клітини відокремлювали, використовуючи MACS, від PBMC, виділених зі свіжовиділеної крові, за допомогою набору Pan T Cell Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany) відповідно до інструкцій виробника.

Клітини-мішені PA-1 – які тестували звичайним способом відносно експресії ТАА за допомогою FACS-аналізу перед кожним аналізом - двічі промивали крижаним середовищем X-Vivo 15 (LONZA, Basel, Switzerland) і ресуспендували до щільності 2×10^7 клітин/мл. 250 мкл клітинної суспензії переносили в попередньо охолоджені 0,4 см кювети Gene Pulser/Micropulser Cuvettes (Bio-Rad, Dreieich, Germany) і додавали 20 мкг/мл IVT-мРНК. Умови електропоратора BTX ECM 830 (Harvard apparatus, Holliston, MA, USA) були наступні: 200 В, довжина імпульсу 12 мс, 2 імпульси, інтервал між імпульсами 400 мс. Використовували наступні IVT-мРНК: 6RHU5, 6RHU3, по. 25 (для докладної інформації дивися таблиці 9 і 10). Трансфіковані клітини-мішені підраховували й доводили до 1×10^5 клітин на мл. 1×10^5 клітин-мішеней засівали в кожну лунку 6-лункового планшета, і людські цитотоксичні Т-клітини додавали відповідно до співвідношення Е:Т, яке дорівнює 5:1. Кінцевий обсяг кожної лунки склав 2 мл. Контрольні зразки містили тільки трансфіковані клітини-мішені для підтвердження лікувальних властивостей після електропорації й контрольні трансфіковані bi-scFv клітини-мішені з ефекторними клітинами. Як позитивні контролю відповідні CLDN 6-специфічні білки 6RHU5 і 6RHU3 bi-scFv готували в концентрації 50 мкг/мл. Таким чином, використовували неопрацьовані клітини PA-1 з людськими Т-клітинами. Потім тканинні культуральні планшети інкубували при 37 °C, 5% CO₂. Значні ефекти з погляду утворення Т-клітинних кластерів на клітинах-мішенях, формування імунологічного синапса й загибелі клітин-мішеней у зразках, що містять трансфіковані 6RHU5 і 6RHU3 клітини-мішені, спостерігали через 24 год і записували за допомогою інвертаційного мікроскопа Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japan). Як показано на фігурі 32, утворення кластерів Т-клітин або лізису клітин-мішеней не спостерігалося в контрольному зразку з по. 25 трансфікованими клітинами-мішенями, що свідчить про строгу залежність від експресії ТАА для індукції активації Т-клітин. Імітуючий контроль без bi-scFv також показує відсутність утворення кластерів Т-клітин. Контрольні білки навпаки приводять до утворення кластерів Т-клітин і лізису клітин-мішеней.

Приклад 28: Активація Т-клітин, індукованих кандидатами 6RHU5 і 6RHU3 bi-scFv, що направлено впливають на CLDN6

Для детекції активації Т-клітин і визначення відмінностей в ефективності двох варіантів CLDN 6-специфічних bi-scFv, виконували аналіз активації Т-клітин на основі FACS. Маркер ранньої активації CD69 і маркер пізньої активації CD25 були вибрані для фарбування антитілами, кон'югованими із флуоресцентною міткою. Для детекції людських Т-клітин у суміші клітин-мішеней і Т-клітин їх фарбували CD3, який експресується всіма Т-клітинами.

Клітини-мішені й ефекторні клітини готували, як описано вище (приклад 27). Коротко, клітини-мішені PA-1, які ендегенно експресують CLDN6, трансфікували шляхом електропорації 20 мкг/мл наступних IVT-мРНК: 6RHU5, 6RHU3 і по. 25. Як контроль специфічності використовували по.25, що направлено впливає на неекспресований ТАА, як імітуючий

контроль використовували неопрацьовані клітини-мішені. Як позитивний контроль використовували 50 нг/мл білка 6RHU5. Крім того, Т-клітини засівали без клітин-мішеней з білком 6RHU5 або без нього як референсні вихідні активації. Кожний зразок засівали у двох повторностях в 6-лункові планшети й інкубували при 37 °С, 5 % CO₂. Через 24 год і 48 год Т-клітини збирали шляхом зішкрябування й переносили в 5 мл пробірки із круглим дном (BD Falcon, Heidelberg, Germany). Клітини центрифугували й промивали DPBS. Для фарбування клітин використовували мишачі антилюдські CD3-FITC, мишачі антилюдські CD69-APC і мишачі антилюдські CD25-PE (усі антитіла BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Клітинні осадки ресуспендували в 50 мкл FACS-буфера (DPBS, доповнений 5% FBS) що містить антитіла, кон'юговані з флуоресцентними мітками, і 2 мкл 7-AAD (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Після інкубації протягом 20 хв. при 4°С в умовах темряви зразки промивали 4 мл DPBS і клітинні осадки ресуспендували в 200 мкл FACS-буфера. Зразки зберігали на льоду в умовах темряви протягом вимірювання за допомогою проточного цитометра Facsanto II (обидва від фірми BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Результати оцінювали за допомогою програмного забезпечення Flowjo software (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

Як показано на фігурі 33 А і В, обидва варіанта привели до активації Т-клітин, тоді як жоден з негативних контролів не показав значної експресії маркерів CD69 і CD25 Т-клітинної активації.

Загальна активація Т-клітин у відповідь на 6RHU3 була в 1,53 разу вища через 24 год (А) і в 1,35 разу вище через 48 год (В) спільної інкубації, у порівнянні з відповіддю на 6RHU5. На підставі цих виявлень усі наступні дослідження виконували тільки з варіантом 6RHU3.

Приклад 29: Залежна від концентрації активація Т-клітин шляхом спільної інкубації із трансфікованими 6RHU3 клітинами-мішенями

Для визначення найнижчої концентрації IVT-мРНК 6RHU3, необхідної для індукції залежної від мішені активації Т-клітин, ряд розведень у діапазоні 0,2-20 мкг/мл IVT-мРНК трансфікували в клітини-мішені PA-1. Щоб усі зразки піддалися однаковому рівню стресу викликаного електропорацією РНК, трансфікували IVT-мРНК у загальній концентрації 20 мкг/мл. No.25 – що направлено впливає на неекспресований ТАА – використовували як наповнення IVT-мРНК. Відповідно, 0 мкг/мл 6RHU3 корелює з 20 мкг/мл no.25. Електропорацію виконували, як описано в прикладі 27. Людські Т-клітини використовували як ефекторні клітини. Виділення з PBMC виконували відповідно до інструкцій виробника (Pan T Cell Isolation Kit II, Miltenyi, Teterow, Germany). Ефекторні клітини й клітини-мішені змішували в співвідношенні 5:1. Неопрацьовані клітини-мішені з Т-клітинами служили як імітуючий контроль. Потім Т-клітини засівали без клітин-мішеней з білком 6RHU5 або без нього як референсні вихідні активації. Як позитивний контроль неопрацьовані клітини-мішені змішували з Т-клітинами й 50 нг/мл білка 6RHU5. Усі зразки готували у двох повторностях в 6-лункових планшетах.

Клітини-мішені й ефекторні клітини спільно інкубували протягом 48 год при 37°С, 5% CO₂. Зразки готували для аналізу методом проточної цитометрії, як описано в прикладі 28.

На фігурі 34 нанесений процентний вміст CD 3-позитивних Т-клітин, які експресують маркери активації. Активації Т-клітин не спостерігалось в контролях. Початок значної активації Т-клітин детектували при концентрації 0,7 мкг/мл IVT-мРНК 6RHU3. Ефекти у відповідь на 2,0 мкг/мл IVT-мРНК 6RHU3 були порівнянні з ефектами, опосередкованими 50 нг/мл контрольного білка 6RHU5. Таким чином, трансляція білка й секреція із трансфікованого IVT-мРНК, очевидно, є ефективним процесом.

Приклад 30: Визначення EC₅₀ для 6RHU3

Для визначення половини максимальної ефективної дози bi-scFv, що кодує 6RHU3 IVT-мРНК, ряд титрувань 6RHU3 тестували в in vitro аналізі на цитотоксичність на основі люциферази. Клітини PA-1, які стабільно експресують люциферазу, тимчасово трансфікували шляхом електропорації, як описано в прикладі 27. Використовувані концентрації IVT-мРНК 6RHU3 знаходились в діапазоні 0,004-13,3 мкг/мл в 6-східчастих розведеннях. Загальна концентрацію IVT-мРНК була постійною й склала 13,3 мкг/мл, no. 25 використовували як наповнення IVT-мРНК. Як контролі мінімального лізису (L_{min}) усі зразки трансфікованих клітин-мішеней засівали без ефекторних клітин. За допомогою цієї процедури початково загиблі клітини кожного індивідуального зразка електропорації віднімають і одержують тільки ефекти лізису, опосередкованого Т-клітинами.

Трансфіковані клітини-мішені засівали з людськими Т-клітинами в співвідношенні ефектора до мішені, рівному 5:1, у трьох повторностях в 96-лунковому форматі й інкубували при 37°С, 5% CO₂. Максимальний лізис (L_{max}) для нормалізації до показників спонтанної люмінесценції досягався шляхом додавання Triton X-100 у контрольні лунки, що містять ефекторні клітини й неопрацьовані клітини-мішені, безпосередньо перед додаванням люциферина. Після додавання розчину люциферина – у кожен лунку 50 мкл водяного розчину, що містить 1 мг/мл

люциферина (BD Monolight, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) і 50 мМ HEPES – люмінесценцію вимірювали на мікропланшетному рідері Infinite M200 Tecan через 24 год і 48 год. Специфічний лізис клітин-мішеней розраховували за формулою: % специфічного лізису = $[1 - (\text{люмінесценція тестований зразок} - L_{\text{max}}) / (L_{\text{min_тестований зразок}} - L_{\text{max}})] \times 100$.

На фігурі 35 показана крива залежності від концентрації специфічного лізису клітин-мішеней у відповідь на 6RHU3. З використанням рівняння Graphpad Prism для розрахунків величин EC_{50} «log(агоніст) проти відповіді – варіабельний нахил» виявили EC_{50} (24 год) = 548,0 нг/мл, і EC_{50} (48 год) = 194,5 нг/мл. Результат цього аналізу залежить значною мірою від сили людських Т-клітин, яка змінюється відповідно до імунного статусу донора, як описано також в інших джерелах (дивися, наприклад, (Lutterbuese, R. et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 107 (28), pp. 12605-12610).

Приклад 31: Проліферація Т-клітин у відповідь на трансфекцію IVT-мРНК 6RHU3

Проліферація Т-клітин є ознакою активації Т-клітин. Для демонстрації специфічної проліферації Т-клітин у відповідь на bi-scFv, що кодує IVT-мРНК 1BiMAB, у присутності CLDN 6-позитивних клітин-мішеней, використовували аналіз методом проточної цитометрії. Коротко, 1×10^7 людських Т-клітин, виділених, як описано в прикладі 16, фарбували 1 мкМ карбоксифлуоресцеїну діацетату сукцинімідилового складного ефіру (Celltrace CFSE, Invitrogen/Life Technologies GmbH, Germany), розчиненого в DPBS, в умовах темряви за кімнатної температури протягом 5 хв. Клітини промивали двічі DPBS /5% FCS і ресуспендували в аналітичному середовищі до 2×10^6 клітин на мл. Як клітини-мішені були вибрані клітини PA-1, які ендегенно експресують CLDN6 і – для тестування специфічності – CLDN 6-негативна клітинна лінія раку молочної залози MDA-MB-231. 20 мкг/мл IVT-мРНК 6RHU3 або нетаргетний контроль використовували для електропорації. Електропорацію PA-1 виконували, як описано в прикладі 27. Електропорацію MDA-MB-231 виконували з використанням наступних умов: 400 В, тривалість імпульсу 3 мс, 1 імпульс, інтервал між імпульсами 400 мс в 0,4 см кюветах Gene Pulser/Micropulser Cuvettes (Bio-Rad, dreieich, Germany). Аналіз на цитотоксичність, описаний у прикладі 27, проводили із трансфікованими клітинами-мішенями й людськими CFSE-міченими Т-клітинами як ефекторними клітинами. Як негативні контролю використовували тільки Т-клітини й нетрансфіковані або контрольні трансфіковані клітини-мішені плюс Т-клітини. Як позитивний контроль служили тільки Т-клітини, стимульовані 5 мкг/мл ОКТ3 (Bio X Cell, West Lebanon, NH, USA) і 2 мкг/мл анти-CD28 (Biolegend, fell, Germany). Білок 6RHU3 у концентрації 5 нг/мл наносили на нетрансфіковані клітини-мішені плюс Т-клітини для підтвердження валідності аналізу. Зразки, об'єднані з нетаргетним білком 1BiMAB, включали як контроль специфічності. Усі зразки готували в трьох повторностях у загальному обсязі 0,2 мл аналітичного середовища в 96-лункових планшетах. Через 72 год спільної інкубації Т-клітини збирали, переносили в 5 мл пробірки із круглим дном, промивали й фарбували при 4°C протягом 30 хв. 2 мкл анти-CD45-APC для диференціації людських Т-клітин від пухлинних клітин, і 0,25 мкл eFluor506 (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) для контрастного фарбування загиблих клітин в 200 мкл DPBS. Після відмивання DPBS клітини ресуспендували в FACS-буфері й аналізували за допомогою FACSCanto II (BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

Проліферацію Т-клітин детектували за зменшенням CFSE-сигналу тільки в присутності CLDN6-позитивних клітин-мішеней і анти-CLDN6-специфічного bi-scFv (дивися також фігуру 36). Крім позитивного контролю, проліферацію Т-клітин, яка складала 49-61%, можна було спостерігати в присутності CLDN 6-позитивних клітин-мішеней у комбінації з білком 6RHU3. Таргетні позитивні клітини, трансфіковані 6RHU3 IVT-мРНК, привели до 62% +/- 2%. Т-клітини, інкубовані з CLDN 6-негативними клітинами-мішенями MDA-MB-231, не показали значної проліферації в будь-яких умовах, а також Т-клітини без клітин-мішеней, за винятком позитивного контролю.

Приклад 32: Кількісний аналіз продукції білка після трансфекції IVT-мРНК 6RHU3 клітин ссавця

Для дослідження трансляції РНК у білок у клітинах ссавця як системи експресії вибирали клітинну лінію BHK21 (ATCC CRL-13001). 2×10^7 клітин BHK на мл трансфікували шляхом електропорації, як описано в прикладі 16, з тією відмінністю, що всі стадії проводили за кімнатної температури. 250 мкл клітинної суспензії переносили в 0,4 см кювети Gene Pulser/Micropulser Cuvettes (Bio-Rad, dreieich, Germany) і додавали 40 мкг/мл по.25 IVT-мРНК, IVT-мРНК 6RHU3 або IVT-реплікон РНК 6RHU3. Електропорацію виконували з використанням наступних умов: 300 В, тривалість імпульсу 16 мс, 1 імпульс, інтервал між імпульсами 400 мс.

Електропоровані клітини ресуспендували в культуральному середовищі за кімнатної температури (RPMI1640, 10 % FCS) і переносили в 15 см культуральні чашки. Через 5 год після засівання середовище, що містить FCS, заміняли середовищем, що не містить FCS. Для

прикладів 32 а й b через 18 год після електропорації окремо збирали супернатант клітинної культури й клітини. Клітинні осадки лізували в 1 x LDS буфері для зразка (номер за каталогом NP0008; Life technologies, Darmstadt, Germany) і нагрівали при 72 °C протягом 15 хв. Для аналізу ELISA використовували неконцентрований і приблизно 50-кратно концентрований супернатант.

5 Концентрування проводили за допомогою центрифужних фільтрів Amicon ultra-15 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) відповідно до протоколу виробника. Для прикладу 32 с (тільки IVT-мРНК) супернатант збирали через 48 год після трансфекції й піддавали 40-кратному концентруванню, як описано вище.

а. ELISA з використанням супернатанта

10 Для аналізу ELISA планшети, покриті нікелем (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Germany) використовували для захоплення аналіта через його His-мітку. Спочатку планшет промивали три рази 200 мкл промивного буфера (0,01 % Tween-20 в 1x PBS) на лунку. Як стандарт очищений білок 6RHU3 розводили в 1,75 % Na-казеїн в 1 x PBS (= розріджувач). Ряд розведень змінювався від 2,34 до 150 нг/мл із кроком в 2. 100 мкл на стандартне розведення переносили в лунку в трьох повторностях кожної концентрації. Відповідним чином, 100 мкл зразків переносили в трьох повторностях. Планшет герметично закривали адгезивною плівкою й інкубували при 37°C протягом 30 хвилин. Після цього планшети промивали три рази 200 мкл промивного буфера на кожну лунку. Для детекції 6RHU3/6RHU3 використовували анти-ідіотипічне моноклональне IgG 4F9, яке специфічно зв'язується з V_H-V_L CLDN6ab і, отже, також з 6RHU3/6RHU3. 4F9 змішували з розріджувачем до кінцевої концентрації 2,5 мкг/мл. 100 мкл розчину анти-ідіотипічного антитіла переносили в кожну лунку з наступною інкубацією протягом 30 хв. при 37 °C. Потім планшет промивали 3-кратно 200 мкл промивного буфера на кожну лунку, і 100 мкл AP-кон'югованого антимишачого детекторного антитіла (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA) – у розведенні 1:500 у розріджувачі – додавали в кожну лунку з наступною інкубацією протягом 30 хв. при 37 °C. Після заключної стадії промивання (3 x 200 мкл промивного буфера) у кожну лунку додавали 1,5 мг/мл субстрату pNPP у відповідному субстратному буфері (1M диетаноламін, 0,5 mM MgCl₂, 0,01 % Na-азид, pH 9,8) з наступною інкубацією протягом 30 хв. за кімнатної температури в умовах темряви. Для зупинки ферментативної реакції використовували 100 мкл 3M KIH на кожну лунку. Поглинання вимірювали за допомогою мікропланшетного ридера (Infinite M200, Tecan, Mannedorf, Switzerland). Для двоххвильового аналізу 405 нм установлювали як довжину хвилі вимірювання й 492 нм як довжину хвилі порівняння. Величини поглинання розраховували шляхом вирахування довжини хвилі порівняння з довжини хвилі вимірювання.

На фігурі 37 А нанесені середні величини поглинання, включаючи стандартні відхилення.

35 Концентрований супернатант із клітин, трансфікованих 6RHU3 IVT-мРНК і IVT-репліконом, викликав значний сигнал, підтверджуючи трансляцію bi-scFv-кодуєчої IVT-РНК. Концентрований супернатант із ложно-трансфікованих клітин і контролю по.25 (-контр) не викликав якого-небудь сигналу, як очікувалося. Фактичні концентрації білка не можуть бути припущені через токсичність конструкцій IVT-мРНК і IVT-реплікона, які відрізняються, і х-кратних концентратів, які незначно відрізняються. Визначена приблизна концентрація білка в неконцентрованому супернатанті знаходилась в межах 1,4 нг/мл для зразків IVT-реплікона й 5,9 нг/мл для зразків IVT-мРНК.

b. Вестерн-блот аналіз супернатанта й клітинних лізатів (зразків IVT-mRNA і IVT-реплікона)

45 Для аналізу методом Вестерн-блотинга концентровані супернатанти й клітинні лізати розділяли на NuPAGE Novex 4-12 % Bis-tris Gels (Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). Навантажували супернатант і клітинний лізат клітин BHK21, трансфікованих IVT-мРНК 6RHU3, IVT-репліконом РНК, IVT-мРНК по.25 або неопрацьованих клітин і позитивного контролю – 0,1 мкг очищеного білка 6RHU3. Вестерн-блот-аналіз виконували за допомогою стандартних процедур (Current Protocols in Protein Science, 2012). Коротко, після блотинга білків на PVDF-мембрані й блокування за допомогою PBST/3% сухого молока мембрану інкубували протягом 1 год при 4 °C з первинним антитілом Anti-HIS Epitope-Tag (Dianova GmbH, Hamburg, Germany) у розведенні 1:500 у блокувальному буфері. Після повторного промивання блокувальним буфером мембрану інкубували з Fc-специфічним вторинним козячим-анти-мишачим IgG антитілом, кон'югованим з пероксидазою (Sigma Aldrich, Germany), у розведенні 1:10000 у блокувальному буфері протягом 1 год при 4 °C. Після повторного промивання блокувальним буфером сигнали візуалізували за допомогою Supersignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) і записували за допомогою Imagequant LAS 4000 Imager (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany). Сигнали 6RHU3 детектували в діапазоні від 50 до 60 кДа в порівнянні з молекулярною масою внутрішнього стандарту.

Як показано на фігурі 37 В сигнали були детектовані в супернатантах клітин, трансфікованих по.25 IVT-мРНК (доріжка 1), 6RHU3 IVT-мРНК (доріжка 4) і IVT-репліконом РНК 6RHU3 (доріжка 5), тоді як сигнал був відсутній у доріжці 6 -супернатант від неопрацьованих клітин. Сильні сигнали можуть бути генеровані клітинними лізатами клітин, трансфікованих IVT-мРНК 6RHU3 (доріжка 8) і IVT-репліконом РНК (доріжка 9). Клітинний лізат клітин, трансфікованих по.25, привів до дуже слабкого сигналу (доріжка 2), неопрацьовані клітини (доріжка 10) показали відсутність сигналу. Піддавався детекції очищений контрольний білок 6RHU3 (доріжка 11). Порівняно слабкі сигнали в супернатанті й, разом з тим, слабка секреція 6RHU3 можливо обумовлені відносно коротким періодом інкубації після трансфекції. Через токсичний ефект реплікона РНК більш тривалі періоди інкубації не можуть бути тестовані.

Обидва аналізи є якісними й не можуть бути використані для визначення концентрації білка. с. Вестерн-блот аналіз супернатанта (зразки IVT-мРНК)

Супернатант, зібраний через 48 год після трансфекції, відокремлювали за допомогою SDS-PAGE з наступним вестерн-блот-аналізом, як описано в прикладі 32 b. Як показано на фігурі 27 С, по.25 і 6RHU3, трансльований з IVT-мРНК і секретований у супернатант, детектували за допомогою їх His-мітки. При цьому може бути підтверджена продукція й секреція 6RHU3, а також по.25, який використовували як контроль специфічності bi-scFv.

Приклад 33: Детекція *in vivo* трансльованого й функціонального CLDN 6-специфічного bi-scFv білка після внутрішньом'язової ін'єкції РНК

Мишачих самок і самців лінії NSG у віці 8-16 тижнів відбирали й розподіляли на 4 групи по 5 мишей. Кожній миші в стегновий м'яз ін'єктували 40 мкл розчину РНК. В 40 мкл розчину РНК утримувалося 1x PBS, 5 мкг D 2-кепованого IVT-мРНК 6RHU3 або реплікона, 2 мкг D 1-кепованого IVT-мРНК люциферази й 0 або 15 мкг D 1-кепованого IVT-мРНК EBK. IVT-мРНК EBK, що кодує білки E3L, B18R і K3L (EBK) вірусу осповакцини, спільно ін'єктували для інгібування відповіді IFN і для протидії активації PKR з метою посилення трансляції РНК (заявка на патент PCT/EP2012/04673). Сигнал люциферази спостерігали через 24 год після ін'єкції Xenogen IVIS 2000 для виключення мишей без сигналу з колекції зразків.

Кров збирали через 2, 4 і 7 днів після ін'єкції. Сироватку збирали й потім заморожували при -80 °C.

Аналіз на цитотоксичність

Сироватку мишей NSG аналізували в аналізі на цитотоксичність *in vitro*. Клітини-мішені PA-1, стабільно трансдуковані люциферазою світлячка й ендогенно експресованим CLDN6, засівали людськими Т-клітинами (виділеними, як описано в прикладі 16) у співвідношенні Е:Т, рівному 30:1, для максимальної чутливості. Аналітичне середовище складалося із середовища RPMI 1640, доповненого 10% термоінактивованою FCS, 0,5 % пеніциліну-стрептоміцину, 1x NEAA і 1 мМ пірувата натрію (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). 20 мкл відталої тестованої сироватки додавали в кожну лунку з тестованим зразком. Лунки зі стандартним контрольним білком 6RHU3, лунки з L_{min} і L_{max} наповнювали 20 мкл сироватки неопрацьованих мишей NSG. Кінцевий обсяг на лунку склав 100 мкл. L_{min} засівали дванадцятикратно, L_{max} шестикратно й тестовані зразки в трьох повторностях. Через 48 год інкубації при 37 °C і 5 % CO₂ лунки L_{max} змішували з 10 мкл 2 % розчину Triton X-100 і інкубували протягом 10 хв. В усі інші лунки додавали 10 мкл аналітичного середовища. Додавали 50 мкл розчину люциферина (дивися приклад 23) і планшети вимірювали – через 30 хв. стадії інкубації при 37 °C у умовах темряви – на мікропланшетному рідері Infinite M200 (TECAN, Männedorf, Switzerland). Розрахунки специфічного лізису клітин-мішеней виконували, як описано в прикладі 23.

На фігурі 28 показаний відсоток специфічного лізису. Значні цитотоксичні ефекти детектували в кожній групі. Концентрація CLDN6-специфічного білка bi-scFv була значно збільшена шляхом спільної ін'єкції з EBK у випадку IVT-мРНК 6RHU3.

Ці дані підтверджують *in vivo* трансляцію 6RHU3 з IVT-мРНК або –реплікона й секрецію в кровоток після внутрішньом'язової ін'єкції.

Приклад 34: Генерування й тестування біспецифічних з'єднувальних агентів, що направлено впливають на CLDN18.2 або CLDN6 і CD3

Для подальшої розробки анти-CLDN18.2 і анти-CLDN6 специфічних фрагментів антитіла bi-scFv були розглянуті інші аспекти для оптимізації оригінального білка. Ці аспекти в основному спрямовані на одержання препаратів з більш високою однорідністю відносно різних різновидів фолдинга, дисульфідних ізомерів і олігомерів, які можуть формуватися при рекомбінантній продукції білка. Ці модифікації не повинні впливати на функціональну активність білків bi-scFv.

Заміщення додаткового (непарного) цистеїнового залишку в анти-CD3 з'єднувальному домені bi-scFv білків.

Для дослідження здатності непарних цистеїнових залишків, що виникають у межах

первинної послідовності домена Ig, перешкоджати правильному формуванню внутрішньоланцюгових і/або міжланцюгових дисульфідних зв'язків, які є важливими для належного згортання й стабільності отриманого фрагмента антитіла, було генеровано кілька синтетичних конструкцій. Такі непарні цистеїни можуть негативно впливати на ефективність, 5 однорідність, продуктивність і стабільність кінцевого білкового продукту й, отже, повинні уникатися. На додаток до «стандартного» набору цистеїнів, залучених в утворення пар дисульфідних зв'язків, у варіабельних доменах можуть бути присутніми вільні цистеїнові залишки.

Наприклад, у домені VH антитіла OKT3 у положенні H92 присутні три залишки консервативного цистеїна перед початком CDR-H3 і формують структурний дисульфідний зв'язок з положенням H22. Але в цій молекулі в положенні H100A (CDR-H3) інший цистеїн (Cys) може забезпечити неправильне згортання, при якому H100A замість H92 є залученим у формування дисульфідного зв'язку з H22, генеруючи, таким чином, неправильно згорнутий, 10 нерозчинний і нефункціональний продукт. Для подолання цього можливого неправильного спарювання цистеїнових залишків виконували сайт-спрямоване заміщення вільного цистеїна (Kipriyanov, Protein Engineering 10:445-453, 1997). За допомогою цього одиночного заміщення було досягнуто значне збільшення продуктивності й стабільності scFv, отриманого з OKT3, при збереженні загальної з'єднувальної активності.

Домен VH анти-CD3 антитіла TR66 (SEQ ID NO: 36), використовуваний у даному дослідженні, містить такий вільний цистеїн у положенні H103 первинної послідовності, як 20 показано в SEQ ID NO: 36. Порівняння послідовностей домена VH анти-CD3 антитіла TR66 (SEQ ID NO: 36) з доменом VH анти-CD3 антитіла OKT3 показало гомологію послідовностей, яка складає 96,6%.

Згідно із цими результатами, заміщення вільного цистеїна сериновим залишком у межах 25 CDR-H3 домена VH анти-CD3 антитіла TR66 виконували для білків bi-scFv, що направлено впливають на CD3 (SEQ ID NO: 94) і або для CLDN18.2 або CLDN6. Уведення таких замісників дозволило сконструювати білки bi-scFv 1-biMAB-s (SEQ ID NO: 103) і 6-PHU3-S (SEQ ID NO: 110) (дивися таблиці 11 і 12, відповідно).

Заміщення додаткових (непарних) цистеїнових залишків в анти-CLDN6 білках bi-scFv

Батьківське анти-CLDN6 антитіло mCLDN6ab, варіабельні домени якого використовували для складання відповідних білків bi-scFv 6PHU3 (SEQ ID NO: 45) і 6PHU5 (SEQ ID NO: 43), 30 містить непарний цистеїновий залишок у межах фланкованої області CDR-L2 домена L2 у положенні 46 відповідної первинної послідовності. Це відповідає положенню 45 у межах SEQ ID NO: 23, де перша амінокислота VL пропущена. Різні заміщення виконували для заміщення 35 цього вільного цистеїна:

- сериновим залишком аналогічно заміщенню в домені VH анти-CD3 антитіла (TR66 (SEQ ID NO: 100));

- лейциновим залишком, шляхом порівняння з амінокислотною послідовністю інших анти-CLDN6 антитіл (SEQ ID NO: 97 і 98);

- триптофановим залишком, шляхом порівняння амінокислотної послідовності з базою даних зародкової лінії (SEQ ID NO: 99).

Оцінка довжини лінкера, порядку V-домени і штучних сполучних дисульфідних зв'язків в анти-CLDN18.2 bi-scFv білках

Як інший приклад Arndt et al. (Biochemistry 37:12918-12926, 1998) описує так звану заміну 45 домена як можливе пояснення появи нековалентно зв'язаних олігомерів фрагментів scFv. Згідно із цією моделлю білок знаходиться в стані можливої термодинамічної рівноваги між мономерною і димерною/олігомерною формою через постійно виникаючий внутрішньо- і міжмолекулярний обмін пограничних контактів VL/VH. Ці олігомери можуть уже бути присутніми у супернатанті клітинної культури й повинні бути вилучені під час процесу очищення. Однак ці 50 молекулярні різновиди можуть також формуватися під час зберігання очищених мономерних різновидів.

На кращий енергетичний статус сильний вплив виявляє загальна конструкція (первинна послідовність, довжина лінкера, орієнтація VL/VH і т.д.).

Worn і Pluckthun (JMB 305:989-1010, 1999) указують, що форми з більш високим вмістом мономерних різновидів можуть бути отримані шляхом використання лінкера, що складається з 55 20 або більше залишків. У публікації Desplancq et al., (Protein Eng. 7:1027-1033, 1994) зазначено, що орієнтація варіабельного домена також може впливати на формування димерів і високомолекулярних форм. У цій же публікації Desplancq зазначено, що лінкер, що складається з 25 або 30 амінокислот (aa) показав краще співвідношення мономера в порівнянні з димером 60 для їхнього конкретного антитіла. Відстань між C-кінцем VL і N-кінцем VH становить близько 39-

43 А, і відстань між С-кінцем VH і N-кінцем VL становить 32-34 А (Pluckthun et al., From PCR to fermentation. (J. McCafferty, H. R. Hoogenboom, & D. J. Chriswell, Eds.). In: (IRL Press., pp. 203-252, 1996). Для одержання аналогічних молекулярних властивостей лінкер для орієнтації VL-VH повинен бути довшим, ніж лінкер VH-VL. У публікації Pluckthun et al., From PCR to fermentation. (J. McCafferty, H. R. Hoogenboom, & D. J. Chriswell, Eds.). In: (IRL Press., pp. 203-252, 1996) рекомендовано використання лінкерів довжиною від 15 до 20 амінокислот в орієнтації VH/VL і лінкерів довжиною 20-25 амінокислот в орієнтації VL/VH.

Іншою можливістю направити формування мономерів і стабілізувати взаємодію доменів VH/VL є конструювання пограничного дисульфідного зв'язку в пограничну область контакту між двома доменами. Уведення дисульфідного містка в положенні H44-L100 (нумерація Kabat) найчастіше використовували в scFv із задовільними результатами (Brinkmann et al., PNAS. 90:7538-7542, 1993; Worn and Pluckthun, Biochemistry 38: 8739-8750, 1999; Weatherill et al., PEDS. 25:321-329, 2012). Цю стратегію успішно використовували для стабілізації IgG-подібних біспецифічних антитіл, поєднуючи scFv, злитий з IgG повної довжини (Michaelson et al., MABs 1: 128-141, 2009; Schanzre et al., Antimicrob. Agents. Chemother. 55:2369-2378, 2011).

Weatherill et al., (PEDS 25:321-239, 2012) стабілізував людський scFv (VH-(G4S)₄-VL і VL-(G4S)₄-VH) з дисульфідним зв'язком між положенням VH44 і VL-100. Більше того, у цій публікації освітлена проблема можливої заміни домена на scFv, що не містить пограничного дисульфідного зв'язку, шляхом виконання різних експериментів SE-HPLC при різному обсязі навантаження й концентрації. Аналізи показали різні результати залежно від умов навантаження зразка для нестабілізованого scFv, але незалежно від умов, у яких використовувалися дисульфідні стабілізовані молекули, елюйовані аналогічно мономеру. У роботі Zhao et al., (Int. J. Mol. Sci. 12:1-11, 2011) уведена така ж мутація в scFv і спостерігалася більш висока стабільність стабілізованої молекули після зберігання протягом 20 год при 37 °C.

Для біспецифічного формату з використанням scFv, злитого з IgG повної довжини, Schanzer et al., (Antimicrob. Agents Chemother. 55:2369-2378 2011) порівнювали ефект довжини лінкера й пограничного дисульфідного зв'язку. Вони зливали батьківський scFv або scdFv (VH-(G4S)₃-VL) на С- або N-кінцевій частині важкого ланцюга або легких ланцюгів. Для різної довжини лінкера (20, 25 і 30 амінокислот) вони зливали батьківський scFv із С-кінцевою частиною важких або легких ланцюгів. Результати, отримані з використанням різної довжини лінкера, ідентифікували 30 аа пептид як більш переважний лінкер для одержання стабільних мономерів. Рівень агрегатів через 7 днів зберігання при 40 °C склав 50 % для scFv15, 18 % для scFv20, 8 % для scFv25 і 6 % для scFv30, але дисульфід scFv15, стабілізований пограничним дисульфідним зв'язком, незначно перевершував scFv30. Такий же підхід був використаний Michaelson et al., (MABs. 1:128-141 2009), і вони поліпшили своє батьківське IgG-подібне біспецифічне антитіло, що містить scFv з 15 аа лінкером в орієнтації VH/VL (генеруючи 40 % агрегатів), шляхом збільшення довжини лінкера до 20 аа scFv і введення пограничного дисульфідного зв'язку між положенням VH₄₄ і VL-100. Отримана молекула містила більше 98% мономерів, які були стабільними через три місяці при 4 °C. Автори вирішили працювати над поліпшенням молекули scFv перед переходом до біспецифічного формату.

У випадку анти-CLDN18.2-специфічних білків bi-scFv невідомо, чи може виникати формування димерів і високомолекулярних форм і яке залучення молекул анти-клаудин і/або анти-CD3 scFv. Для оцінки всієї оптимальної молекули для анти-CLDN18.2-специфічного білка bi-scFv для кожного окремого scFv оцінювали наступні модифікації:

- орієнтацію домена;
- довжину лінкера;
- введення пограничного дисульфідного зв'язку;
- комбінацію трьох модифікацій.

Для анти-клаудин 18.2 з'єднувального домена, додатково до варіабельних доменів, отриманих з mCLDN18.2ab (VH: SEQ ID NO: 8; VL: SEQ ID NO: 15), послідовності, отримані з mCLDN18.2ab1 (VH: SEQ ID NO: 6; VL: SEQ ID NO: 11), використовували для конструювання анти-CLDN18.2-специфічних білків bi-scFv.

У таблиці 11 у розділі А.а «Вихідні послідовності, дизайн 32 анти-CLDN18.2-специфічних конструкцій bi-scFv і клонування в експресійні вектори» описані різні конструкції.

А. Генерация й тестування біспецифічних з'єднувальних агентів, що направлено впливають на CLDN18.2 і CD3

а. Вихідні послідовності, дизайн 32 анти-CLDN18.2-специфічних конструкцій bi-scFv і клонування в експресійні вектори

Конструкції біспецифічного тандемного одноланцюгового антитіла bi-scFv, представлені тут, містять два відмінні з'єднувальні домени, з яких перший є специфічним відносно людського

пухлиноасоційованого антигену (ТАА), тоді як другий є специфічним відносно ϵ -ланцюга людського Т-клітинного рецептора (CD3). Кожний із двох з'єднувальних доменів біспецифічної молекули містить два варіабельні домени антитіла, розташованих як фрагмент scFv в VH-VL або VL-VH орієнтації. Варіабельні домени антитіла з'єднані за допомогою гнучкого гліцин-серинового пептидного лінкера, що складається із чотирьох або п'яти повторів субодиниць G4S залежно від орієнтації. Таким чином, фрагменти scFv, розташовані в орієнтації VH-VL, з'єднані лінкером з 20 амінокислот (називаним «LL4»), VL-VH з'єднані лінкером з 25 амінокислот (називаним «LL5»). Два фрагменти scFv, з іншого боку, з'єднані за допомогою довгого лінкера SG4S, що складається із шести амінокислот (названого «SL»). Інформація стосовно вихідних послідовностей, що походять з моноклональних антитіл (mAb) і організації доменів узагальнено в таблиці 11.

Варіанти 5504, 5505, 5506, 5507, 5512, 5513, 5514, 5515, 5520, 5521, 5522, 5523, 5528, 5529, 5530, 5531, 5536, 5537, 5538, 5539, 5544, 5545, 5546, 5547, 5552, 5553, 5554, 5555, 5560, 5561, 5562 і 5563 містять VH анти-CD3 з SEQ ID NO: 95 і VL анти-CD3 з SEQ ID NO: 96.

У конкретному випадку 1-biMAB-S зроблене тільки заміщення вільного цистеїну на серин в VH анти-CD3 (SEQ ID NO: 94) у порівнянні з амінокислотною послідовністю 1-biMAB послідовності (SEQ ID NO: 39). Слід зазначити, що SEQ ID NO: 39 ще містить амінокислотну послідовність N-кінцевої сигнальної послідовності, яка опосередковує секрецію 1-biMAB білка bi-scFv у супернатант клітинної культури при експресії в ссавця. Ця сигнальна послідовність не є частиною секретованого рекомбінантного білка, тому що розщеплюється сигнальною пептидазою у просвіті ендоплазматичного ретикула.

Гени, що кодують конструкції bi-scFv, були створені за допомогою генного синтезу Genearf® (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) з використанням програмного забезпечення GeneOptimizer® software для оптимізації використання кодонів для експресії в клітинах CHO. Крім загального сигналу секреції, усі ДНК-конструкції містять однакову послідовність Kozak і сайт рестрикції HindIII на 5'-кінці. На 3'-кінці сайти розпізнавання BsiWI і XhoI додані для забезпечення гнучкого субклонування в різні експресійні вектори. Субклонування в переважний експресійний вектор pCEP4 (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) виконували за допомогою Life Technologies з використанням сайтів рестрикції HindIII і XhoI.

Таблица 11

Короткий опис конструкцій анти-CLDN18.2 bi-scFv

Ідент. варіанта	Походж. анти-CLDN18.2	Походж. анти-CD3	Заміна. у пол. H103 TR66	Порядок домена (від N- до 3-кінця)	Організація домена*)	SEQ ID NO;
1 Bimab-s	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	см 1 Bimab у прикладі 1	103
5504	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VH-LL4-VL-SL-VH-LL4-VL	66
5505	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-(VH-LL4-VL)-SL-VH-LL4-VL	67
5506	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VH-LL4-VL-SL-VH-LL4-VL	68
5507	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-(VH-LL4-VL)-SL-VH-LL4-VL	69
5512	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VH-LL4-VI-SI-ds(VH-LL4-VL)	70
5513	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-vh-ll4-VI-SI-ds(VH-LL4-VL)	71
5514	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VH-LL4-VI-SI-ds(VH-LL4-VL)	72
5515	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-vh-ll4-VI-SI-ds(VH-LL4-VL)	73
5520	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VH-LL4-VL-SL-VL-LL5-VH	74
5521	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-(VH-LL4-VL)-SL-VL-LL5-VH	75

5522	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VH-LL4-VL-SL-VL-LL5-VH	76
5523	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-(VH-LL4-VL)-SL-VL-LL5-VH	77
5528	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VH-LL4-VI-SI-ds(VL-LL5-VH)	78
5529	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-vh-II4-VI-SI-ds(VL-LL5-VH)	79
5530	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VH-LL4-VI-SI-ds(VL-LL5-VH)	80
5531	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-vh-II4-VI-SI-ds(VL-LL5-VH)	81
5536	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VL-LL5-VH-SL-VH-LL4-VL	82
5537	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-(VL-LL5-VH)-SL-VH-LL4-VL	83
5538	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VL-LL5-VH-SL-VH-LL4-VL	84
5539	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-(VL-LL5-VH)-SL-VH-LL4-VL	85
5544	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VL-LL5-Vh-SI-ds(VH-LL4-VL)	86
5545	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-vl-II5-Vh-SI-ds(VH-LL4-VL)	87
5546	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VL-LL5-Vh-SI-ds(VH-LL4-VL)	88
5547	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-vl-II5-Vh-SI-ds(VH-LL4-VL)	89
5552	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VL-LL5-VH-SL-VL-LL5-VH	--
5553	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-(VL-LL5-VH)-SL-VL-LL5-VH	--
5554	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VL-LL5-VH-SL-VL-LL5-VH	--
5555	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-(VL-LL5-VH)-SL-VL-LL5-VH	--
5560	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VL-LL5-Vh-SI-ds(VL-LL5-VH)	90
5561	mcldn18.2ab1	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-vl-II5-Vh-SI-ds(VL-LL5-VH)	91
5562	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	VL-LL5-Vh-SI-ds(VL-LL5-VH)	92
5563	mcldn18.2ab	TR66	Серин	scFv-анти-cldn18.2-scFv анти-CD3	ds-vl-II5-Vh-SI-ds(VL-LL5-VH)	93

*) LL4, (G4S)₄; LL5; (G4S)₅; SL, SG4S

5 Слід зазначити, що послідовності SEQ ID NO: з 66 по 93 ще містять амінокислотну послідовність N-кінцевої сигнальної послідовності, яка опосередковує секрецію 1-biMAV білка bi-scFv у супернатант клітинної культури при експресії в ссавця. Ця сигнальна послідовність не є частиною секретованого рекомбінантного білка, тому що розщеплюється сигнальною пептидазою у просвіті ендоплазматичного ретикулума.

б. Одержання й очищення 32 анти-CLDN18.2-специфічних білків bi-scFv шляхом тимчасової трансфекції

10 Адаптовані до росту в суспензії CHO-клітини субкультивували в безсировотковому середовищі у зволоженій атмосфері CO₂ на орбітальному струшувачі. За день до трансфекції клітини засівали в безсировоткове середовище в колби у струшувачі. У день трансфекції клітини центрифугували (5 хв. при 200 x g) і ресуспендували у свіжому середовищі DMEM

(Invitrogen, 41965-039) у колбах струшувача. ДНК і реагент для трансфекції додавали в клітини й обережно перемішували шляхом струшування. Після інкубації в стандартних умовах у CO₂-інкубаторі клітини розбавляли безсировотковим середовищем для росту й потім вирощували для експресії в інкубаційному струшувачі. Клітини подживлювали CHO CD EfficientFeed™ C (Invitrogen, A13275) відповідно до потреб у живленні. Білки bi-scFv збирали після того, як життєздатність клітин починала знижуватися. Конструкції антитіла очищали за допомогою Capto L сефарози. Концентрацію білків визначали шляхом вимірювання поглинання при 280 нм.

с. Аналіз на цитотоксичність на основі люциферази з використанням 32 анти-CLDN18.2-специфічних білків bi-scFv

Для функціонального скринінгу 32 анти-CLDN18.2-специфічних білків bi-scFv чотири титрування (5000, 1000, 200 і 40 нг/мл) тестували в *in vitro* аналізі на цитотоксичність на основі люциферази, як описано в прикладі 2.с.

Клітини NucC4, які стабільно експресують люциферазу, описані в прикладі 2.с, інкубували з людськими Т-клітинами й білками bi-scFv або без білка bi-scFv для визначення величин L_{min}. Люмінесценцію життєздатних клітин вимірювали за допомогою планшетного ридера Infinite M200 Тесар через 24 год і 48 год після початку аналізу. Специфічний лізис клітин-мішеней розраховували за формулою, наведеною у прикладі 2.с.

Після виконання кількісної оцінки результатів аналізу на цитотоксичність (фігури 39 а, b, c і d) на основі scFv анти-CD 3-з'єднувальних доменів можуть бути зроблені наступні висновки.

Найбільш ефективні анти-CLDN18.2-специфічні білки bi-scFv в аналізі на цитотоксичність на основі люциферази містять фрагмент анти-CD3 в орієнтації доменів VH/VL, з'єднаний лінкером «LL4» із пограничним дисульфідним містком або без нього (5504, 5505, 5506, 5507, 5536, 5537, 5538, 5539, 5512, 5513, 5514, 5515, 5544, 5545, 5546, 5547; фігури 39 а й b). Більш низька цитотоксична активність отримана для варіантів, що містять фрагмент анти-CD3 в орієнтації доменів VL/VH з пептидним лінкером «LL5» і утримуючих пограничний дисульфідний місток (5528, 5529, 5530, 5531, 5560, 5561, 5562, 5563; Фіг. 39 d). Найнижча цитотоксична активність отримана для варіантів, що містять фрагмент анти-CD3 в орієнтації доменів VL/VH з пептидним лінкером «LL5» без пограничного дисульфідного містка (5520, 5521, 5522, 5523, 5552, 5553, 5554, 5555; Фіг. 39 c).

В. Генерація й тестування біспецифічних з'єднувальних агентів, що направлено впливають на CLDN6 і CD3

а. Походження послідовностей, дизайн конструкцій bi-scFv і клонування експресійного вектора

Конструкції біспецифічного тандемного одноланцюгового антитіла bi-scFv, представлені тут, містять два відмінні з'єднувальні домени, один з яких є специфічним відносно людського пухлиноасоційованого антигену (ТАА), і інший є специфічним відносно ε-ланцюга людського Т-клітинного рецептора (CD3). Кожний із двох доменів біспецифічної молекули містить два варіабельні домени антитіла, розташованих у вигляді фрагмента scFv у кожній з орієнтацій VH-VL або VL-VH. Варіабельні домени антитіла з'єднані за допомогою гнучкого гліцин-серинового пептидного лінкера. Фрагменти scFv, що направлено впливають на ТАА, розташовані в орієнтації VH-VL і з'єднані лінкером з 15 амінокислот (називаним «LL3»), що складаються із трьох ідентичних повторів субодиниць G₄S. Фрагменти scFv, що направлено впливають на CD3, також розташовані в орієнтації VH-VL, але з'єднані лінкером з 18 амінокислот (називаним «LLV1») з послідовністю G₄S(G₂S)₃G₃S. Два фрагменти scFv, з іншого боку, з'єднані за допомогою довгого лінкера SG₄S із шести амінокислот (названого «SL»). Інформація щодо походження послідовностей з моноклональних антитіл (МAB) і організації доменів узагальнена в таблиці 12. Варіанти 5454, 5456, 5458, 5460, 5462 і 5464 містять для анти-CD3 з'єднувальний домен VH анти-CD3 з SEQ ID NO: 95 і VL анти-CD3 з SEQ ID NO: 96. Варіанти 5454 і 5458 містять VL анти-CLDN6 з SEQ ID NO: 98; варіанти 5457 і 5460 містять VL анти-CLDN6 з SEQ ID NO: 99; варіанти 5462 і 5464 містять VL анти-CLDN6 з SEQ ID NO: 100.

У конкретному випадку 6PHU3-S (SEQ ID NO: 101) зроблено тільки заміщення вільного цистеїну на сериновий залишок в VH анти-CD3 (SEQ ID NO: 94) у порівнянні з амінокислотною послідовністю 6-PHU3 (SEQ ID NO: 45). Слід зазначити, що SEQ ID NO: 45 ще містить амінокислотну послідовність N-кінцевої сигнальної послідовності, яка опосередковує секрецію 6-PHU-3 білка bi-scFv у супернатант клітинної культури при експресії в ссавця. Ця сигнальна послідовність не є частиною секретованого рекомбінантного білка, тому що розщеплюється сигнальною пептидазою у просвіті ендоплазматичного ретикулума. Більше того, для 6PHU3-SL (SEQ ID NO: 102) зроблено заміщення вільного цистеїну на лейциновий залишок в VL анти-CLDN (SEQ ID NO: 97) у положенні 46 відповідної первинної послідовності в порівнянні з амінокислотною послідовністю 6PHU3-S. Це відповідає положенню 45 у межах SEQ ID NO: 23,

де перша амінокислота VL є пропущеною.

Гени, що кодують конструкції bi-scFv, були генеровані за допомогою генного синтезу Geneart® (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) з використанням програмного забезпечення GeneOptimizer® software для оптимізації використання кодонів для експресії в клітинах CHO. Крім загального сигналу секреції, усі ДНК-конструкції містять однакову послідовність Kozak і сайт рестрикції HindIII на 5'-кінці. На 3'-кінці сайти розпізнавання BsiWI і XhoI додані для забезпечення гнучкого субклонування в різні експресійні вектори. Субклонували в переважний експресійний вектор pEE12.4 (LONZA Group Ltd., Basel, Switzerland) виконували за допомогою стандартних технологій з використанням сайтів рестрикції HindIII і BsiWI.

Таблиця 12

Короткий опис конструкцій анти-CLDN6 bi-scFv

Ідентиф. варіанта	Походж. анти-CLDN6	Заміна в пол. L46 mcln6ab	Походж. анти-CD3	Заміна в пол. H103 TR66	Порядок доменів (від N- до C-кінця)	Організ. доменів*)	SEQ ID NO:
5454	mcln6ab	Лейцин	TR66	Серин	scFvанти-CLDN 6-scFvанти-cd3	VH-LL3-vl-sl-vh-llv1-VL	60
5456	mcln6ab	Триптофан	TR66	Серин	scFvанти-CLDN 6-scFvанти-cd3	VHLL3VL-SL-VH-LLV1-VL	61
5462	mcln6ab	Серин	TR66	Серин	scFvанти-CLDN 6-scFvанти-cd3	VH-LL3-vl-sl-vh-llv1-VL	62
6PHU3-S	mcln6ab	Немає даних	TR66	Серин	scFvанти-CD 3-scFvанти-cldn6	See 6PHU3 in Example 9	101
6PHU3-SL	mcln6ab	Лейцин	TR66	Серин	scFvанти-CD 3-scFvанти-cldn6	See 6PHU3 in Example 9	102
5458	mcln6ab	Лейцин	TR66	Серин	scFvанти-CD 3-scFvанти-cldn6	Vh-llv1-VL-SL-VH-LL3-VL	63
5460	mcln6ab	Триптофан	TR66	Серин	scFvанти-CD 3-scFvанти-cldn6	Vh-llv1-VL-SL-VH-LL3-VL	64
5464	mcln6ab	Серин	TR66	Серин	scFvанти-CD 3-scFvанти-cldn6	Vh-llv1-VL-SL-VH-LL3-VL	65

*) LL3, (G4S)₃; Llv1, G4S(G2S)₃G3S; SL; SG4S

b. Одержання й очищення 6 анти-CLDN6-специфічних білків bi-scFv шляхом тимчасової трансфекції

Адаптовані до росту в суспензії CHO-клітини субкультивували в безсировотковому середовищі у зволоженій атмосфері CO₂ на орбітальному струшувачі. За день до трансфекції клітини засівали в безсировоткове середовище в колби струшувача. У день трансфекції клітини центрифугували (5 хв. при 200 x g) і ресуспендували у свіжому середовищі DMEM (Invitrogen, 41965-039) у колбах струшувача. ДНК і реагент для трансфекції додавали в клітини й обережно перемішували шляхом струшування. Після інкубації в стандартних умовах у CO₂-інкубаторі клітини розбавляли безсировотковим середовищем для росту й потім вирощували для експресії в інкубаційному струшувачі. Клітини підживлювали CHO CD EfficientFeed™ C (Invitrogen, A13275) відповідно до потреб у живленні. Білки bi-scFv збирали після того, як життєздатність клітин починала знижуватися. Конструкції антитіла очищали за допомогою FPLC з використанням Capto L сефарози. Концентрацію білків визначали шляхом вимірювання поглинання при 280 нм.

c. Визначення EC50 5 анти-CLDN6-специфічних білків bi-scFv

Для визначення половини максимальної ефективної дози анти-CLDN6-специфічних білків bi-scFv ряд титрувань білків bi-scFv тестували в аналізі на цитотоксичність із використанням люциферази in vitro, як описано в прикладі 13.

Клітини PA-1, які стабільно експресують люциферазу і людські Т-клітини в співвідношенні Е:Т, рівному 5:1, інкубували з білком bi-scFv при концентрації в діапазоні від 2,5 пг/мл до 5 мкг/мл (10 кроків) або без анти-CLDN6-специфічних білків bi-scFv для визначення величин L_{min}.

Три незалежні аналізи препарату людських Т-клітин виконували з різними донорами-людьми. Результати представлено на фігурі 40.

Після виконання кількісного порівняння результатів аналізу на цитотоксичність на основі заміщення цистеїнового залишку в межах фланкуючої області CDR-L2 серином, лейцином або триптофаном, і на основі положення анти-CLDN6 і анти-CD3 з'єднувальних доменів, можуть бути зроблені наступні висновки.

- 5 Найбільш ефективні анти-CLDN 6-специфічні білки bi-scFv в аналізі на цитотоксичність на основі люциферази містять заміщення цистеїну на триптофан для анти-CLDN6 з'єднувального домена в N-кінцевій частині білка bi-scFv (варіант 5456). Незначно більш низька цитотоксична активність отримана для варіантів, що містять анти-CLDN6 у C-кінцевій частині із заміщенням цистеїну на триптофан (варіант 5460) або серин (варіант 5464). Для варіантів, що містять
- 10 заміщення цистеїну на лейцин, що містять анти-CLDN6 в N-кінцевій частині (варіант 5454) або C-кінцевій частині (варіант 5458) білків bi-scFv, більш низька цитотоксична активність обмірювана в порівнянні з попередніми варіантами. Зненацька було виявлено, що варіант, що містить заміщення цистеїну на серин з анти-CLDN6 в N-кінцевій частині (варіант 5462) білка bi-scFv мав саму низьку цитотоксичну активність.

15

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> БІОНТЕХ АГ та інші
 <120> АГЕНТИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЕКСПРЕСУЮЧИХ КЛАУДИН РАКОВИХ
 ЗАХВОРЮВАНЬ
 <130> 674-86 PCT
 <150> PCT/EP2012/004712
 <151> 2012-11-13
 <150> PCT/EP2013/002270
 <151> 2013-07-30
 <160> 108
 <170> Патентна версія 3.5
 <210> 1
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

```

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

```

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
 195 200 205
 Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
 210 215 220
 Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
 225 230 235 240
 Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
 245 250 255
 Lys His Asp Tyr Val
 260

<210> 2
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

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

```

      195              200              205
Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
      210              215              220
<210> 3
<211> 220
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3
Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu
1              5              10              15
Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val
      20              25              30
Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu
      35              40              45
Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
      50              55              60
Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
65              70              75              80
Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Phe Gly Leu Leu
      85              90              95
Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp
      100              105              110
Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser
      115              120              125
Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Val Ile
      130              135              140
Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu
145              150              155              160
Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
      165              170              175
Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly
      180              185              190
Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser
      195              200              205
Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
      210              215              220
<210> 4
<211> 207
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 5

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20           25           30
Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35           40           45

```

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 6
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Фрагмент антибіла
 <400> 6

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

<210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Фрагмент антибіла
 <400> 7

```

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

```

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 8

```

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

```

<210> 9

```

<211> 118
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Фрагмент антитіла
<400> 9
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
           20           25           30
Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
           50           55           60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
           65           70           75           80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
           85           90           95
Ala Arg Gly Val Leu Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
           100          105          110
Ser Val Thr Val Ser Ser
           115
<210> 10
<211> 120
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Фрагмент антитіла
<400> 10
Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Arg Ser Pro Gly Ser
1           5           10           15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val Phe Pro Phe
           20           25           30
Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly Phe Glu Trp
           35           40           45
Ile Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Lys
           50           55           60
Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser Asn Thr Ala
           65           70           75           80
Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr

```

```

      85              90              95
Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100              105              110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
      115              120

```

```

<210> 11
<211> 113
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Фрагмент антитіла
<400> 11

```

```

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

```

Lys

```

<210> 12
<211> 106
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Фрагмент антитіла
<400> 12

```

```

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1              5              10              15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
      20              25              30
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

```

```

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

```

```

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Фрагмент антитіла
<400> 13

```

```

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

```

```

<210> 14
<211> 113
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Фрагмент антитіла
<400> 14

```

```

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

```

```

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

```

```

<210> 15
<211> 113
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> Фрагмент антитіла
<400> 15

```

```

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

```

```

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

<220>

<223> фрагмент антитіла

<400> 16

```

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

```

<210> 17

<211> 113

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> фрагмент антитіла

<400> 17

```

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

```

```

<210> 18
<211> 113
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Фрагмент антитіла
<400> 18
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1             5             10             15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20             25             30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35             40             45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50             55             60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65             70             75             80
Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85             90             95
Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100            105            110
Lys
<210> 19
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Фрагмент антитіла
<400> 19
Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
1             5             10             15
Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr
20             25             30
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35             40             45
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50             55             60
Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala
65             70             75             80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu

```

```

      85      90      95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
      100      105
<210> 20
<211> 117
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Фрагмент антитіла
<400> 20
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
      20      25      30
Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
      35      40      45
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
      50      55      60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
      100      105      110
Leu Thr Val Ser Ser
      115
<210> 21
<211> 106
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Фрагмент антитіла
<400> 21
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
1      5      10      15
Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu His
      20      25      30
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Val Tyr Ser
      35      40      45
Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser Gly

```

```

      50              55              60
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp
65              70              75              80
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ile Tyr Pro Pro Trp Thr
      85              90              95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100              105

```

<210> 22

<211> 117

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 22

```

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

```

<210> 23

<211> 108

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 23

```

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
1              5              10              15
Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

```

```

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

```

```

                100                105

```

<210> 24

<211> 117

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антигіла

<400> 24

```

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

```

115

<210> 25

<211> 106

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антигіла

```

<400> 25
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
1           5           10           15
Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
           20           25           30
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser
           35           40           45
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
65           70           75           80
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Pro Trp Thr
           85           90           95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100           105

```

<210> 26

<211> 117

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 26

```

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

```

<210> 27

<211> 106

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 27

```

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

```

<210> 28

<211> 106

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 28

```

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

```

```

<210> 29
<211> 106
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Фрагмент антитіла
<400> 29
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
1          5          10          15
Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
          20          25          30
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Ser Ile Tyr Ser
          35          40          45
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
          50          55          60
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
          65          70          75          80
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
          85          90          95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105

<210> 30
<211> 119
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Фрагмент антитіла
<400> 30
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
          20          25          30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe
          50          55          60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
          65          70          75          80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

```

Ala Arg Trp Gln Asp Tyr Asp Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 31
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Фрагмент антитіла
 <400> 31
 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 Asp Ile Arg 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 Tyr Thr Ser Arg Leu Glu 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 Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 32
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Фрагмент антитіла
 <400> 32
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антибіла

<400> 33

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 34

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антибіла

<400> 34

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

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

```

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

```

<210> 35

<211> 108

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 35

```

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

```

<210> 36

<211> 117

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 36

```

Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val
1           5           10           15
Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met
20           25           30
His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
35           40           45
Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp
50           55           60
Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
65           70           75           80
Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85           90           95
Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100           105           110
Leu Thr Val Ser Ser
115
<210> 37
<211> 106
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> Фрагмент антитіла
<400> 37
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20           25           30
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35           40           45
Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser
50           55           60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65           70           75           80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85           90           95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100           105
<210> 38
<211> 495
<212> PRT

```

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Біопластична молекула

<400> 38

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

Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn
 290 295 300
 Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala
 305 310 315 320
 Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
 325 330 335
 Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr
 340 345 350
 Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 355 360 365
 Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 370 375 380
 Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met
 385 390 395 400
 Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser
 405 410 415
 Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro
 420 425 430
 Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr
 435 440 445
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 450 455 460
 Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
 465 470 475 480
 Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 485 490 495

<210> 39

<211> 520

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Біспецифічна молекула

<400> 39

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

```

      50              55              60
Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65              70              75              80
Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
      85              90              95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100              105              110
Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
115              120              125
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130              135              140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro
145              150              155              160
Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys
      165              170              175
Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr
180              185              190
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
195              200              205
Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
210              215              220
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp
225              230              235              240
Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe
      245              250              255
Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
260              265              270
Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser
275              280              285
Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr
290              295              300
Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
305              310              315              320
Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
      325              330              335
Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
340              345              350
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
355              360              365
Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

```

```

      370              375              380
Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
385              390              395              400
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro
      405              410              415
Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg
      420              425              430
Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly
      435              440              445
Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly
      450              455              460
Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
      465              470              475              480
Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
      485              490              495
Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
      500              505              510
Leu Lys His His His His His
      515              520
<210> 40
<211> 490
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтезівана молекула
<400> 40
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1              5              10              15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
      20              25              30
Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35              40              45
Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
      50              55              60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
      65              70              75              80
Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100              105              110

```

```

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115                      120                      125
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
130                      135                      140
Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln
145                      150                      155                      160
Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln
165                      170                      175
Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr
180                      185                      190
Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195                      200                      205
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val
210                      215                      220
Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly
225                      230                      235                      240
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Leu Gln Gln
245                      250                      255
Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
260                      265                      270
Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys
275                      280                      285
Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser
290                      295                      300
Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu
305                      310                      315                      320
Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
325                      330                      335
Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp
340                      345                      350
His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
355                      360                      365
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370                      375                      380
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
385                      390                      395                      400
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
405                      410                      415
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
420                      425                      430

```

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser
 435 440 445
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 450 455 460
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 465 470 475 480
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 485 490
 <210> 41
 <211> 515
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Біспещефічна молекула
 <400> 41
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro
 145 150 155 160
 Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys
 165 170 175
 Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr
 180 185 190
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp

```

      195              200              205
Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
      210              215              220
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp
225              230              235              240
Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe
      245              250              255
Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys
      260              265              270
Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
      275              280              285
Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His
      290              295              300
Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile
305              310              315              320
Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys
      325              330              335
Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
      340              345              350
Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr
      355              360              365
Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
      370              375              380
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
385              390              395              400
Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala
      405              410              415
Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val
      420              425              430
Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg
      435              440              445
Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe
      450              455              460
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met
465              470              475              480
Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn
      485              490              495
Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His His
      500              505              510
His His His

```

515
 <210> 42
 <211> 487
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Біспецифічна молекула
 <400> 42
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser
 130 135 140
 Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
 145 150 155 160
 Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys
 165 170 175
 Leu Cys Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
 180 185 190
 Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 195 200 205
 Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn
 210 215 220
 Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
 245 250 255

Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr
 260 265 270
 Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln
 275 280 285
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn
 290 295 300
 Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser
 305 310 315 320
 Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
 325 330 335
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp
 340 345 350
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly
 355 360 365
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile
 370 375 380
 Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
 385 390 395 400
 Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp
 405 410 415
 Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr
 420 425 430
 Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 435 440 445
 Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala
 450 455 460
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly
 465 470 475 480
 Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 485

<210> 43

<211> 513

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Біспецифічна молекула

<400> 43

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

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

```

          340          345          350
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr
          355          360          365
Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val
          370          375          380
Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val
          385          390          395          400
Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro
          405          410          415
Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
          420          425          430
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile
          435          440          445
Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
          450          455          460
Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala
          465          470          475          480
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu
          485          490          495
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His His His His
          500          505          510
His

```

<210> 44

<211> 488

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Біопецепційна молекула

<400> 44

```

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

```

```

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
      100                      105                      110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
      115                      120                      125
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser
      130                      135                      140
Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
      145                      150                      155                      160
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
      165                      170                      175
Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
      180                      185                      190
Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
      195                      200                      205
Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
      210                      215                      220
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
      225                      230                      235                      240
Glu Leu Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser
      245                      250                      255
Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys
      260                      265                      270
Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln
      275                      280                      285
Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn
      290                      295                      300
Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
      305                      310                      315                      320
Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr
      325                      330                      335
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val
      340                      345                      350
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
      355                      360                      365
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
      370                      375                      380
Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu Lys Val
      385                      390                      395                      400

```

Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe
 405 410 415
 Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr Ser Thr Ser
 420 425 430
 Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly
 435 440 445
 Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala
 450 455 460
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly
 465 470 475 480
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 485

<210> 45

<211> 515

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> Біспецифічна молекула

<400> 45

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

	165		170		175
Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln					
	180		185		190
Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys					
	195		200		205
Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr					
	210		215		220
Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr					
	225		230		235
Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly					
	245		250		255
Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu					
	260		265		270
Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile					
	275		280		285
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp					
	290		295		300
Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn					
	305		310		315
Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala					
	325		330		335
Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu					
	340		345		350
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr					
	355		360		365
Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser					
	370		375		380
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser					
	385		390		395
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly					
	405		410		415
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met					
	420		425		430
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr					
	435		440		445
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg					
	450		455		460
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu					
	465		470		475
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp					

485 490 495
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His His
 500 505 510
 His

<210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> лінкер
 <400> 46

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 47
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> лінкер
 <400> 47

Val Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp
 1 5 10 15

<210> 48
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> лінкер
 <400> 48

Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 49
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> лінкер
 <400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser

```

1           5
<210> 50
<211> 18
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Ліinker
<400> 50
Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1           5           10           15
Val Asp

<210> 51
<211> 19
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Сигнал секреції
<400> 51
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1           5           10           15
Val His Ser

<210> 52
<211> 19
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Сигнал секреції
<400> 52
Met Asn Ser Gly Leu Gln Leu Val Phe Phe Val Leu Thr Leu Lys Gly
1           5           10           15
Ile Gln Gly

<210> 53
<211> 19
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Сигнал секреції

```

<400> 53
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys

<210> 54
<211> 19
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Сигнал секреції
<400> 54

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser

<210> 55
<211> 19
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Сигнал секреції
<400> 55

Met Gly Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15
Ala Gln Ala

<210> 56
<211> 31
<212> DNA
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Олігонуклеотид
<400> 56

tggctctgtg tcgacactgt g
21

<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> Штучна послідовність

```

<220>
<223> Олігонуклеотид
<400> 57
gtgtacatgt tagctgtgga c
21
<210> 58
<211> 71
<212> DNA
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Олігонуклеотид
<400> 58
tgacactggc aaaacaatgc a
21
<210> 59
<211> 71
<212> DNA
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Олігонуклеотид
<400> 59
ggtccttttc accagcaagc t
21
<210> 60
<211> 507
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> Штучне антигіло
<400> 60
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30
Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45
Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn
65 70 75 80

```

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser
 145 150 155 160
 Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala
 165 170 175
 Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr
 180 185 190
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
 195 200 205
 Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
 210 215 220
 Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 225 230 235 240
 Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 245 250 255
 Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
 260 265 270
 Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr
 275 280 285
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg
 290 295 300
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly
 305 310 315 320
 Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr
 325 330 335
 Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser
 340 345 350
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr
 355 360 365
 Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly
 370 375 380
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 385 390 395 400

```

Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro
      405              410              415
Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
      420              425              430
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile
      435              440              445
Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
      450              455              460
Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala
465              470              475              480
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu
      485              490              495
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
      500              505

```

<210> 61

<211> 507

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучне антитіло

<400> 61

```

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

```

```

145          150          155          160
Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala
          165          170          175
Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr
          180          185          190
Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
          195          200          205
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
          210          215          220
Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
          225          230          235          240
Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
          245          250          255
Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
          260          265          270
Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr
          275          280          285
Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg
          290          295          300
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly
          305          310          315          320
Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr
          325          330          335
Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser
          340          345          350
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr
          355          360          365
Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly
          370          375          380
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly
          385          390          395          400
Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro
          405          410          415
Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
          420          425          430
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile
          435          440          445
Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
          450          455          460
Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala

```

```

465              470              475              480
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu
              485              490              495
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
              500              505

<210> 62
<211> 507
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> Штучне антитіло
<400> 62
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1              5              10              15
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
              20              25              30
Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
              35              40              45
Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu
50              55              60
Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn
65              70              75              80
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
              85              90              95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
              100              105              110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
              115              120              125
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
              130              135              140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser
145              150              155              160
Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala
              165              170              175
Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr
              180              185              190
Ser Pro Lys Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
              195              200              205
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
210              215              220

```

```

Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
225          230          235          240
Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
          245          250          255
Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
          260          265          270
Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr
          275          280          285
Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg
          290          295          300
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly
          305          310          315          320
Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr
          325          330          335
Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser
          340          345          350
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr
          355          360          365
Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly
          370          375          380
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly
          385          390          395          400
Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro
          405          410          415
Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
          420          425          430
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile
          435          440          445
Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
          450          455          460
Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala
          465          470          475          480
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu
          485          490          495
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
          500          505
<210> 63
<211> 507
<212> PRT
<213> WTYYHA

```

<220>

<223> ШТУЧНЕ АНТИГЕНО

<400> 63

```

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

```

```

      290              295              300
Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn
305              310              315              320
Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala
      325              330              335
Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu
      340              345              350
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr
      355              360              365
Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
      370              375              380
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
      385              390              395              400
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly
      405              410              415
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
      420              425              430
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
      435              440              445
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg
      450              455              460
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu
      465              470              475              480
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp
      485              490              495
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      500              505

```

<210> 64

<211> 507

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучне антитіло

<400> 64

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1              5              10              15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
      20              25              30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
      35              40              45

```

```

Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50                      55                      60
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn
 65                      70                      75                      80
Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser
      85                      90                      95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
      100                      105                      110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp
      115                      120                      125
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
      130                      135                      140
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu
      145                      150                      155                      160
Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr
      165                      170                      175
Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln
      180                      185                      190
Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys
      195                      200                      205
Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
      210                      215                      220
Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
      225                      230                      235                      240
Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly
      245                      250                      255
Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
      260                      265                      270
Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile
      275                      280                      285
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp
      290                      295                      300
Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn
      305                      310                      315                      320
Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala
      325                      330                      335
Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu
      340                      345                      350
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr
      355                      360                      365

```

Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 370 375 380
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 385 390 395 400
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly
 405 410 415
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 420 425 430
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 435 440 445
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg
 450 455 460
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu
 465 470 475 480
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp
 485 490 495
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 500 505
 <210> 65
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 <223> ШТУЧНЕ АНТИГЕНО
 <400> 65
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp

```

      115              120              125
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
      130              135              140
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu
      145              150              155              160
Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr
      165              170              175
Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln
      180              185              190
Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys
      195              200              205
Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
      210              215              220
Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
      225              230              235              240
Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly
      245              250              255
Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
      260              265              270
Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile
      275              280              285
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp
      290              295              300
Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn
      305              310              315              320
Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala
      325              330              335
Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu
      340              345              350
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr
      355              360              365
Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
      370              375              380
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
      385              390              395              400
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly
      405              410              415
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
      420              425              430
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Ser Ile Tyr

```

```

      435              440              445
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg
      450              455              460
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu
465              470              475              480
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp
      485              490              495
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      500              505

<210> 66
<211> 530
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> Штучне анти тіло
<400> 66
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1              5              10              15
Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
      20              25              30
Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
      35              40              45
Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
      50              55              60
Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
65              70              75              80
Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
      85              90              95
Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
      100             105             110
Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
      115             120             125
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
      130             135             140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
      145             150             155             160
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
      165             170             175
Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
      180             185             190

```

```

Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
195                200                205
Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
210                215                220
Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
225                230                235                240
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
245                250                255
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly
260                265                270
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala
275                280                285
Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr
290                295                300
Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly
305                310                315                320
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
325                330                335
Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser
340                345                350
Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
355                360                365
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr
370                375                380
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser
385                390                395                400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
405                410                415
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
420                425                430
Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
435                440                445
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
450                455                460
Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465                470                475                480
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
485                490                495
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
500                505                510

```

Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His
 515 520 525
 His His
 530
 <210> 67
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> ШТУЧНА
 <220>
 <223> ШТУЧНЕ АНТИГЕНО
 <400> 67
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu
 50 55 60
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
 145 150 155 160
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
 165 170 175
 Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
 180 185 190
 Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
 195 200 205
 Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
 210 215 220
 Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

```

225                230                235                240
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
                245                250                255
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly
                260                265                270
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala
                275                280                285
Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr
                290                295                300
Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly
305                310                315                320
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
                325                330                335
Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser
                340                345                350
Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
                355                360                365
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr
                370                375                380
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
385                390                395                400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
                405                410                415
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
                420                425                430
Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
                435                440                445
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
                450                455                460
Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465                470                475                480
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
                485                490                495
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
                500                505                510
Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His
                515                520                525
His His
                530
<210> 68

```

```

<211> 530
<212> PRT
<213> ШТУЧНА
<220>
<223> ШТУЧНО АНТИТІЛО
<400> 68
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
20          25          30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35          40          45
Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50          55          60
Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65          70          75          80
Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85          90          95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100         105         110
Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
115         120         125
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130         135         140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
145         150         155         160
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
165         170         175
Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
180         185         190
Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
195         200         205
Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
210         215         220
Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
225         230         235         240
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
245         250         255
Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly
260         265         270

```

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala
 275 280 285
 Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr
 290 295 300
 Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly
 305 310 315 320
 Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
 325 330 335
 Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser
 340 345 350
 Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 355 360 365
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr
 370 375 380
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 385 390 395 400
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 405 410 415
 Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
 420 425 430
 Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
 435 440 445
 Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
 450 455 460
 Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 465 470 475 480
 Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
 485 490 495
 Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
 500 505 510
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His
 515 520 525
 His His
 530
 <210> 69
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Штучне антитіло

<400> 69

```

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

```

```

305              310              315              320
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
              325              330              335
Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser
              340              345              350
Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
              355              360              365
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr
              370              375              380
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
              385              390              395              400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
              405              410              415
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
              420              425              430
Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
              435              440              445
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
              450              455              460
Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly
              465              470              475              480
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
              485              490              495
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
              500              505              510
Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His
              515              520              525
His His
              530
<210> 70
<211> 130
<212> PRT
<213> ШТУЧНА
<220>
<223> ШТУЧНЕ АНТИГІНО
<400> 70
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15
Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
          20          25          30

```

```

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
   35                               40                               45
Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
   50                               55                               60
Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
   65                               70                               75                               80
Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
   85                               90                               95
Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
  100                               105                               110
Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
  115                               120                               125
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
  130                               135                               140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
  145                               150                               155                               160
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
  165                               170                               175
Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
  180                               185                               190
Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
  195                               200                               205
Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
  210                               215                               220
Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
  225                               230                               235                               240
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
  245                               250                               255
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly
  260                               265                               270
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala
  275                               280                               285
Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr
  290                               295                               300
Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys
  305                               310                               315                               320
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
  325                               330                               335
Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser
  340                               345                               350

```

```

Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
355                      360                      365
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr
370                      375                      380
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
385                      390                      395                      400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
405                      410                      415
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
420                      425                      430
Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
435                      440                      445
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
450                      455                      460
Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465                      470                      475                      480
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
485                      490                      495
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
500                      505                      510
Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His
515                      520                      525
His His
530
<210> 71
<211> 530
<212> PRT
<213> ШТУЧНА
<220>
<223> ШТУЧНЕ ЗНАТКИНО
<400> 71
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1                      5                      10                      15
Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20                      25                      30
Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35                      40                      45
Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu
50                      55                      60
Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala

```

```

65              70              75              80
Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
      85              90              95
Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
      100             105             110
Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
      115             120             125
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
      130             135             140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
      145             150             155             160
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
      165             170             175
Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
      180             185             190
Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
      195             200             205
Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
      210             215             220
Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
      225             230             235             240
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
      245             250             255
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly
      260             265             270
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala
      275             280             285
Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr
      290             295             300
Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys
      305             310             315             320
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
      325             330             335
Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser
      340             345             350
Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
      355             360             365
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr
      370             375             380
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

```

```

385          390          395          400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
          405          410          415
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
          420          425          430
Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
          435          440          445
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
          450          455          460
Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465          470          475          480
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
          485          490          495
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
          500          505          510
Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His
          515          520          525
His His
          530
<210> 72
<211> 530
<212> PRT
<213> ШТУЧНА
<220>
<223> ШТУЧНЕ АНТИГІНО
<400> 72
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
          20          25          30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          35          40          45
Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
          50          55          60
Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65          70          75          80
Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
          85          90          95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
          100          105          110

```

```

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
  115              120              125
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
  130              135              140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
  145              150              155              160
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
              165              170              175
Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
              180              185              190
Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
              195              200              205
Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
              210              215              220
Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
              225              230              235              240
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
              245              250              255
Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly
              260              265              270
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala
              275              280              285
Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr
              290              295              300
Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys
              305              310              315              320
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
              325              330              335
Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser
              340              345              350
Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
              355              360              365
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr
              370              375              380
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
              385              390              395              400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
              405              410              415
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
              420              425              430

```

Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
 435 440 445
 Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
 450 455 460
 Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 465 470 475 480
 Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
 485 490 495
 Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
 500 505 510
 Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His
 515 520 525
 His His
 530
 <210> 73
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Штучне антибіло
 <400> 73
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val

```

145              150              155              160
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
              165              170              175
Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
              180              185              190
Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
              195              200              205
Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
              210              215              220
Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
225              230              235              240
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
              245              250              255
Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly
              260              265              270
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala
              275              280              285
Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr
290              295              300
Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys
305              310              315              320
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
              325              330              335
Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser
              340              345              350
Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
              355              360              365
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr
              370              375              380
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
385              390              395              400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
              405              410              415
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
              420              425              430
Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
              435              440              445
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
450              455              460
Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly

```

```

465              470              475              480
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
              485              490              495
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
              500              505              510
Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Ser His His His His
              515              520              525
His His
              530
<210> 74
<211> 535
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> Штучно антибіод
<400> 74
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1              5              10              15
Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
              20              25              30
Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
              35              40              45
Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
              50              55              60
Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
65              70              75              80
Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
              85              90              95
Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
              100              105              110
Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
              115              120              125
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
              130              135              140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
145              150              155              160
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
              165              170              175
Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
              180              185              190

```

```

Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
195                      200                      205
Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
210                      215                      220
Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
225                      230                      235                      240
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
245                      250                      255
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly
260                      265                      270
Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
275                      280                      285
Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
290                      295                      300
Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
305                      310                      315                      320
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
325                      330                      335
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
340                      345                      350
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
355                      360                      365
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
370                      375                      380
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
385                      390                      395                      400
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
405                      410                      415
Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser
420                      425                      430
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
435                      440                      445
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
450                      455                      460
Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
465                      470                      475                      480
Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
485                      490                      495
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
500                      505                      510

```

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
 515 520 525
 Ser His His His His His
 530 535
 <210> 75
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Штучне антибіло
 <400> 75
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu
 50 55 60
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
 145 150 155 160
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
 165 170 175
 Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
 180 185 190
 Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
 195 200 205
 Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
 210 215 220
 Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

```

225                230                235                240
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
                245                250                255
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly
                260                265                270
Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
                275                280                285
Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
                290                295                300
Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
305                310                315                320
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
                325                330                335
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
                340                345                350
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
                355                360                365
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
370                375                380
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
385                390                395                400
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
                405                410                415
Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser
                420                425                430
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
                435                440                445
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
450                455                460
Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
465                470                475                480
Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
                485                490                495
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
500                505                510
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
515                520                525
Ser His His His His His His
530                535
<210> 76

```

<211> 539

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучна антибиотик

<400> 76

```

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

```

Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
 275 280 285
 Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
 290 295 300
 Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
 305 310 315 320
 Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
 325 330 335
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
 340 345 350
 Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
 355 360 365
 Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
 370 375 380
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
 405 410 415
 Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser
 420 425 430
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
 435 440 445
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 450 455 460
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
 465 470 475 480
 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
 485 490 495
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
 500 505 510
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
 515 520 525
 Ser His His His His His His
 530 535
 <210> 77
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> штучна
 <220>
 <223> штучна антитіло

<400> 77

```

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

```

```

305          310          315          320
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
          325          330          335
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
          340          345          350
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
          355          360          365
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
          370          375          380
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
385          390          395          400
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
          405          410          415
Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser
          420          425          430
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
          435          440          445
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
          450          455          460
Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
465          470          475          480
Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
          485          490          495
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
          500          505          510
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
          515          520          525
Ser His His His His His His
          530          535
<210> 78
<211> 535
<212> PRT
<213> ШТУЧНА
<220>
<221> ШТУЧНЕ АНТИПЕПТИД
<400> 78
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15
Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
          20          25          30

```

```

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
    35              40              45
Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50              55              60
Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
    65              70              75              80
Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
    85              90              95
Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
    100             105             110
Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
    115             120             125
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130             135             140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
    145             150             155             160
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
    165             170             175
Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
    180             185             190
Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
    195             200             205
Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
    210             215             220
Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
    225             230             235             240
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
    245             250             255
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly
    260             265             270
Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
    275             280             285
Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
    290             295             300
Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
    305             310             315             320
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
    325             330             335
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
    340             345             350

```

```

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
    355                360                365
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
    370                375                380
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    385                390                395                400
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
    405                410                415
Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser
    420                425                430
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
    435                440                445
Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
    450                455                460
Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
    465                470                475                480
Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
    485                490                495
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
    500                505                510
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
    515                520                525
Ser His His His His His His
    530                535
<210> 79
<211> 535
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> Штучне антибіло
<400> 79
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1                5                10                15
Val His Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20                25                30
Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35                40                45
Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu
50                55                60
Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala

```

```

65              70              75              80
Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
      85              90              95
Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
    100              105              110
Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
    115              120              125
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130              135              140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
    145              150              155              160
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
    165              170              175
Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
    180              185              190
Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
    195              200              205
Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
    210              215              220
Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
    225              230              235              240
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
    245              250              255
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly
    260              265              270
Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
    275              280              285
Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
    290              295              300
Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
    305              310              315              320
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
    325              330              335
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
    340              345              350
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
    355              360              365
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
    370              375              380
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

```

```

385          390          395          400
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
          405          410          415
Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser
          420          425          430
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
          435          440          445
Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
          450          455          460
Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
465          470          475          480
Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
          485          490          495
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
          500          505          510
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
          515          520          525
Ser His His His His His His
          530          535
<210> 80
<211> 535
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> Штучне антитіло
<400> 80
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
          20          25          30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          35          40          45
Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
          50          55          60
Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65          70          75          80
Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
          85          90          95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
          100          105          110

```

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
 145 150 155 160
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
 165 170 175
 Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
 180 185 190
 Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
 195 200 205
 Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
 210 215 220
 Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 225 230 235 240
 Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
 245 250 255
 Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
 275 280 285
 Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
 290 295 300
 Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
 305 310 315 320
 Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
 325 330 335
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
 340 345 350
 Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
 355 360 365
 Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
 370 375 380
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
 405 410 415
 Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser
 420 425 430

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
 435 440 445
 Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 450 455 460
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
 465 470 475 480
 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
 485 490 495
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
 500 505 510
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
 515 520 525
 Ser His His His His His His
 530 535
 <210> 81
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> ШТУЧКА
 <220>
 <223> ШТУЧКА АНТИТИПО
 <400> 81
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val

```

145              150              155              160
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly Glu Lys Val
              165              170              175
Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln
              180              185              190
Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
              195              200              205
Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
              210              215              220
Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
225              230              235              240
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser
              245              250              255
Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly
              260              265              270
Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
              275              280              285
Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
              290              295              300
Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
305              310              315              320
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
              325              330              335
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
              340              345              350
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
              355              360              365
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
              370              375              380
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
385              390              395              400
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
              405              410              415
Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser
              420              425              430
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
              435              440              445
Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
              450              455              460
Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp

```

```

465          470          475          480
Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
          485          490          495
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
          500          505          510
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
          515          520          525
Ser His His His His His His
          530          535
<210> 82
<211> 535
<212> PRT
<213> ШТУЧНА
<220>
<221> ШТУЧНЕ АНТИПЕПТИД
<400> 82
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
          20          25          30
Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
          35          40          45
Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
          50          55          60
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
65          70          75          80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
          85          90          95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
          100          105          110
Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
          115          120          125
Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
          130          135          140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln
145          150          155          160
Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys
          165          170          175
Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
          180          185          190

```

```

Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile
    195                200                205
Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg
    210                215                220
Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile
    225                230                235                240
Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Leu
    245                250                255
Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
    260                265                270
Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
    275                280                285
Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
    290                295                300
Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln
    305                310                315                320
Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg
    325                330                335
Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
    340                345                350
Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
    355                360                365
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His
    370                375                380
Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
    385                390                395                400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    405                410                415
Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
    420                425                430
Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
    435                440                445
Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
    450                455                460
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
    465                470                475                480
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
    485                490                495
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
    500                505                510

```

```

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
 515                      520                      525
Ser His His His His His
 530                      535
<210> 83
<211> 535
<212> PRT
<213> ШТУЧКА
<220>
<223> ШТУЧКА АНТИТИО
<400> 83
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1                      5                      10                      15
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
 20                      25                      30
Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
 35                      40                      45
Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
 50                      55                      60
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
 65                      70                      75                      80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85                      90                      95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
100                      105                      110
Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
115                      120                      125
Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130                      135                      140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln
145                      150                      155                      160
Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys
165                      170                      175
Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
180                      185                      190
Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile
195                      200                      205
Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg
210                      215                      220
Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile

```

```

235          230          235          240
Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Leu
          245          250          255
Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
          260          265          270
Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
          275          280          285
Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
          290          295          300
Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln
305          310          315          320
Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg
          325          330          335
Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
          340          345          350
Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
          355          360          365
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His
          370          375          380
Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
385          390          395          400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
          405          410          415
Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
          420          425          430
Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
          435          440          445
Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
          450          455          460
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
465          470          475          480
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
          485          490          495
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
          500          505          510
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
          515          520          525
Ser His His His His His His
          530          535
<210> 84

```

<211> 535
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Штучне антитіло
 <400> 34
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
 20 25 30
 Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
 145 150 155 160
 Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
 165 170 175
 Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn
 180 185 190
 Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile
 195 200 205
 Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys
 210 215 220
 Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
 225 230 235 240
 Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser
 245 250 255
 Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 260 265 270

```

Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
  275                      280                      285
Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
  290                      295                      300
Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln
  305                      310                      315                      320
Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg
  325                      330                      335
Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
  340                      345                      350
Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
  355                      360                      365
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His
  370                      375                      380
Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
  385                      390                      395                      400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
  405                      410                      415
Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
  420                      425                      430
Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
  435                      440                      445
Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
  450                      455                      460
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
  465                      470                      475                      480
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
  485                      490                      495
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
  500                      505                      510
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
  515                      520                      525
Ser His His His His His His
  530                      535
<210> 85
<211> 535
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> штучне антитіло

```

<400> 85

```

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

```

```

305              310              315              320
Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg
              325              330              335
Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
              340              345              350
Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
              355              360              365
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His
              370              375              380
Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
385              390              395              400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
              405              410              415
Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
              420              425              430
Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
              435              440              445
Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
              450              455              460
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
465              470              475              480
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
              485              490              495
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
              500              505              510
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
              515              520              525
Ser His His His His His His
              530              535
<210> 86
<211> 535
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> Штучне антибіло
<400> 86
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1              5              10              15
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
              20              25              30

```

```

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
   35                               40                               45
Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
   50                               55                               60
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
   65                               70                               75                               80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
   85                               90                               95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
  100                               105                               110
Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
  115                               120                               125
Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
  130                               135                               140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln
  145                               150                               155                               160
Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys
  165                               170                               175
Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
  180                               185                               190
Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile
  195                               200                               205
Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg
  210                               215                               220
Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile
  225                               230                               235                               240
Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Leu
  245                               250                               255
Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
  260                               265                               270
Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
  275                               280                               285
Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
  290                               295                               300
Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln
  305                               310                               315                               320
Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg
  325                               330                               335
Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
  340                               345                               350

```

Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
 355 360 365
 Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His
 370 375 380
 Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 385 390 395 400
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 405 410 415
 Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
 420 425 430
 Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
 435 440 445
 Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
 450 455 460
 Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
 465 470 475 480
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
 485 490 495
 Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
 500 505 510
 Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
 515 520 525
 Ser His His His His His His
 530 535
 <210> 87
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Штучне антибіло
 <400> 87
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
 20 25 30
 Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu

```

65          70          75          80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
          85          90          95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
          100          105          110
Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
          115          120          125
Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
          130          135          140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln
          145          150          155          160
Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys
          165          170          175
Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
          180          185          190
Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile
          195          200          205
Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg
          210          215          220
Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile
          225          230          235          240
Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Leu
          245          250          255
Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
          260          265          270
Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
          275          280          285
Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
          290          295          300
Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln
          305          310          315          320
Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg
          325          330          335
Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
          340          345          350
Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
          355          360          365
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His
          370          375          380
Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

```

```

385          390          395          400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
          405          410          415
Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
          420          425          430
Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
          435          440          445
Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
          450          455          460
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
465          470          475          480
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
          485          490          495
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
          500          505          510
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
          515          520          525
Ser His His His His His His
          530          535
<210> SS
<211> 535
<212> PPT
<213> Штучна
<220>
<225> Штучне антитіло
<400> SS
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
          20          25          30
Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
          35          40          45
Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
          50          55          60
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
65          70          75          80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
          85          90          95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
          100          105          110

```

```

Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
   115               120               125
Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
   130               135               140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
   145               150               155               160
Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
               165               170               175
Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn
   180               185               190
Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile
   195               200               205
Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys
   210               215               220
Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
   225               230               235               240
Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser
               245               250               255
Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
   260               265               270
Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
   275               280               285
Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
   290               295               300
Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln
   305               310               315               320
Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg
               325               330               335
Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
   340               345               350
Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
   355               360               365
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His
   370               375               380
Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
   385               390               395               400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
               405               410               415
Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
               420               425               430

```

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
 435 440 445
 Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
 450 455 460
 Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
 465 470 475 480
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
 485 490 495
 Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
 500 505 510
 Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
 515 520 525
 Ser His His His His His His
 530 535
 <210> 89
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> ШТУЧКА
 <220>
 <223> ШТУЧКА АНТИТИНО
 <400> 89
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
 20 25 30
 Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln

```

145              150              155              160
Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
              165              170              175
Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn
              180              185              190
Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile
              195              200              205
Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys
              210              215              220
Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
225              230              235              240
Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser
              245              250              255
Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
              260              265              270
Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
              275              280              285
Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
              290              295              300
Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln
305              310              315              320
Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg
              325              330              335
Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
              340              345              350
Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
              355              360              365
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His
              370              375              380
Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
385              390              395              400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
              405              410              415
Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
              420              425              430
Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
              435              440              445
Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
450              455              460
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg

```

```

465              470              475              480
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
              485              490              495
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
              500              505              510
Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly
              515              520              525
Ser His His His His His His
              530              535
<210>  90
<211>  540
<212>  PRT
<213>  Штучна
<220>
<223>  Штучне антитіло
<400>  90
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1              5              10              15
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
              20              25              30
Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
              35              40              45
Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
              50              55              60
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
65              70              75              80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
              85              90              95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
              100              105              110
Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
              115              120              125
Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
              130              135              140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln
145              150              155              160
Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys
              165              170              175
Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
              180              185              190

```

```

Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile
    195                200                205
Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg
    210                215                220
Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile
    225                230                235                240
Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Leu
    245                250                255
Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
    260                265                270
Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser
    275                280                285
Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
    290                295                300
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
    305                310                315                320
Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
    325                330                335
Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
    340                345                350
Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
    355                360                365
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
    370                375                380
Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    385                390                395                400
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
    405                410                415
Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met
    420                425                430
Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp
    435                440                445
Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn
    450                455                460
Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala
    465                470                475                480
Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
    485                490                495
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr
    500                505                510

```

```

Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
  515                      520                      525
Val Ser Ser Gly Gly Ser His His His His His His
  530                      535                      540

<210>  91
<211>  540
<212>  PRT
<213>  Штучна
<220>
<223>  Штучне антигено
<400>  91
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
  1                      5                      10                      15
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
  20                      25                      30
Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
  35                      40                      45
Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
  50                      55                      60
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
  65                      70                      75                      80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
  85                      90                      95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
  100                     105                     110
Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
  115                     120                     125
Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
  130                     135                     140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln
  145                     150                     155                     160
Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys
  165                     170                     175
Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
  180                     185                     190
Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile
  195                     200                     205
Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg
  210                     215                     220
Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile

```

```

225          230          235          240
Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Leu
          245          250          255
Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
          260          265          270
Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser
          275          280          285
Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
          290          295          300
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
305          310          315          320
Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
          325          330          335
Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
          340          345          350
Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
          355          360          365
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
          370          375          380
Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
385          390          395          400
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
          405          410          415
Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met
          420          425          430
Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp
          435          440          445
Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn
          450          455          460
Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala
465          470          475          480
Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
          485          490          495
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr
          500          505          510
Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
          515          520          525
Val Ser Ser Gly Gly Ser His His His His His His
          530          535          540
<210> 92

```

```

<211> 540
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> Штучне антибіло
<400> 92
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
20          25          30
Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35          40          45
Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
50          55          60
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
65          70          75          80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85          90          95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
100         105         110
Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115         120         125
Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130         135         140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
145         150         155         160
Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
165         170         175
Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn
180         185         190
Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile
195         200         205
Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys
210         215         220
Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
225         230         235         240
Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser
245         250         255
Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
260         265         270

```

Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser
 275 280 285
 Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
 290 295 300
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
 325 330 335
 Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 340 345 350
 Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 355 360 365
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
 370 375 380
 Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
 405 410 415
 Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met
 420 425 430
 Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp
 435 440 445
 Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn
 450 455 460
 Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala
 465 470 475 480
 Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
 485 490 495
 Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr
 500 505 510
 Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 515 520 525
 Val Ser Ser Gly Gly Ser His His His His His
 530 535 540
 <210> 93
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Штучне анти тіло

<400> 93

```

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

```

```

305          310          315          320
Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
          325          330          335
Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
          340          345          350
Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
          355          360          365
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
          370          375          380
Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
          385          390          395          400
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
          405          410          415
Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met
          420          425          430
Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp
          435          440          445
Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn
          450          455          460
Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala
          465          470          475          480
Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
          485          490          495
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr
          500          505          510
Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
          515          520          525
Val Ser Ser Gly Gly Ser His His His His His His
          530          535          540

```

<210> 94

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 94

```

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
          20          25          30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45

```

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115
<210> 95
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 95
Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
1 5 10 15
Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His
20 25 30
Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile
35 40 45
Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys
50 55 60
Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
65 70 75 80
Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr
85 90 95
Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115
<210> 96
<211> 103
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 96
Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
1 5 10 15
Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
20 25 30

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

<210> 97

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 97

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

<210> 98

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 98

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 20 25 30
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser
 35 40 45

```

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
  50                      55                      60
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
  65                      70                      75                      80
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
                      85                      90                      95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                      100                      105

```

<210> 99

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 99

```

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

```

<210> 100

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 100

```

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
  1                      5                      10                      15
Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
                      20                      25                      30
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Ser Ile Tyr Ser
                      35                      40                      45
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
  50                      55                      60

```

```

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
65              70              75              80
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
              85              90              95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
              100              105

<210> 101
<211> 513
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<221> Експецифічна молекула 107
<400> 101
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1      5              10              15
Val His Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
              20              25              30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
              35              40              45
Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
              50              55              60
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn
65              70              75              80
Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser
              85              90              95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
              100              105              110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp
              115              120              125
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly
              130              135              140
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu
145              150              155              160
Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr
              165              170              175
Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln
              180              185              190
Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys
              195              200              205
Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

```

```

      210              215              220
Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
325              230              235              240
Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly
      245              250              255
Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
      260              265              270
Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile
      275              280              285
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp
      290              295              300
Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn
305              310              315              320
Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala
      325              330              335
Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu
      340              345              350
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr
      355              360              365
Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
      370              375              380
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
385              390              395              400
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly
      405              410              415
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
      420              425              430
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr
      435              440              445
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg
      450              455              460
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu
465              470              475              480
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp
      485              490              495
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His His
      500              505              510
His

```

<210> 102

<211> 515
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Біспецифічна молекула 123
 <400> 102
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu
 145 150 155 160
 Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr
 165 170 175
 Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln
 180 185 190
 Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys
 195 200 205
 Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 210 215 220
 Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly
 245 250 255
 Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 260 265 270

Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile
 275 280 285
 Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp
 290 295 300
 Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn
 305 310 315 320
 Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala
 325 330 335
 Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu
 340 345 350
 Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr
 355 360 365
 Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 370 375 380
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 385 390 395 400
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly
 405 410 415
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 420 425 430
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 435 440 445
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg
 450 455 460
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu
 465 470 475 480
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp
 485 490 495
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His
 500 505 510
 His

<210> 103

<211> 520

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Біологічна молекула 124

<400> 103

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

```

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

```

```

          325                      330                      335
Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
          340                      345                      350
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          355                      360                      365
Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          370                      375                      380
Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
          385                      390                      395                      400
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro
          405                      410                      415
Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg
          420                      425                      430
Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly
          435                      440                      445
Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly
          450                      455                      460
Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
          465                      470                      475                      480
Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
          485                      490                      495
Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
          500                      505                      510
Leu Lys His His His His His His
          515                      520
<210> 104
<211> 20
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Лінкер
<400> 104
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1          5          10          15
Gly Gly Gly Ser
          20
<210> 105
<211> 25
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Лінкер
<400> 105
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1           5           10           15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
           20           25

<210> 106
<211> 18
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Лінкер
<400> 106
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1           5           10           15
Gly Ser

<210> 107
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> His Tag
<400> 107
His His His His His His
1           5

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> His Tag
<400> 108
Gly Gly Ser His His His His His His
1           5

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. З'єднувальний агент, який містить щонайменше два з'єднувальні домени, де перший з'єднувальний домен зв'язується із клаудином (CLDN), а другий з'єднувальний домен зв'язується з CD3, де зв'язуючий агент містить варіабельний домен важкого ланцюга імуноглобуліну (VH) зі специфічністю відносно антигену клаудину (VH(CLDN)), варіабельний домен легкого ланцюга імуноглобуліну (VL) зі специфічністю відносно антигену клаудину (VL(CLDN)), варіабельний домен важкого ланцюга імуноглобуліну (VH) зі специфічністю відносно CD3 (VH(CD3)) і варіабельний домен легкого ланцюга імуноглобуліну (VL) зі специфічністю відносно CD3 (VL(CD3)), де вказані:
 - 10 (i) CLDN є CLDN6, і зазначений VH(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 22, або її варіант, або фрагмент, що містять визначальні комплементарності області CDR1, CDR2 і CDR3 з вказаного VH, і VL(CLDN) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 23, або її варіант, або фрагмент, що містять визначальні комплементарності області CDR1, CDR2 і CDR3 з вказаного VL; і
 - 15 (ii) VH(CD3) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 36, або її варіант, або фрагмент, що містять визначальні комплементарності області CDR1, CDR2 і CDR3 з вказаного VH; і VL(CD3) містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 37, або
 - 20

її варіант, або фрагмент, що містять визначальні комплементарності області CDR1, CDR2 і CDR3 з вказаного VL.

2. З'єднувальний агент за п. 1, який **відрізняється** тим, що зв'язуючий домен є біспецифічною молекулою.

5 3. З'єднувальний агент за п. 2, який **відрізняється** тим, що біспецифічна молекула є біспецифічним антитілом.

4. З'єднувальний агент за п. 3, який **відрізняється** тим, що біспецифічне антитіло є біспецифічним одноланцюговим антитілом.

10 5. З'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що зазначений клаудин експресується в раковій клітині.

6. З'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що зазначений клаудин експресується на поверхні ракової клітини.

7. З'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що перший з'єднувальний домен зв'язується з позаклітинним доменом зазначеного клаудину.

15 8. З'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що зазначений другий з'єднувальний домен зв'язується з епсилон-ланцюгом CD3.

9. З'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що зазначений CD3 експресується на поверхні Т-клітин.

20 10. З'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що зв'язування зазначеного з'єднувального агента з CD3 на Т-клітинах приводить до проліферації й/або активації зазначених Т-клітин, при цьому зазначені активовані Т-клітини переважно вивільняють цитотоксичні фактори, наприклад перфорини й гранзими, і ініціюють цитолізис і апоптоз ракових клітин.

25 11. З'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-10, який **відрізняється** тим, що зазначене зв'язування із клаудином і/або зазначене зв'язування з CD3 є специфічним зв'язуванням.

12. З'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-11, який **відрізняється** тим, що зв'язуючий агент знаходиться у форматі повнорозмірного антитіла або фрагмента антитіла.

30 13. З'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-12, який **відрізняється** тим, що зв'язуючий агент містить набір варіабельних доменів антитіла, переважно чотири варіабельні домени щонайменше із двома з'єднувальними доменами, при цьому щонайменше один з'єднувальний домен зв'язується із клаудином і щонайменше один з'єднувальний домен зв'язується з CD3.

35 14. З'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що зв'язуючий агент знаходиться у форматі діатіла, яке містить варіабельний домен важкого ланцюга, з'єднаний з варіабельним доменом легкого ланцюга на одному й тому ж поліпептидному ланцюзі таким чином, що два домени не утворюють пари.

15. З'єднувальний агент за п. 14, який **відрізняється** тим, що діатіло містить два поліпептидних ланцюги, при цьому один поліпептид містить VH(CLDN) і VL(CD3), і інший поліпептидний ланцюг містить VH(CD3) і VL(CLDN).

40 16. З'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що зв'язуючий агент знаходиться у форматі біспецифічного одноланцюгового антитіла, яке складається із двох молекул scFv, з'єднаних за допомогою лінкерного пептиду.

45 17. З'єднувальний агент за п. 16, який **відрізняється** тим, що варіабельні області важкого ланцюга (VH) і відповідні варіабельні області легкого ланцюга (VL) розташовані в напрямку від N-кінця до C-кінця в порядку VH(CLDN)-VL(CLDN)-VH(CD3)-VL(CD3), VH(CD3)-VL(CD3)-VH(CLDN)-VL(CLDN) або VH(CD3)-VL(CD3)-VL(CLDN)-VH(CLDN).

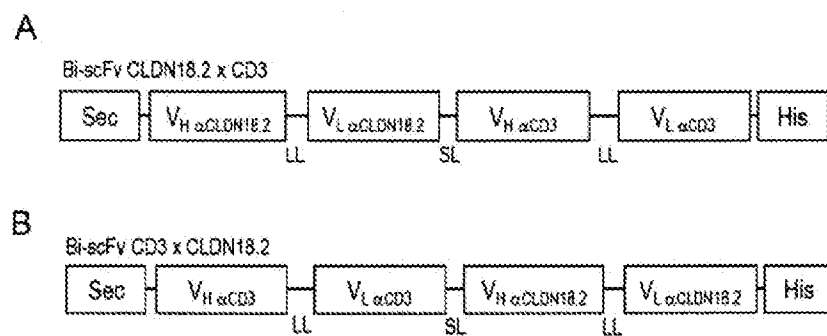
18. З'єднувальний агент за п. 17, який **відрізняється** тим, що зазначені варіабельні області важкого ланцюга (VH) і відповідні варіабельні області легкого ланцюга (VL) з'єднані за допомогою довгого пептидного лінкера, що містить амінокислотну послідовність (GGGGGS)₃ або VE(GGGGS)₂GGVD.

50 19. З'єднувальний агент за п. 17 або 18, який **відрізняється** тим, що зазначені дві одиниці VH-VL або VL-VH scFv з'єднані за допомогою короткого пептидного лінкера, переважно пептидного лінкера, що містить амінокислотну послідовність SGGGGS або GGGGS.

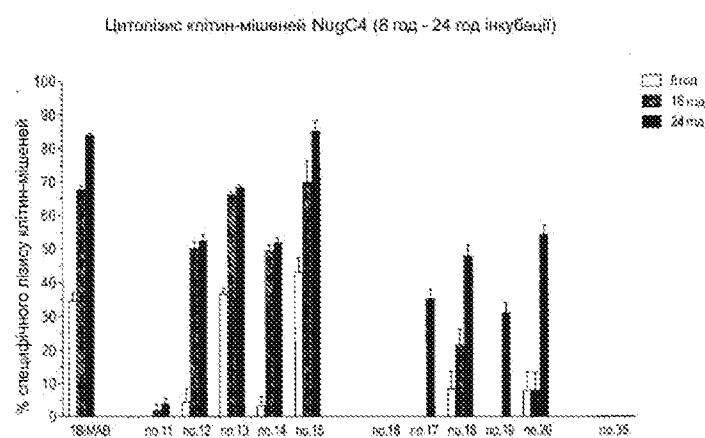
55 20. З'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-19, який **відрізняється** тим, що зазначений CLDN є CLDN6, і зазначений з'єднувальний агент містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 42, 43, 44 і 45, або її фрагмент або варіант.

60 21. З'єднувальний агент за будь-яким з пп. 5-20, який **відрізняється** тим, що зазначені ракові клітини, які експресують CLDN6, являють собою ракові клітини раку, вибраного із групи, яка складається з раку сечового міхура; раку яєчника, зокрема аденокарциноми яєчника й теракарциноми яєчника; раку легені, включаючи дрібноклітинний рак легені (SCLC) і недрібноклітинний рак легені (NSCLC), зокрема плоскоклітинний рак легені й аденокарциному;

- раку шлунка; раку молочної залози; раку печінки; раку підшлункової залози; раку шкіри, зокрема базальноклітинної карциноми й плоскоклітинної карциноми; злоякісної меланоми; раку голови й шиї, зокрема злоякісної плеоморфної аденоми; саркоми, зокрема синовіальної саркоми й карциносаркоми; раку жовчної протоки; раку сечового міхура, зокрема перехідноклітинної карциноми й папілярного раку; раку нирки, зокрема плоскоклітинного раку, включаючи світлоклітинний рак нирки й папілярну карциному нирки; раку товстої кишки; раку тонкої кишки, включаючи рак клубової кишки, зокрема аденокарциноми тонкої кишки й аденокарциноми клубової кишки; ембріональної карциноми яєчка; плацентарної хоріокарциноми; раку шийки матки; раку яєчка, зокрема семіноми яєчка, тератоми яєчка й ембріонального раку яєчка; раку матки; герміноми, такої як тератокарцинома або ембріональна карцинома, зокрема ембріональноклітинної пухлини яєчка і їх метастатичних форм.
22. З'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-21, який **відрізняється** тим, що зв'язуючий агент містить N-кінцевий сигнал секреції й/або C-кінцеву епітопну гістидинову мітку, переважно епітопну мітку, що містить шість гістидинових залишків.
23. Рекombінантна нуклеїнова кислота, яка кодує з'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-22.
24. Рекombінантна нуклеїнова кислота за п. 23, яка знаходиться у формі вектора або у формі РНК.
25. Клітина-хазяїн для експресії біспецифічного агента, закодованого нуклеїновою кислотою, де клітина-хазяїн містить рекombінантну нуклеїнову кислоту за п. 23 або 24.
26. Застосування з'єднувального агента за будь-яким з пп. 1-22, рекombінантної нуклеїнової кислоти за п. 23 або 24 або клітини-хазяїна за п. 25 для лікування або попередження ракового захворювання, яке характеризується тим, що ракові клітини експресують CLDN6.
27. Фармацевтична композиція, що містить одне з наступного:
- (i) з'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-22,
 - (ii) рекombінантна нуклеїнова кислота за п. 23 або 24,
 - (iii) рекombінантна нуклеїнова кислота, яка кодує зв'язуючий агент за будь-яким з пп. 1-22,
 - (iv) клітина-хазяїн за п. 25, або
 - (v) клітина-хазяїн, яка містить рекombінантну нуклеїнову кислоту, що кодує зв'язуючий агент за будь-яким з пп. 1-22.
28. Фармацевтична композиція для лікування або профілактики ракового захворювання, що характеризується тим, що ракові клітини експресують CLDN6, що містить одне з наступного:
- (i) з'єднувальний агент за будь-яким з пп. 1-22,
 - (ii) рекombінантна нуклеїнова кислота за п. 23 або 24,
 - (iii) рекombінантна нуклеїнова кислота, яка кодує зв'язуючий агент за будь-яким з пп. 1-22,
 - (iv) клітина-хазяїн за п. 25, або
 - (v) клітина-хазяїн, яка містить рекombінантну нуклеїнову кислоту, що кодує зв'язуючий агент за будь-яким з пп. 1-22.
29. Фармацевтична композиція за п. 27 або 28, де рекombінантна нуклеїнова кислота знаходиться у формі вектора або у формі РНК.
30. Спосіб лікування або попередження ракового захворювання, яке характеризується тим, що ракові клітини експресують CLDN6, що включає введення пацієнтові фармацевтичної композиції за п. 27.
31. Застосування за п. 26 або спосіб за п. 30, де зазначений рак вибраний із групи, яка складається з раку сечового міхура; раку яєчника, зокрема аденокарциноми яєчника й теракарциноми яєчника; раку легені, включаючи дрібноклітинний рак легені (SCLC) і недрібноклітинний рак легені (NSCLC), зокрема плоскоклітинний рак легені й аденокарциному; раку шлунка; раку молочної залози; раку печінки; раку підшлункової залози; раку шкіри, зокрема базальноклітинної карциноми й плоскоклітинної карциноми; злоякісної меланоми; раку голови й шиї, зокрема злоякісної плеоморфної аденоми; саркоми, зокрема синовіальної саркоми й карциносаркоми; раку жовчної протоки; раку сечового міхура, зокрема перехідноклітинної карциноми й папілярного раку; раку нирки, зокрема плоскоклітинного раку, включаючи світлоклітинний рак нирки й папілярну карциному нирки; раку товстої кишки; раку тонкої кишки, включаючи рак клубової кишки, зокрема аденокарциноми тонкої кишки й аденокарциноми клубової кишки; ембріональної карциноми яєчка; плацентарної хоріокарциноми; раку шийки матки; раку яєчка, зокрема семіноми яєчка, тератоми яєчка й ембріонального раку яєчка; раку матки; герміноми, такої як тератокарцинома або ембріональна карцинома, зокрема ембріональноклітинної пухлини яєчка і їх метастатичних форм.



Фиг. 1



Фиг. 2

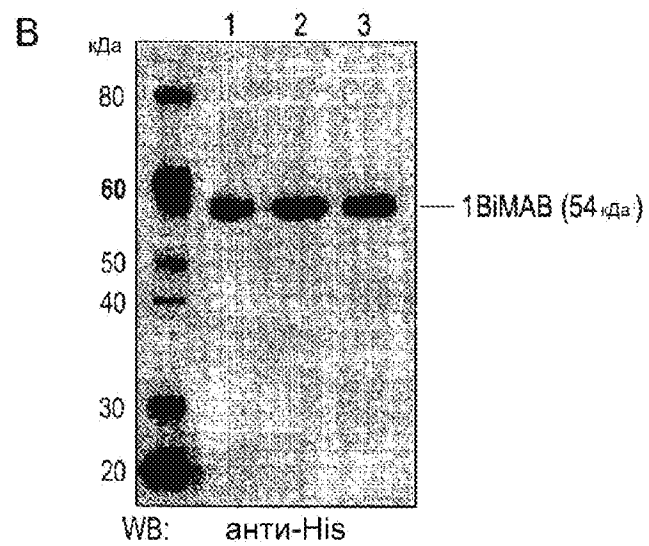
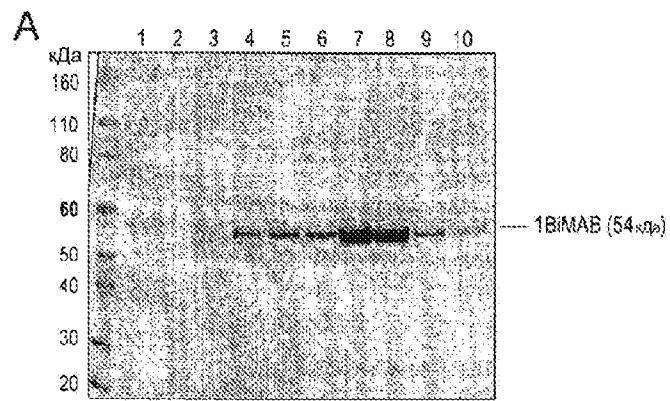
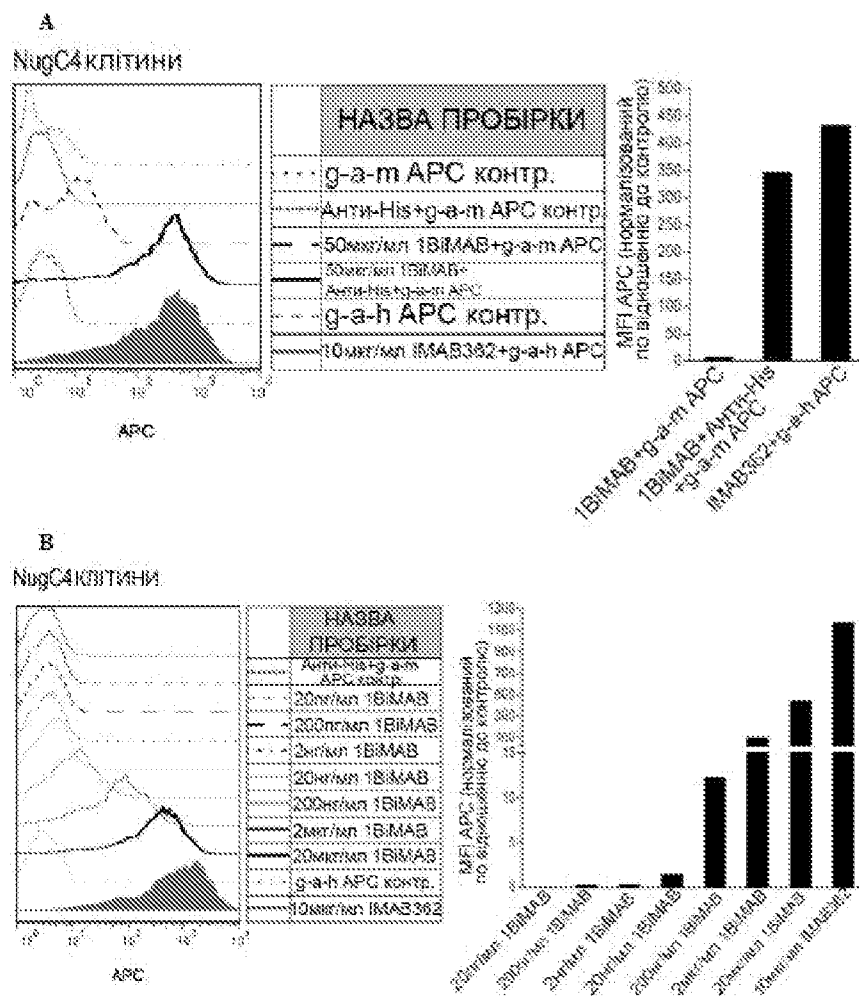
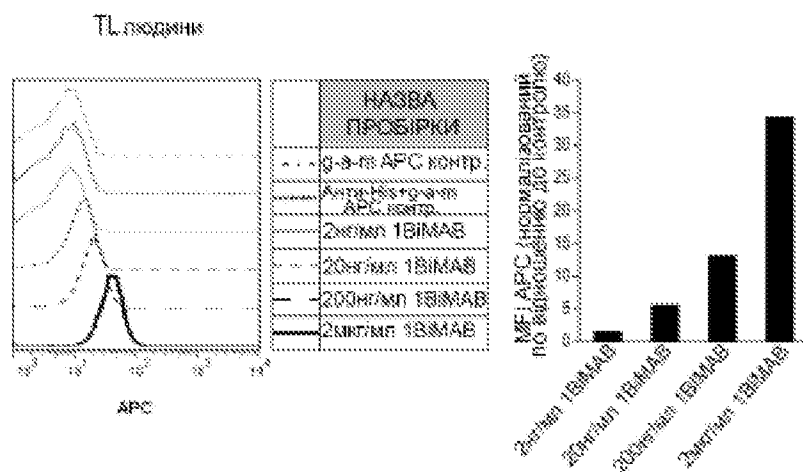


Fig. 3

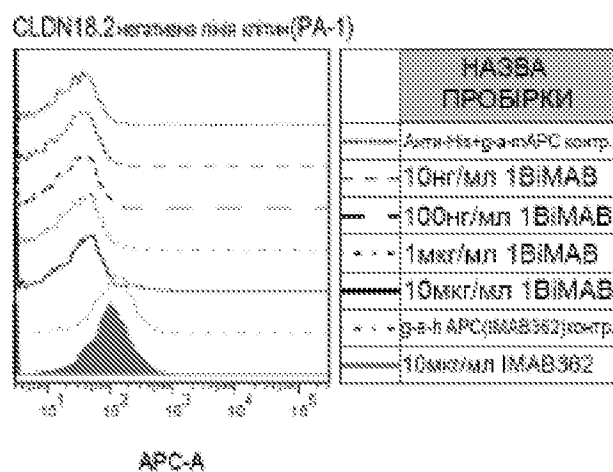


Фіг. 4

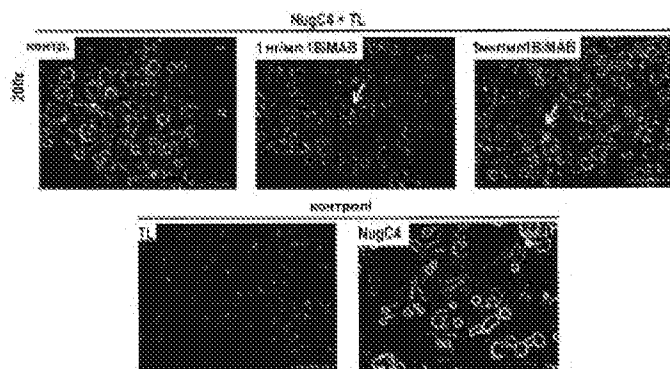
C



D



Фіг. 4 (продовження)



Фіг. 5

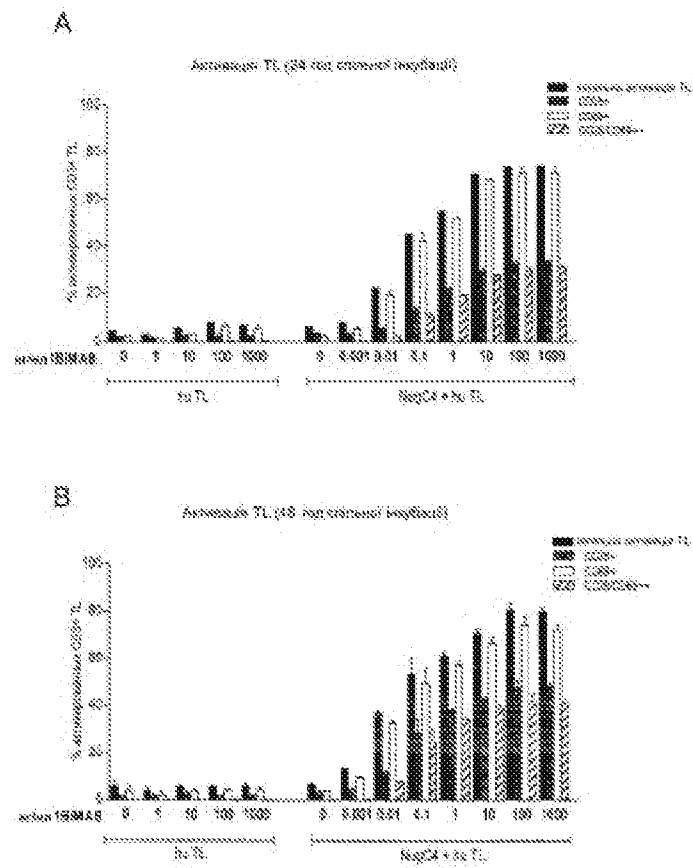
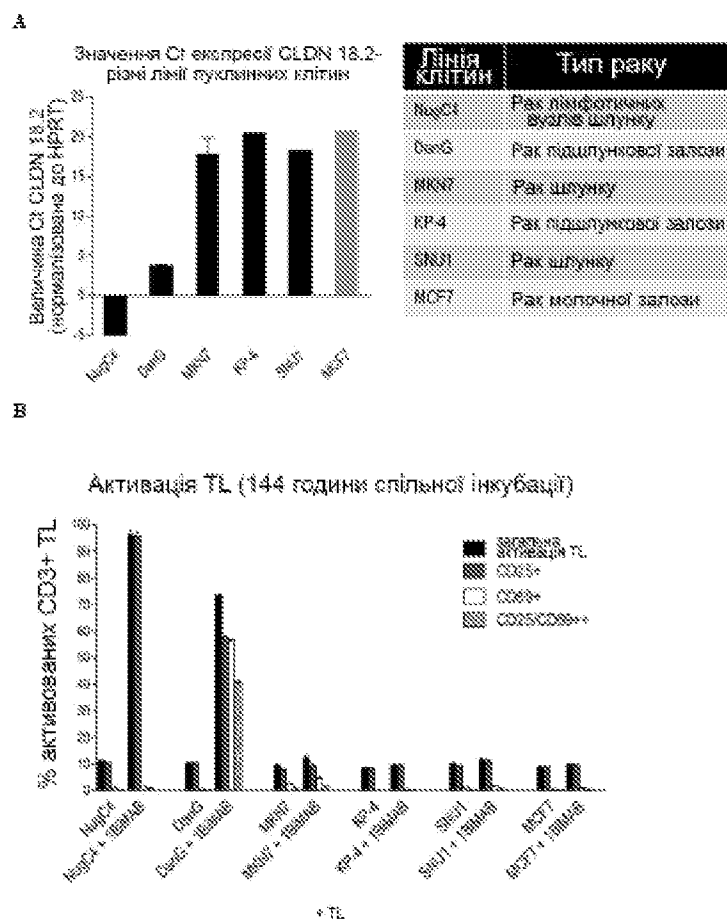
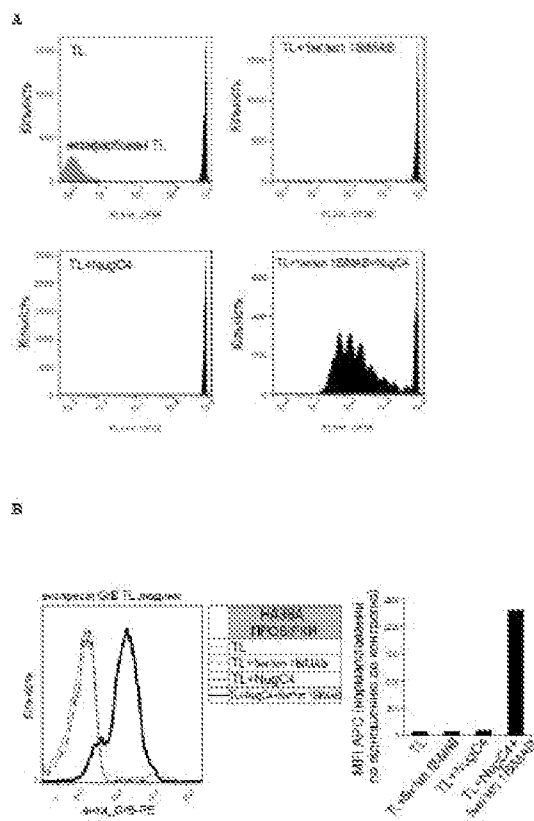


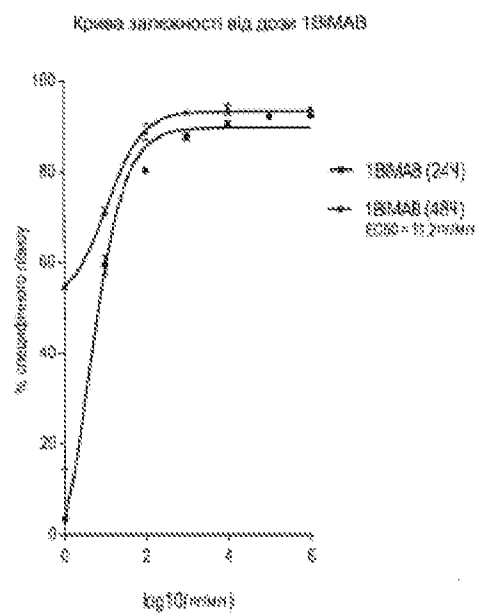
Fig. 6



Фіг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

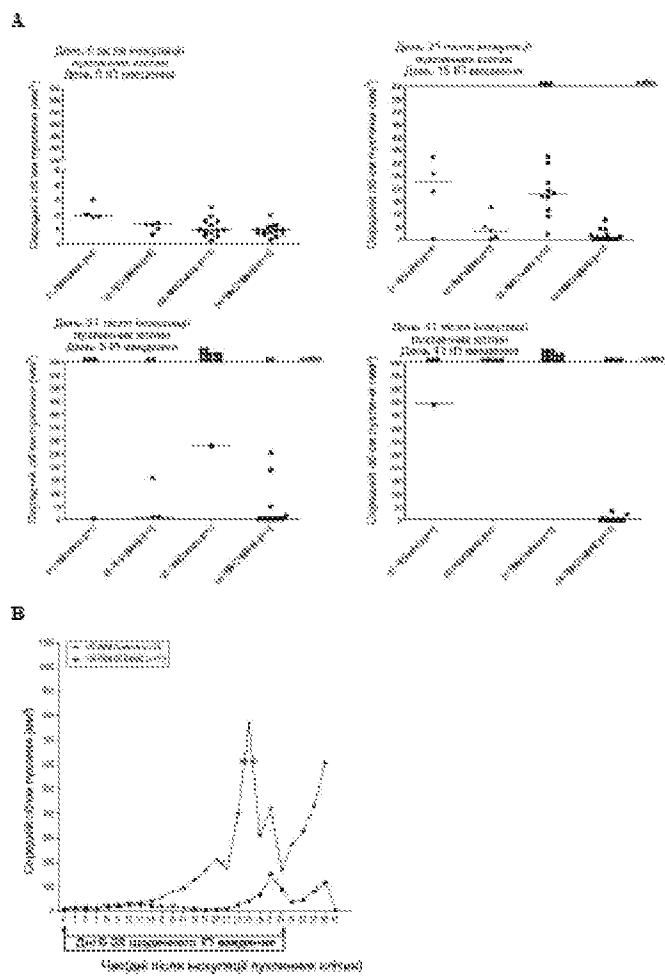
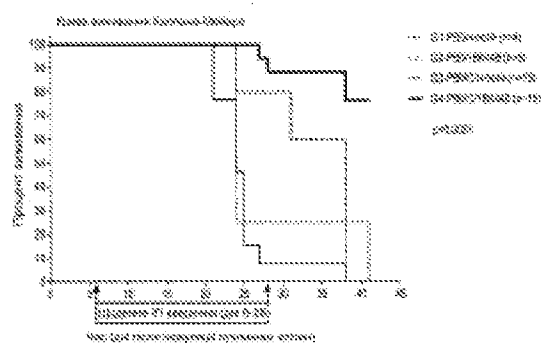
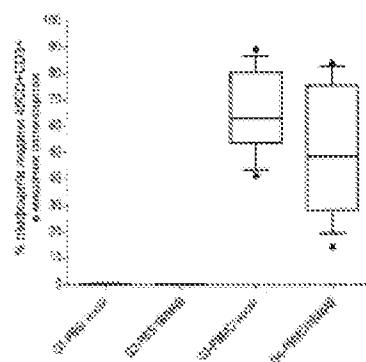


Fig. 10

C

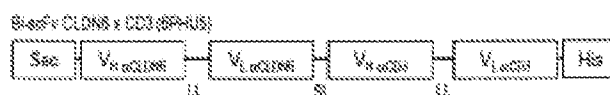


D

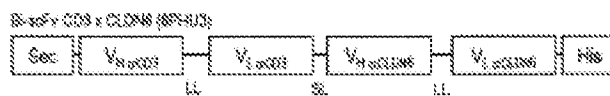


Фиг. 10 (продолжения)

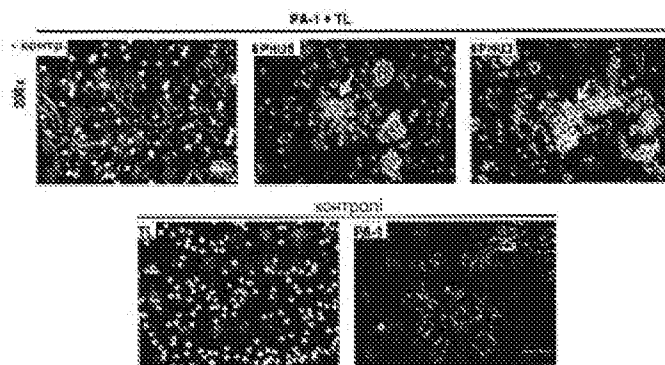
A



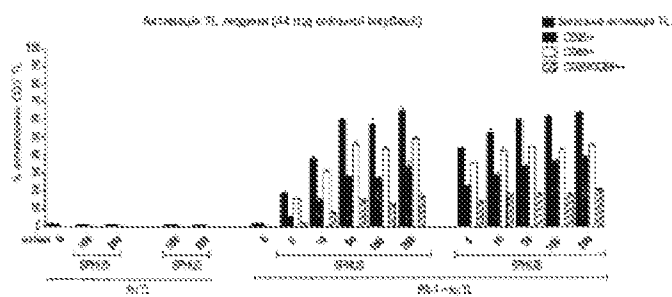
B



Фиг. 11

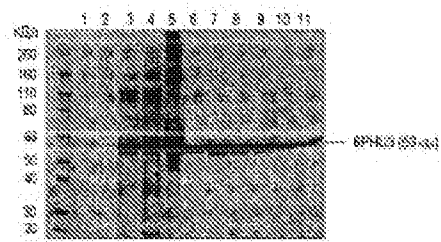


Φir. 12

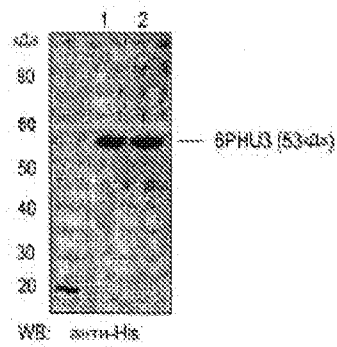


Dir. 13

A



B

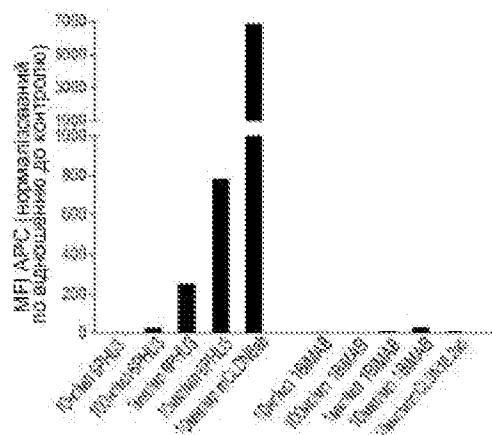
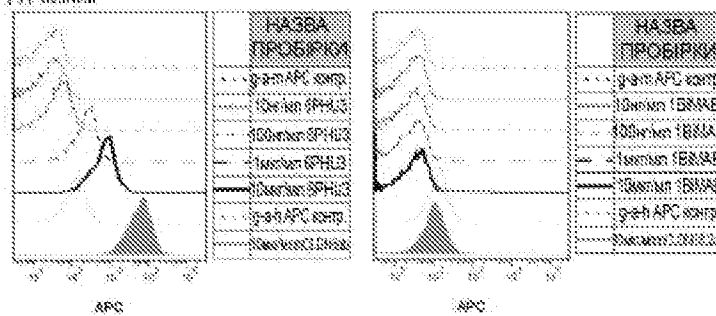


WB: 200711-416

Fig. 14

A

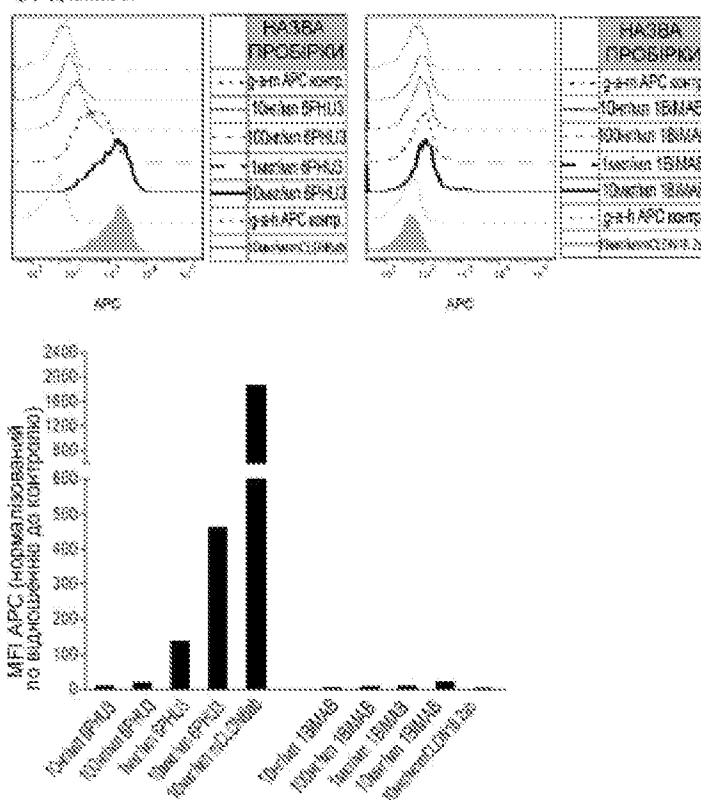
РА-клетки



Фіг. 15

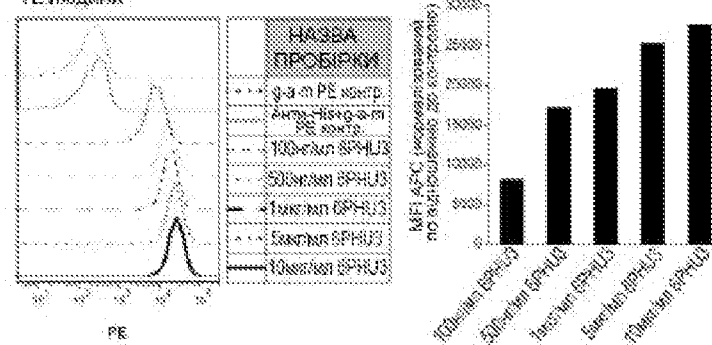
22

QV-80 821638-16

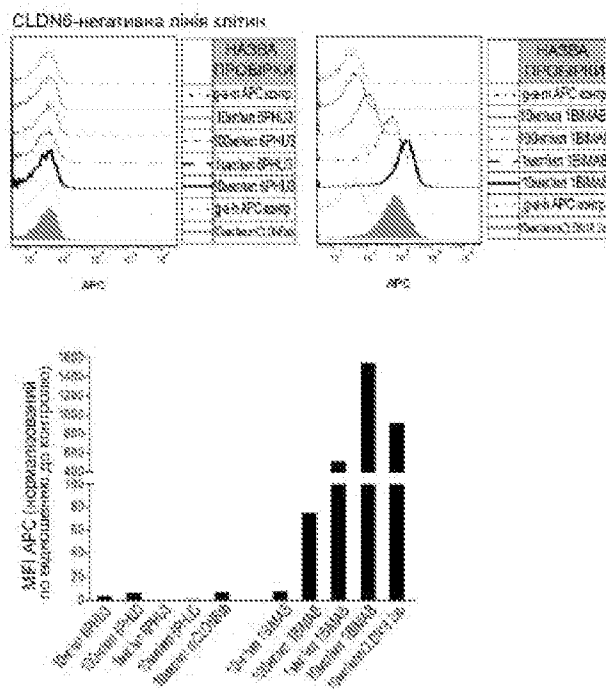


Фіг. 15 (продовження)

YL00020488



Фіг. 15 (продовження)



Фіг. 15 (продовження)

A

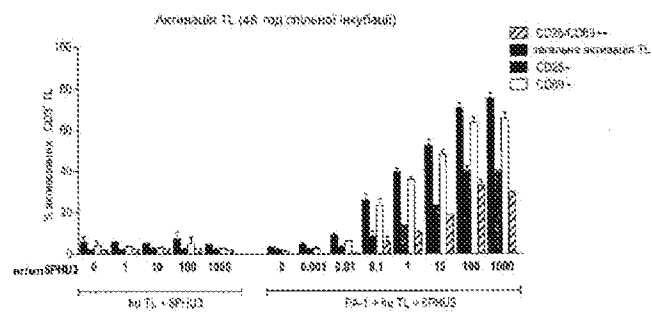
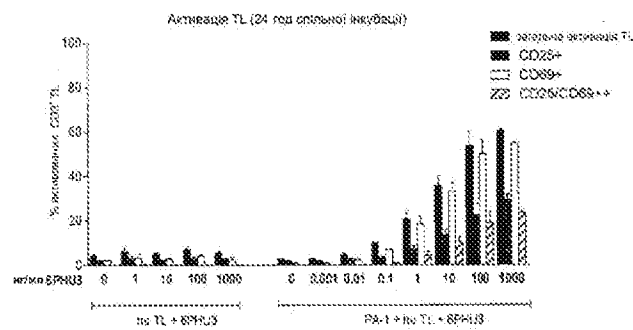
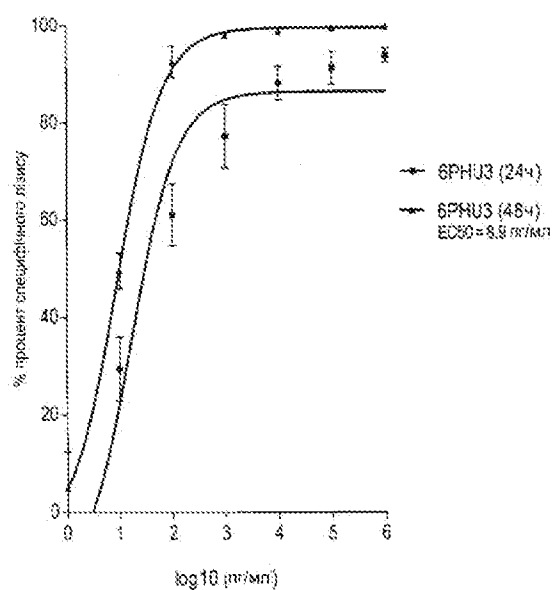
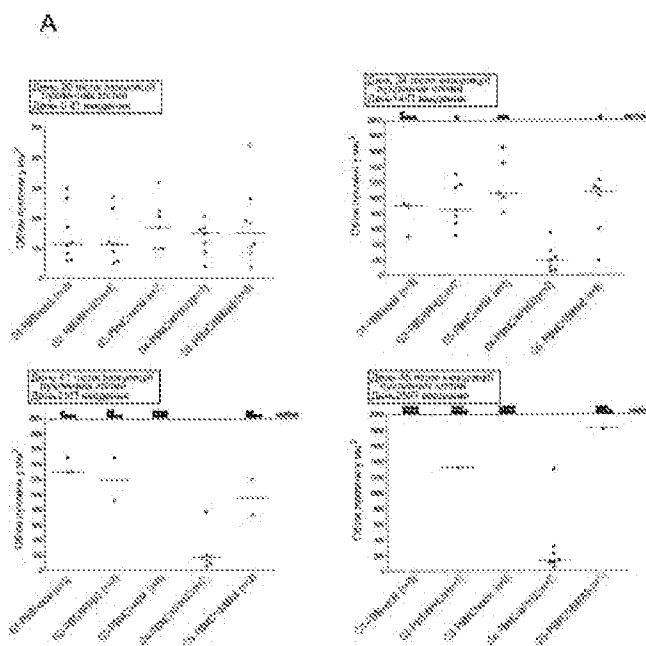


Fig. 16

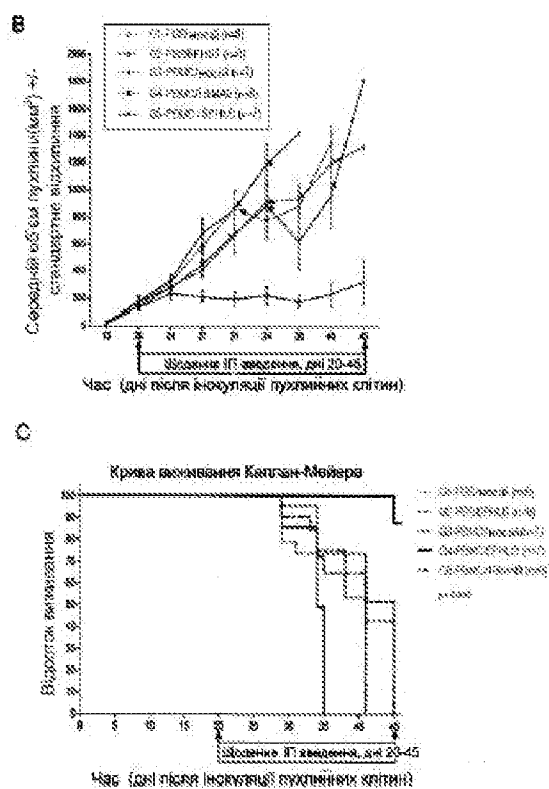
Крива залежності від дози 6PHU3



Фіг. 17



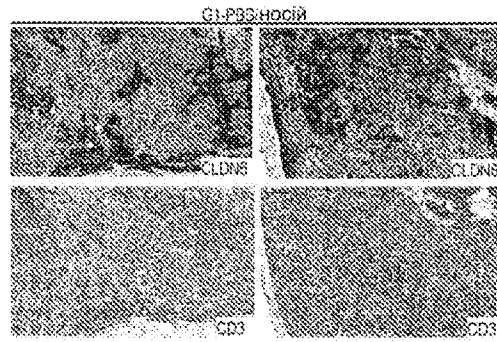
Фіг. 18



Фіг. 18 (продовження)

Фіг. 18 (продовження)

A



B

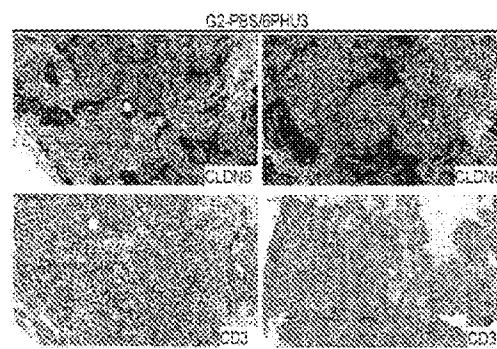
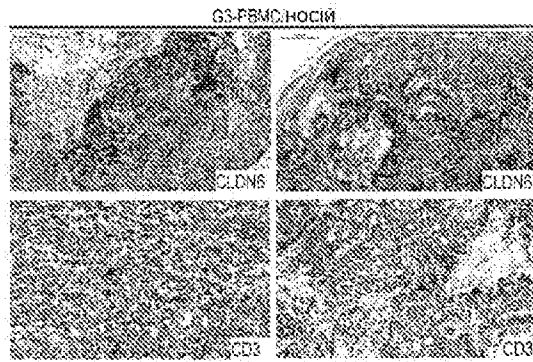
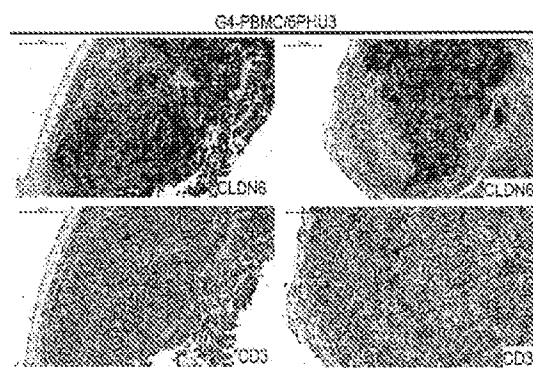


Fig. 19

C

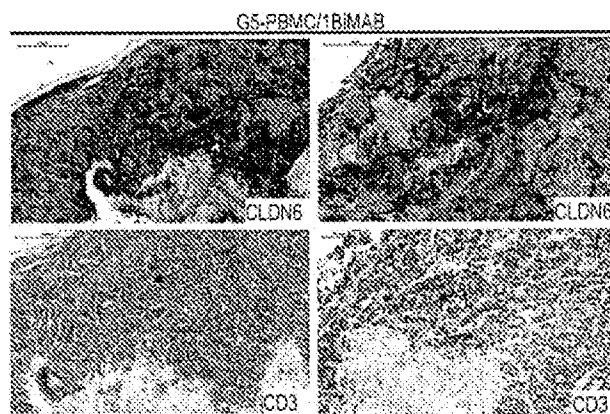


D



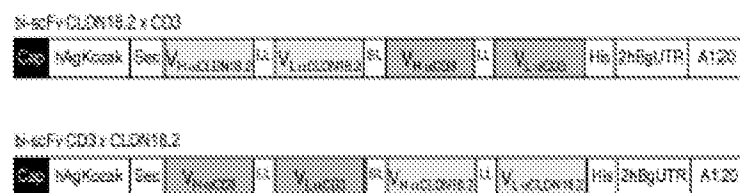
Фіг. 19 (продовження)

E



Фіг. 19 (продовження)

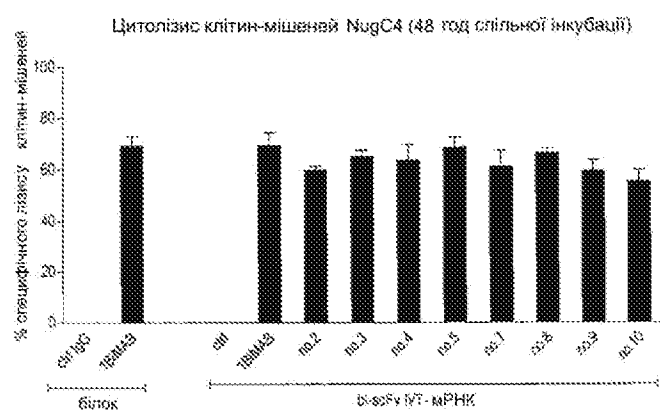
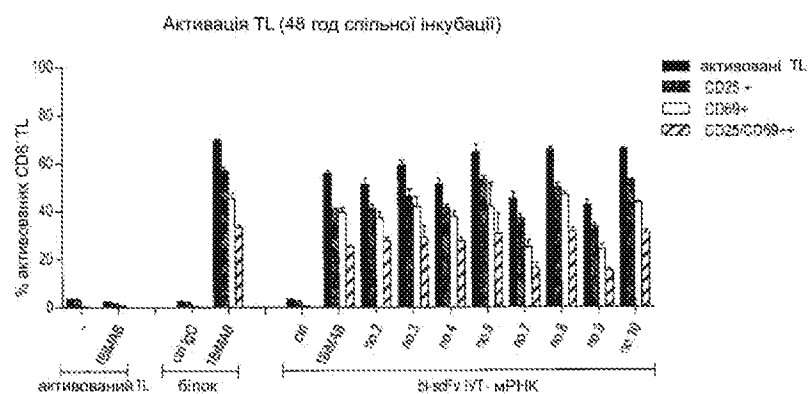
A



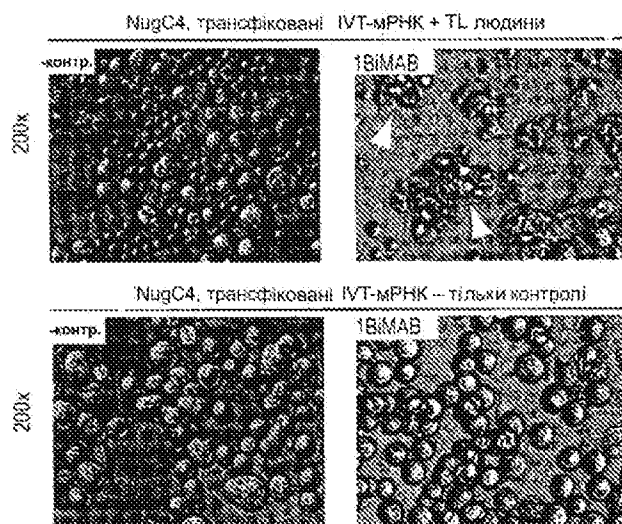
B



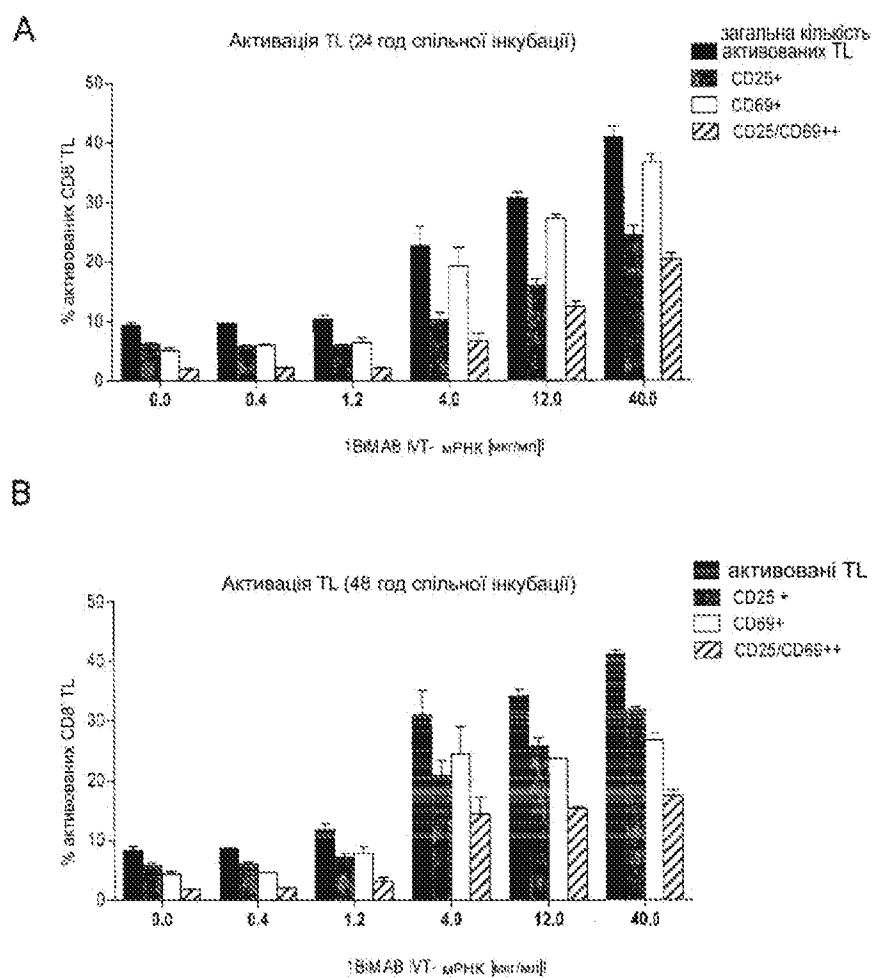
Фіг. 20



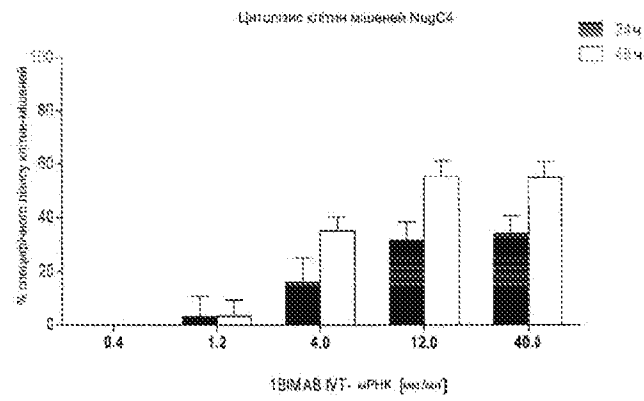
Фіг. 21



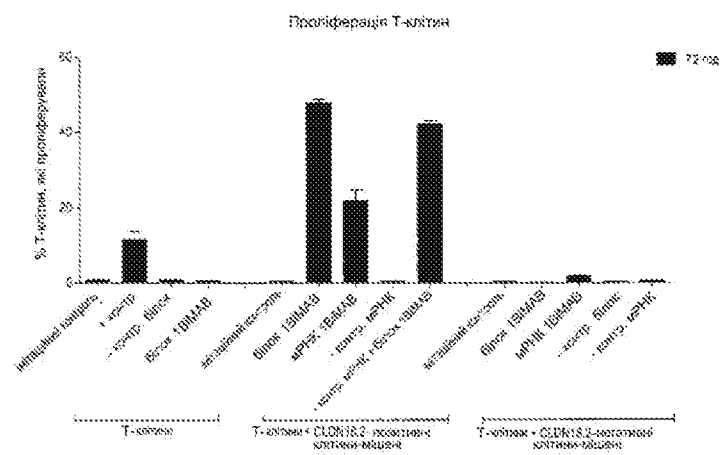
Фіг. 22



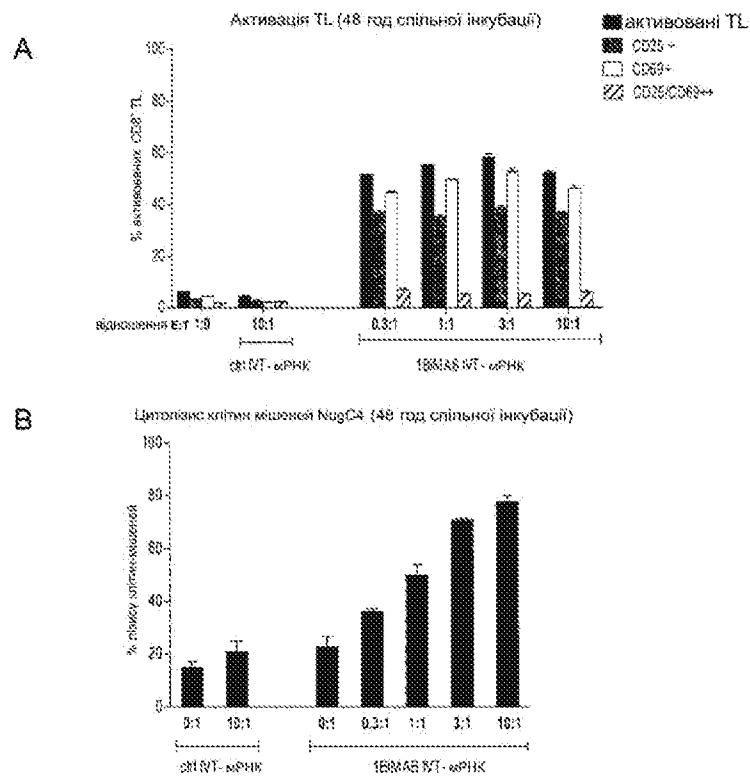
Фіг. 23



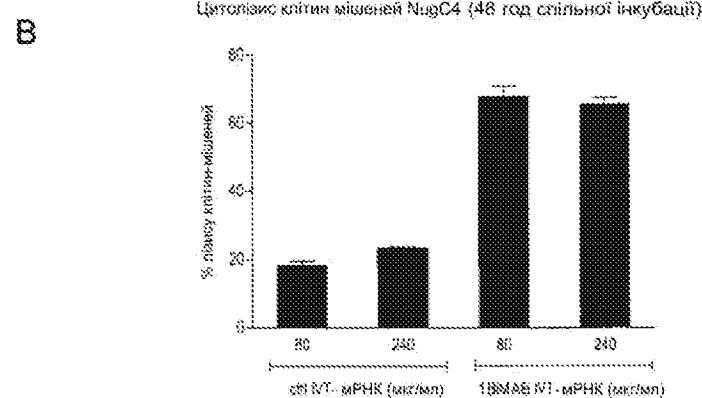
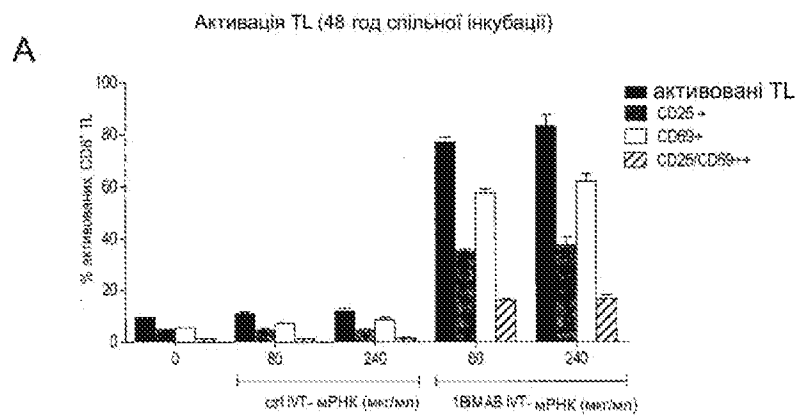
Фіг. 24



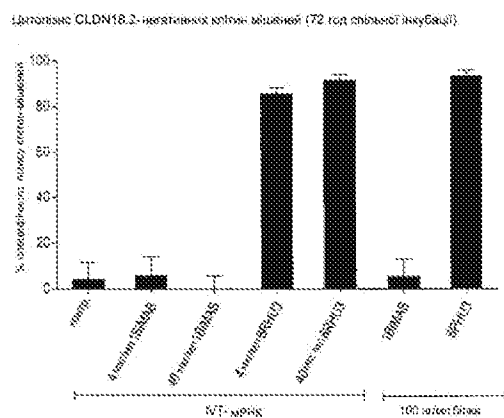
Фіг. 25



Фіг. 26



Фіг. 27



Фіг. 28

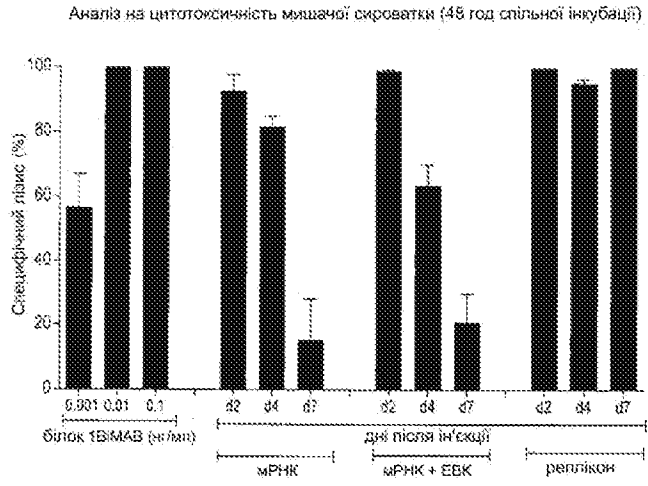


Fig. 30

Si-6cFv-CLDN8 × CD3

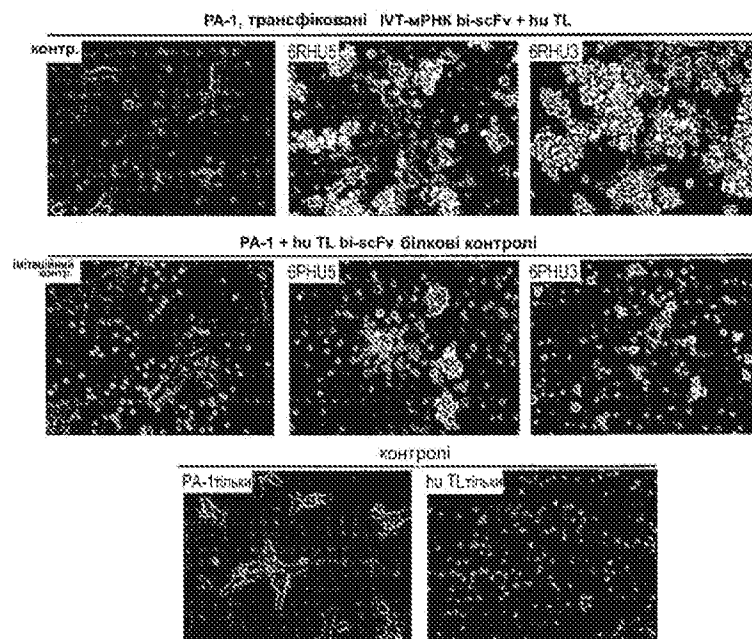
Gen	hAgg.2236	Sec	V_{H1-2}	J	V_{H1-2}	C	V_{H1-2}	J	V_{H1-2}	Ho	264g.378	A/29
-----	-----------	-----	------------	---	------------	---	------------	---	------------	----	----------	------

Si-6cFv-CD3 × CLDN8

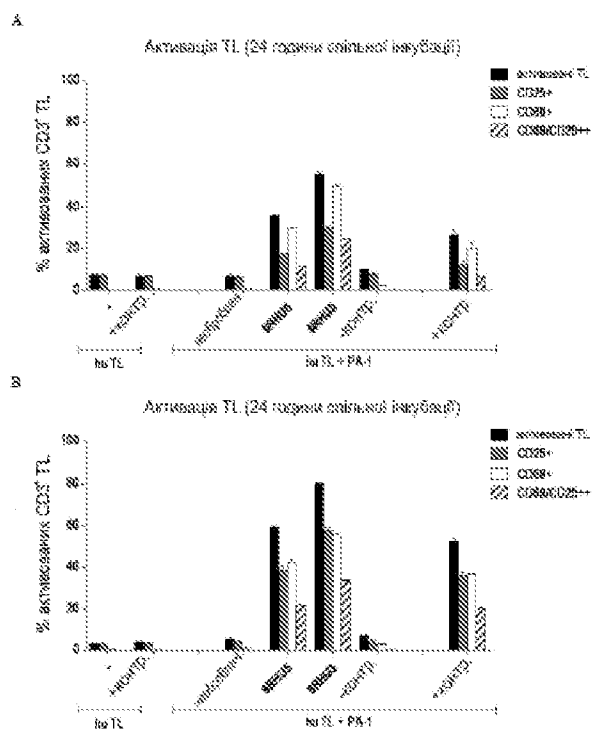
Gen	hAgg.2236	Sec	V_{H1-2}	J	V_{H1-2}	C	V_{H1-2}	J	V_{H1-2}	Ho	264g.378	A/29
-----	-----------	-----	------------	---	------------	---	------------	---	------------	----	----------	------

Cap	512K	mp1.4	Seg	Seg	4.000000	1	4.000000	20	4.000000	1	4.000000	40	512K	A120
-----	------	-------	-----	-----	----------	---	----------	----	----------	---	----------	----	------	------

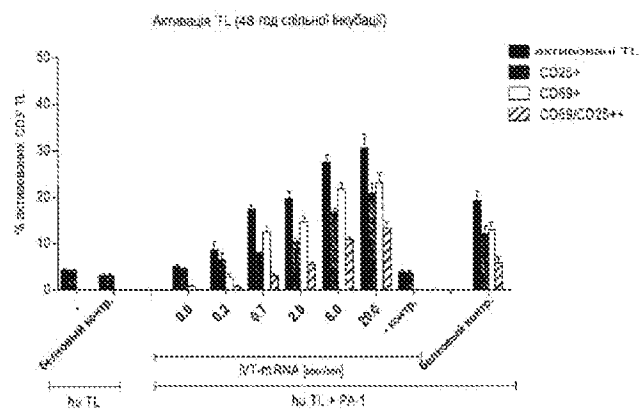
Fig. 31



Фіг. 32

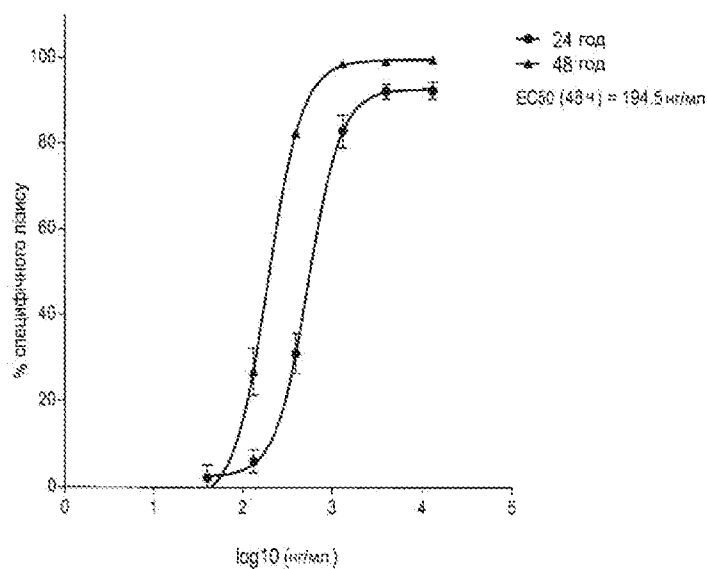


Фіг. 33

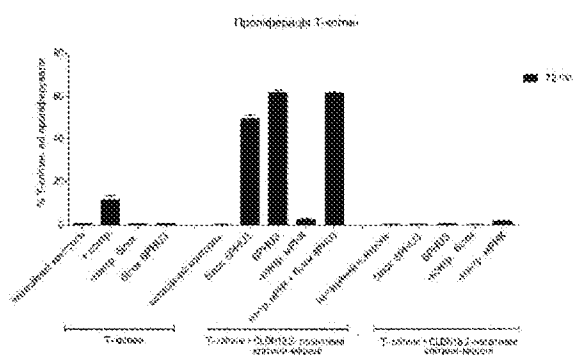


Фиг. 34

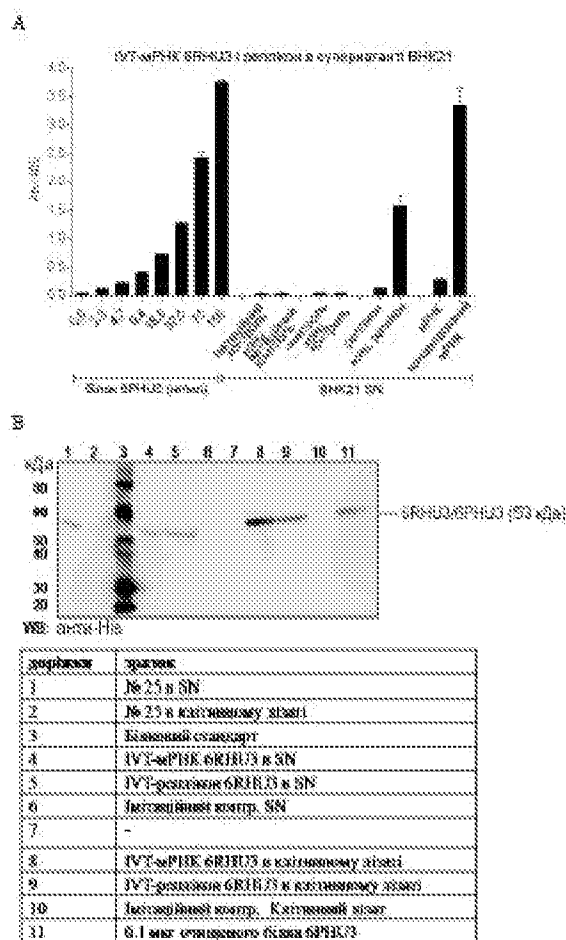
Кривая зависимости от концентрации 6RHU3



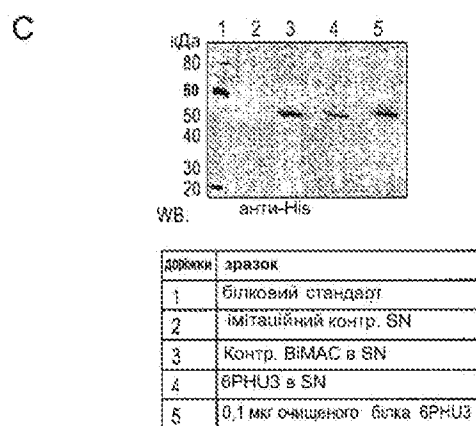
Фиг. 35



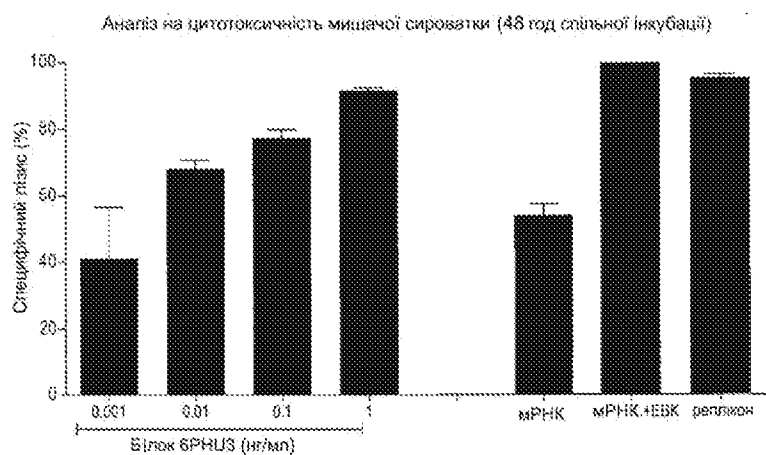
Фиг. 36



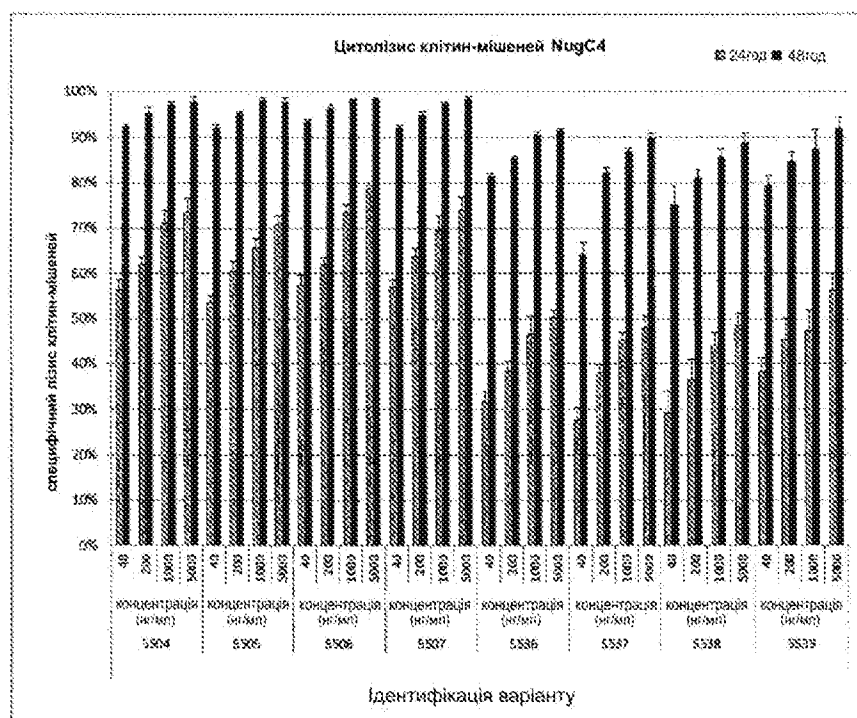
Фиг. 37



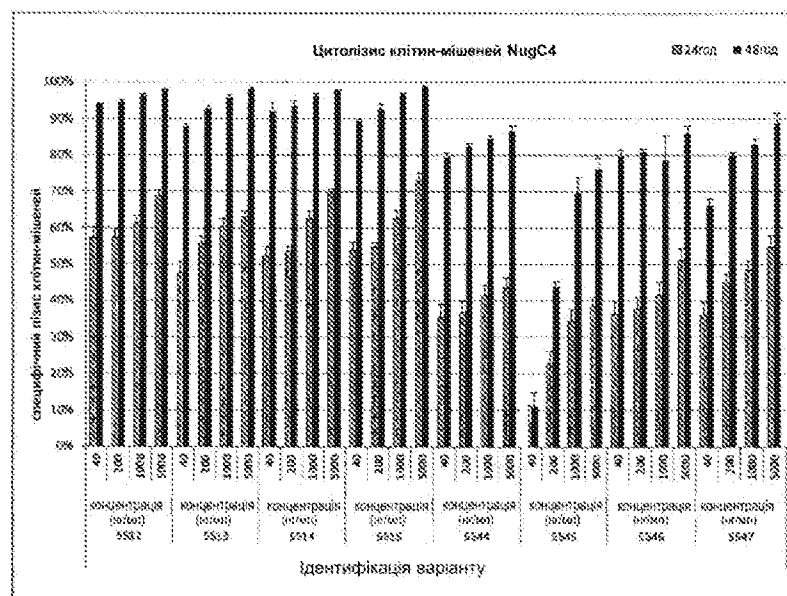
Фиг. 37 (продовження)



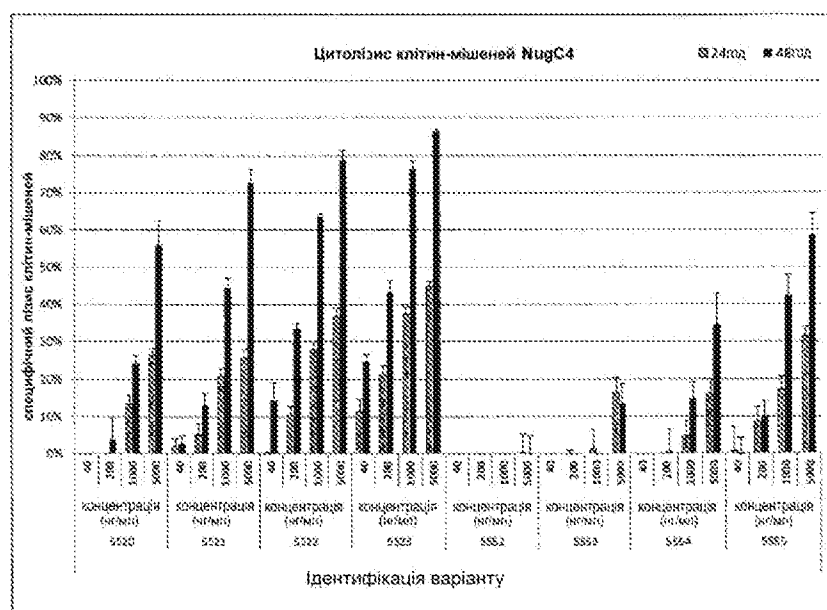
Фіг. 38



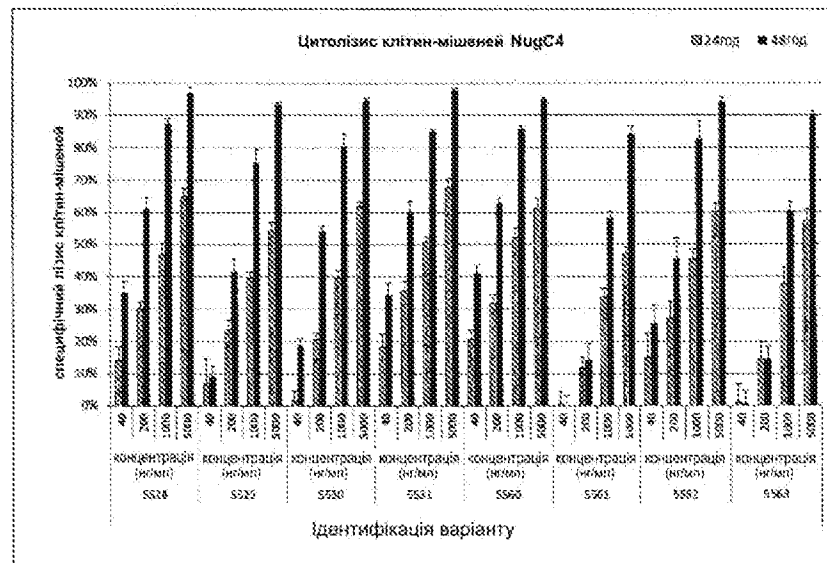
Фіг. 39a



Фіг. 39b



Фіг. 39c



Фіг. 39d

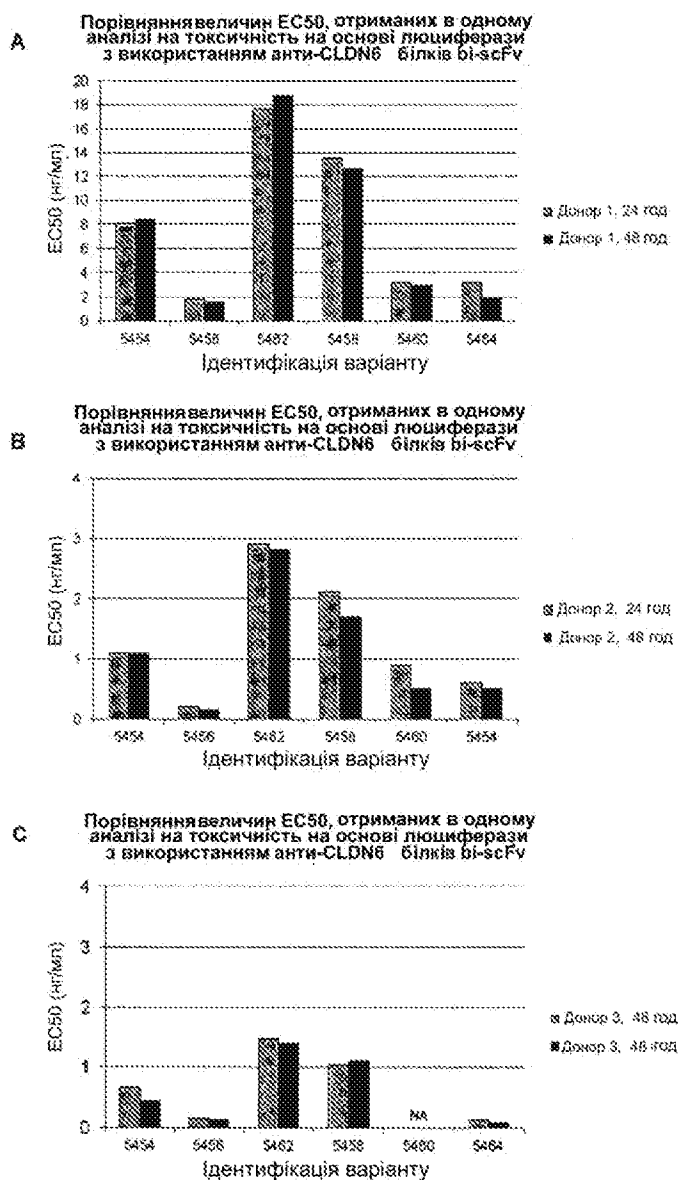


Fig. 40