УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128584** (13) **C2**

(51) МПК (2024.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00

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

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2021 01056**

(22) Дата подання заявки: **09.08.2019**

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **22.08.2024**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **2018-152126**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **10.08.2018**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **JP**

(41) Публікація відомостей про заявку: **28.04.2021, Бюл.№ 17**

(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **21.08.2024, Бюл.№ 34**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/JP2019/031554, 09.08.2019**

(72) Винахідник(и):
Іґава Томоюкі (SG),
Сакурай Міка (JP),
Сімідзу Сун (JP),
Хорі Юдзі (JP),
Хіроніва Наока (SG),
Саворі Наса (JP),
Наріта Йосінорі (JP),
Камікава Такаюкі (JP),
Міядзакі Таро (JP),
Кадоно Содзіро (JP),
Хасеґава Масамі (JP),
Тацумі Канако (JP),
Хаясака Акіра (JP),
Кавай Такеакі (JP),
Мімото Фута (SG),
Кавауті Хірокі (JP),
Камімура Масакі (JP)

(73) Володілець (володільці):
ЧУГАІ СЕЙЯКУ КАБУСІКІ КАЙСЯ,
5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 1158543, Japan (JP)

(74) Представник:
Войтенко Олександр Петрович, реєстр. №23

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2018/091740 A2, 24.05.2018
EP 3305322 A1, 11.04.2018
WO 2013/180200 A1, 05.12.2013
EP 3078744 A1, 12.10.2016
WO 2016/170176 A1, 27.10.2016
WO 2015/190538 A1, 17.12.2015

(54) АНТИГЕНЗВ'ЯЗУВАЛЬНА МОЛЕКУЛА ПРОТИ CD137 ТА ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

UA 128584 C2

Винахід стосується отримання антигензв'язувальних молекул проти CD137, які мають активуючий вплив на імуноцити, цитотоксичну активність або протипухлинну активність, і одночасно мають зменшений вплив на непухлинні тканини, такі як здорові тканини, і викликають менше побічних ефектів. Винахід також стосується способу отримання антигензв'язувальної молекули проти CD137 та фармацевтичної композиції, яка містить антигензв'язувальну молекулу проти CD137.

Галузь техніки

Цей винахід відноситься до антигензв'язувальних молекул проти CD137 та способів їх використання.

Попередній рівень техніки

Рак - це смертельне захворювання, яке важко вилікувати повністю, за винятком деяких випадків. Результати лікування хіміотерапевтичними засобами, яке є основним терапевтичним методом, аж ніяк не є гарними. Існує припущення, що не тільки неоднорідність самих ракових клітин, але й мікросередовище пухлини відіграє важливу роль як фактор, що ускладнює лікування раку (непатентний документ 1). Нещодавно було виявлено, що неоперабельна злоякісна меланома та подібні їй захворювання є потенційно виліковними за допомогою антитіла проти CTLA-4 (білка 4, асоційованого з цитотоксичними Т-лімфоцитами), яке пригнічує імунодепресивну функцію CTLA-4 і тим самим сприяє активації Т-клітин (непатентний документ 2). У 2011 році моноклональне антитіло проти CTLA-4 людини (іпілімумаб ((ipilimumab)) було затверджено Управлінням США з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та ліків (FDA) як перший в світі імуноактивувальний лікарський засіб на основі антитіл. Крім того, повідомляється, що інгібуючі антитіла проти PD-1 та PD-L1 - молекул, відмінних від CTLA-4, що є імунними контрольними точками, - мають терапевтичний ефект (непатентний документ 3) та схвалені FDA.

Зрозуміло, що Т-клітини, які відіграють важливу роль у імунітеті до пухлин, активуються двома сигналами: 1) зв'язуванням рецептора Т-клітин (TCR) з антигенним пептидом, представленим молекулами головного комплексу гістосумісності (MHC) класу I, та активацією TCR; і 2) зв'язуванням костимулюючої молекули на поверхні Т-клітин з її лігандами на антиген-презентуючих клітинах та активацією костимулюючої молекули. Крім того, активація костимулюючих молекул, що належать до надродини рецепторів факторів некрозу пухлини (TNFRSF), включаючи CD137 (4-1BB), на поверхні Т-клітин була описана як важлива для активації Т-клітин (непатентний документ 4).

Надродина рецепторів факторів некрозу пухлини (TNFRSF) включає CD137, CD40, OX40, RANK, GITR та подібні молекули. Як повідомляється, CD137 експресується не тільки на поверхні Т-клітин, але й на поверхні інших імунних клітин, таких як дендритні клітини (DC), В-клітини, NK-клітини, макрофаги та нейтрофіли (непатентний документ 5).

Вже було продемонстровано, що агоністичне антитіло стосовно CD137 демонструє протипухлинний ефект на мишачій моделі, і експериментами на мишачих моделях було показано, що це відбувається головним чином внаслідок активації CD8-позитивних Т-клітин і NK-клітин (непатентний документ 6). Однак побічні ефекти внаслідок неспецифічної гепатотоксичності агоністичного антитіла стосовно CD137 стали клінічними та неклінічними проблемами, перешкоджаючи бажаному прогресу в розробці ліків (непатентний документ 7, непатентний документ 8). Припускають, що побічні ефекти викликані головним чином активацією імунних клітин у непухлинних, неімунних тканинах, таких як печінка, що передбачає зв'язування антитіла з рецептором Fcγ через константну ділянку антитіла (непатентний документ 9). З іншого боку, повідомляється, що для того, щоб агоністичні антитіла до членів надродини рецепторів факторів некрозу пухлини проявляли агоністичну активність in vivo, антитіло повинно бути зшите клітинами, що експресують рецептор Fcγ (клітинами, що експресують FcγRII) (непатентний документ 10). Тобто, зв'язування агоністичного антитіла стосовно CD137 з рецептором Fcγ бере участь як у лікувальній ефективності протипухлинного ефекту антитіла, так і в його побічних ефектах, таких як гепатотоксичність. Таким чином, підвищення зв'язування між антитілом та рецептором Fcγ, як очікується, збільшить ефективність лікарського засобу, але може також підсилити гепатотоксичні побічні ефекти, а зменшення зв'язування між антитілом та рецептором Fcγ може зменшити побічні ефекти, але також зменшити ефективність лікарського засобу.

До цього часу не було повідомлень про агоністичне антитіло стосовно CD137, чия ефективність як лікарського засобу та побічні ефекти були розділені. Більше того, сам протипухлинний ефект агоністичного антитіла стосовно CD137 аж ніяк не є клінічно сильним, і є бажаним подальше посилення ефективності цього лікарського засобу з одночасним уникненням токсичності. Відповідно, бажано розробити новий лікарський засіб, здатний викликати протипухлинні імунні реакції, одночасно зменшуючи ці побічні ефекти.

Коли терапевтичне антитіло вводиться в живий організм, бажано, щоб його цільовий антиген специфічно експресувався тільки в місці ураження. Проте у багатьох випадках той же самий антиген також експресується в місцях, що не є ураженими, тобто в нормальних тканинах, і це може бути причиною небажаних побічних ефектів з точки зору лікування. Наприклад, хоча антитіла проти пухлинних антигенів можуть демонструвати цитотоксичну активність стосовно

пухлинних клітин шляхом ADCC тощо, вони також можуть пошкодити нормальні клітини, якщо той же самий антиген експресується в нормальних клітинах. Для вирішення вищезазначених проблем основна увага була приділена явищу, при якому певні сполуки вдосталь присутні в тканинах-мішенях (наприклад, тканинах пухлини), та була розроблена технологія пошуку антигензв'язувальних молекул із різною антигензв'язувальною активністю, залежною від концентрації таких сполук (наприклад, патентний документ 1).

Суть винаходу

Технічна задача

Цей винахід стосується антигензв'язувальної молекули проти CD137 та способів її використання.

Рішення задачі

Для того, щоб забезпечити антигензв'язувальними молекулами проти CD137, які мають активуючий вплив на імуноцити, цитотоксичну активність або протипухлинну активність і одночасно мають зменшений вплив на непухлинні тканини, такі як нормальні тканини, і мають менше побічних ефектів, та щоб забезпечити способами їх використання, даним винаходом пропонуються антигензв'язувальні молекули проти CD137, що характеризуються тим, що їх зв'язувальна активність стосовно CD137 змінюється в залежності від різних сполук (наприклад, низькомолекулярних молекул) у тканинах-мішенях (наприклад, тканинах пухлин), та пропонуються способи їх використання, фармацевтичні композиції і тому подібне. В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 за цим винаходом мають низькі побічні ефекти, і, отже, їхнє дозування можна збільшити без побоювань щодо побічних ефектів, і, як результат, вони можуть демонструвати сильнішу ефективність як лікарський засіб (цитотоксичну активність або протипухлинну активність).

Специфічно, цим винаходом пропонуються антигензв'язувальні молекули проти CD137, способи їх використання, фармацевтичні композиції і тому подібне, як описано нижче як приклади.

[1] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, яка має CD137-зв'язувальну активність, залежну від низькомолекулярної сполуки.

[2] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [1], де зв'язувальна активність стосовно CD137 у присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує зв'язувальну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[2.1] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [1] або [2], де зв'язувальна активність стосовно CD137 у присутності 10 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує зв'язувальну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[2.2] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[2.1], де значення KD стосовно CD137 у присутності 10 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки становить $5x10^{-7}$ М або менше.

[2.3] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[2.2], де значення KD стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки становить $1x10^{-6}$ М або більше.

[2.4] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [1], де значення KD стосовно CD137 у розчині, приготовленому таким чином, що концентрація низькомолекулярної сполуки становить 10 мкМ або більше, становить $5x10^{-7}$ М або менше, а значення KD стосовно CD137 у розчині, до якого низькомолекулярна сполука не додана, становить $1x10^{-6}$ М або більше.

[2.5] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [1], де значення KD стосовно CD137 у розчині, який приготовлений таким чином, що концентрація низькомолекулярної сполуки становить 10 мкМ або більше, і значення KD стосовно CD137 у розчині, до якого не додана низькомолекулярна сполука, виміряні, кожне, за допомогою аналізу Biacore протягом 24 годин після контактування CD137 і антигензв'язувальної молекули проти CD137 у розчині.

[2.6] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[2.5], яка утворює тримолекулярний комплекс із низькомолекулярною сполукою та CD137.

[2.7] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[2.6], яка зв'язується з CD137, що походить від людини та мавпи.

[2.8] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[2.7], де низькомолекулярна сполука являє собою аденозинвмісну сполуку.

[2.9] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[2.8], де низькомолекулярна сполука являє собою аденозинтрифосфат (ATP).

[3] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[2.9], яка включає будь-яку комбінацію HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, вибрану з (a)-(k), вказаних нижче:

(a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 8, і HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17;

(b) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 9, і HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17;

(c) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 10, і HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17;

(d) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 11, і HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18;

(e) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 8, і HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18;

(f) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 12, і HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18;

(g) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 13, і HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18;

(h) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14, і HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 19;

(i) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 15, і HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20;

(j) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 16, і HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20; і

(k) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14, і HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17.

[3.1] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[3], яка включає будь-яку комбінацію HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, вибрану з (a) - (g), вказаних нижче:

(a) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27;

(b) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 22, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27;

(c) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 28;

(d) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 29;

(e) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 23, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27;

(f) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 24, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27; і

(g) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 25, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

[4] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, яка включає будь-яку комбінацію HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, вибрану з (a) - (m), вказаних нижче:

(a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 8, HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність

за SEQ ID NO: 17, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27;

(b) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 9, HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 22, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27;

(c) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 10, HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 22, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27;

(d) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 11, HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27;

(e) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 8, HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27;

(f) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 12, HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 28;

(g) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 13, HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 29;

(h) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14, HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 19, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 23, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27;

(i) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 15, HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 24, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27;

(j) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 15, HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 25, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27;

(k) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 16, HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 25, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27;

(l) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14, HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 19, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 24, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27; і

(m) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14, HVR-H3, що включає амінокислотну

послідовність за SEQ ID NO: 17, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

[5] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, яка включає:

(a) VH, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з будь-якою з амінокислотних послідовностей за SEQ ID NO: 43-53; або

(b) VL, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з будь-якою з амінокислотних послідовностей за SEQ ID NO: 54-60.

[5.1] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, яка включає будь-яку комбінацію VH і VL, вибрану з (a) - (m), вказаних нижче:

(a) VH, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 43, і VL, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 54;

(b) VH, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 44, і VL, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 55;

(c) VH, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 45, і VL, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 55;

(d) VH, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 46, і VL, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 54;

(e) VH, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 47, і VL, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 54;

(f) VH, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 48, і VL, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 56;

(g) VH, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 49, і VL, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 57;

(h) VH, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 50, і VL, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 58;

(i) VH, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 51, і VL, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 59;

(j) VH, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 51, і VL, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 60;

(k) VH, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 52, і VL, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 60;

(l) VH, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 50, і VL, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 59; і

(m) VH, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 53, і VL, що має принаймні 95 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 54.

[5.2] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, яка включає будь-яку комбінацію VH і VL, вибрану з (a) - (m), вказаних нижче:

(a) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54;

(b) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 44, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 55;

(c) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 45, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 55;

(d) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 46, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54;

(e) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 47, і VL, що включає

амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54;

(f) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 48, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 56;

(g) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 49, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 57;

(h) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 50, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 58;

(i) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59;

(j) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60;

(k) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 52, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60;

(l) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 50, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59; і

(m) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 53, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54.

[5.3] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, чиє значення [зв'язувальна активність (зв'язувальна кількість) стосовно CD137 у присутності 10 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки]/[зв'язувальна активність (зв'язувальна кількість) стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки] дорівнює або перевищує значення контрольної антигензв'язувальної молекули, де контрольною антигензв'язувальною молекулою є антигензв'язувальна молекула проти CD137, що включає комбінацію HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 8, HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

[5.4] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [5.3], де контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антигензв'язувальну молекулу проти CD137, яка включає комбінацію VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54.

[5.5] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, чиє значення [зв'язувальна активність (KD) стосовно CD137 у присутності 1 мкМ низькомолекулярної сполуки]/[зв'язувальна активність (KD) стосовно CD137 у присутності 10 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки дорівнює або перевищує значення контрольної антигензв'язувальної молекули, де контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антигензв'язувальну молекулу проти CD137, яка включає комбінацію HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7, HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 8, HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17, HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21, HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26, і HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

[5.6] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [5.5], де контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антигензв'язувальну молекулу проти CD137, яка включає комбінацію VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54.

[5.7] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, яка має CD137-зв'язувальну активність, що залежить від низькомолекулярної сполуки, де антигензв'язувальна молекула проти CD137 конкурує з антигензв'язувальною молекулою за будь-яким з [3]-[5.2] за зв'язування з CD137 у присутності 10 мкМ або більше, 50 мкМ або більше, 100 мкМ або більше, 150 мкМ або більше, 200 мкМ або більше або 250 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки.

[5.8] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, яка має CD137-зв'язувальну активність, залежну від низькомолекулярної сполуки, де антигензв'язувальна молекула проти CD137 зв'язується з тим же самим епітопом CD137, що зв'язується антигензв'язувальною молекулою за будь-яким з [3]-[5.2], у присутності 10 мкМ або більше, 50 мкМ або більше, 100 мкМ або більше, 150 мкМ або більше, 200 мкМ або більше або 250 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки.

[5.8A] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [5.3]-[5.8], де низькомолекулярна сполука являє собою аденозинвмісну сполуку.

[5.8B] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [5.3]-[5.8A], де

низькомолекулярна сполука являє собою АТР.

[5.9] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[5.8B], яка є моноклональним антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом.

[5.10] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[5.9], яка є антитілом людини, гуманізованим антитілом, або химерним антитілом, або їх антигензв'язувальним фрагментом.

[5.11] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[5.10], яка є повнорозмірним антитілом IgG1.

[5.12] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[5.11], яка включає змінену ділянку Fc, в якій змінена щонайменше одна амінокислота, де змінена ділянка Fc має підвищену зв'язувальну активність стосовно FcγRIIb, як порівняти з батьківською ділянкою Fc, яка не має амінокислотних змін.

[5.13] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [5.12], де зв'язувальна активність зміненої Fc стосовно FcγRIIb дорівнює або перевищує зв'язувальну активність контрольної Fc-ділянки, де контрольною Fc-ділянкою є Fc-ділянка IgG1 людини, що включає комбінацію амінокислотних замін G236N/H268D/A330K, згідно з Європейською номенклатурою.

[5.14] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [5.12] або [5.13], де контрольна Fc-ділянка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 153.

[5.15] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [5.12], де щонайменше одна амінокислотна зміна являє собою щонайменше одну амінокислотну заміну, вибрану з групи, що складається з G236N, H268D та A330K, згідно з Європейською номенклатурою.

[5.16] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [5.12] або [5.15], де щонайменше одна амінокислотна зміна являє собою комбінацію амінокислотних замін G236N/H268D/A330K, згідно з Європейською номенклатурою.

[5.17] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [5.12]-[5.16], де батьківська Fc-ділянка походить від Fc-ділянки IgG1 людини.

[5.18] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[5.17], яка включає змінену ділянку Fc, в якій змінена щонайменше одна амінокислота, де антигензв'язувальна молекула проти CD137 має підвищену ізоелектричну точку (pI), як порівняти з ізоелектричною точкою батьківської антигензв'язувальної молекули проти CD137, що включає батьківську ділянку Fc, яка не має амінокислотних змін.

[5.19] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [5.18], де щонайменше одна амінокислотна зміна являє собою зміну амінокислотного залишку, який може бути підданий впливу на поверхні батьківської ділянки Fc.

[5.20] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [5.18] або [5.19], де щонайменше одна амінокислотна зміна являє собою:

(i) заміну щонайменше одного амінокислотного залишку, що має негативний заряд на бічному ланцюзі, в батьківській Fc-ділянці амінокислотним залишком, що не має заряду на бічному ланцюзі,

(ii) заміну щонайменше одного амінокислотного залишку, що не має заряду на бічному ланцюзі, в батьківській Fc-ділянці амінокислотним залишком, що має позитивний заряд на бічному ланцюзі, та/або

(iii) заміну щонайменше одного амінокислотного залишку, що має негативний заряд на бічному ланцюзі, в батьківській Fc-ділянці амінокислотним залишком, що має позитивний заряд на бічному ланцюзі.

[5.21] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [5.18]-[5.20], де щонайменше одна амінокислотна зміна являє собою комбінацію амінокислотних замін, і де амінокислотні заміни розташовані в позиціях, конформаційно близьких одна до одної.

[5.22] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [5.18]-[5.21], де зв'язувальна активність зміненої ділянки Fc стосовно рецептора Fcγ (FcγR) істотно не знижена, як порівняти з активністю батьківської ділянки Fc.

[5.23] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [5.22], де рецептор Fcγ (FcγR) являє собою FcγRIIb.

[5.24] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [5.18]-[5.23], де щонайменше одна амінокислотна зміна є щонайменше однією амінокислотною заміною, вибраною з групи, що складається з Q311R, P343R та D413K, згідно з Європейською номенклатурою.

[5.25] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [5.18]-[5.24], де щонайменше однією амінокислотною зміною є (i) амінокислотна заміна P343R, (ii) комбінація амінокислотних замін Q311R/P343R або (iii) комбінація амінокислотних замін Q311R/D413K,

згідно з Європейською номенклатурою.

[6] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[5.25], яка включає змінену ділянку Fc, де змінена ділянка Fc включає будь-яку комбінацію амінокислотних змін, вибрану з наступних:

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K;
K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K;
L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/P343R/D413K;
L234Y/P238D/V264I/A330K/P343R/D413K;
L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/P343R/D413K;
L234Y/G237D/P238D/A330K/P343R/D413K;
L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R/P343R;
L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/Q311R/P343R;
L234Y/P238D/V264I/A330K/Q311R/P343R;
L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/Q311R/P343R;
L234Y/G237D/P238D/A330K/Q311R/P343R;
L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R;
K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R;
L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/D413K;
K214R/G236N/H268D/A330K/P343R;
K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R;
K214R/G236N/H268D/A330K/D413K;
K214R/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K;
K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K;
K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R;
K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R;
K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R;
K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R;
K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K;
K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K і
K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R,

згідно з Європейською номенклатурою.

[6.1] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[6], де змінена Fc-ділянка походить від Fc-ділянки IgG1 людини.

[6.2] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[6.1], де змінена ділянка Fc також має делеції в позиціях 446 і 447, згідно з Європейською номенклатурою.

[7] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[6.2], яка включає константну ділянку важкого ланцюга, що включає будь-яку з амінокислотних послідовностей за SEQ ID NO: 64-85.

[7.1] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, яка включає будь-яку комбінацію VH, VL, CH і CL, вибрану з (i) - (xxxviii), вказаних нижче:

(i) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 64, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(ii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 66, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(iii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 67, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(iv) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 68, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(v) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 69, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(vi) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 70, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(vii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 71, VL, що включає амінокислотну послідовність за

SEQ ID NO: 54, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(viii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 73, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(ix) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 75, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(x) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 78, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xi) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 80, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 82, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xiii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 84, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xiv) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 85, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xv) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 65, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xvi) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 72, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xvii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 74, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xviii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 75, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xix) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 77, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xx) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 78, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxi) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 79, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 80, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxiii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 81, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxiv) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 82, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxv) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 83, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxvi) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 84, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxvii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 72, VL, що включає амінокислотну послідовність за

SEQ ID NO: 60, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxviii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 74, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxix) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 75, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxx) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 77, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxxi) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 78, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxxii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 79, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxxiii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 80, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxxiv) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 81, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxxv) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 82, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxxvi) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 83, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63;

(xxxvii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 84, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63; і

(xxxviii) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, CH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 85, VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60, і CL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63.

[8] Виділена нуклеїнова кислота, що кодує антигензв'язувальну молекулу проти CD137 за будь-яким з [1]-[7.1].

[9] Вектор, що містить нуклеїнову кислоту за [8].

[10] Клітина-хазяїн, що містить нуклеїнову кислоту за [8] або вектор за [9].

[11] Спосіб отримання антигензв'язувальної молекули проти CD137, який передбачає культивування клітини-хазяїна за [10] таким чином, що виробляється антигензв'язувальна молекула проти CD137.

[12] Імунокон'югат, що включає антигензв'язувальну молекулу проти CD137 за будь-яким з [1]-[7.1] і цитотоксичний агент.

[13] Фармацевтична композиція, яка містить антигензв'язувальну молекулу проти CD137 за будь-яким з [1]-[7.1] або імунокон'югат за [12] і фармацевтично прийнятний носій.

[14] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[7.1] або імунокон'югат за [12], які призначені для застосування як фармацевтичний засіб.

[14.1] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[7.1], імунокон'югат за [12] або фармацевтична композиція за [13], які призначені для застосування в лікуванні пухлини.

[14.2] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, імунокон'югат або фармацевтична композиція за [14.1], де пухлина являє собою тверду пухлину, інфільтровану В-клітиною, дендритною клітиною, природною клітиною-кілером, макрофагом та/або CD8-позитивною Т-клітиною.

[14.3] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, імунокон'югат або фармацевтична композиція за [14.1], де пухлина являє собою тверду пухлину, інфільтровану регуляторною Т-клітиною (Treg).

[15] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[7.1], імунокон'югат за [12] або фармацевтична композиція за [13], які призначені для застосування в активації імунної клітини.

[15.1] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, імунокон'югат або фармацевтична композиція за [15], де імунна клітина є В-клітиною, дендритною клітиною, природною клітиною-кілером, макрофагом та/або Т-клітиною.

[15.2] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[7.1] або фармацевтична композиція за [13], які призначені для активації імунної клітини в пухлинній тканині.

[15.3] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 або фармацевтична композиція за [15.2], де імунна клітина є В-клітиною, дендритною клітиною, природною клітиною-кілером, макрофагом та/або Т-клітиною.

[15.4] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[7.1], імунокон'югат за [12] або фармацевтична композиція за [13], які призначені для застосування у пошкодженні клітини.

[16] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[7.1], імунокон'югат за [12] або фармацевтична композиція за [13], рівень активації імунітету яких в непухлинній тканині нижчий, ніж у антигензв'язувальної молекули проти CD137, що не володіє CD137-зв'язувальною активністю, залежною від низькомолекулярної сполуки.

[16.1] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, імунокон'югат або фармацевтична композиція за [16], де непухлинною тканиною є лімфатичний вузол, селезінка та/або печінка.

[16.2] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[7.1] або імунокон'югат за [12], які по суті не зв'язуються з CD137, експресованим у непухлинній тканині.

[16.3] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[7.1] або імунокон'югат за [12], які мають триваліший період напіввиведення в крові, ніж антигензв'язувальна молекула проти CD137, яка не володіє CD137-зв'язувальною активністю, залежною від низькомолекулярної сполуки.

[17] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[7.1], імунокон'югат за [12] або фармацевтична композиція за [13], які мають нижчий рівень побічного ефекту, ніж антигензв'язувальна молекула проти CD137, яка не володіє CD137-зв'язувальною активністю, залежною від низькомолекулярної сполуки.

[17.1] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, імунокон'югат або фармацевтична композиція за [17], де побічним ефектом є збільшення сироваткової аспартатамінотрансферази (АСТ (AST)), підвищення аланінамінотрансферази (АЛТ (ALT)), лихоманка, нудота, гострий гепатит, гепатопатія, спленомегалія, ентерит, гнійне запалення шкіри, зменшення нейтрофілів, зменшення лімфоцитів, зменшення тромбоцитів, експресія трансамінази та/або гіпербілірубінемія.

[18] Антигензв'язувальна молекула проти CD137, яка володіє агоністичною активністю стосовно CD137, залежною від низькомолекулярної сполуки.

[18.1] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [18], де агоністична активність стосовно CD137 у присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[18.2] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [18] або [18.1], де агоністична активність стосовно CD137 у присутності 10 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[18.3] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [18] або [18.1], де агоністична активність стосовно CD137 у присутності 50 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[18.4] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [18] або [18.1], де агоністична активність стосовно CD137 у присутності 250 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[18.5] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [18]-[18.4], де агоністична активність стосовно CD137 оцінюють за кількістю IL-2 та/або IFN-γ, вироблених клітиною, що експресує CD137.

[18.6] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [18.5], де клітина, що експресує CD137, являє собою виділену мононуклеарну клітину периферійної крові людини (PBMC) або Т-клітину, що походить від PBMC людини.

[18.7] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [18]-[18.4], де агоністична активність стосовно CD137 оцінюється за допомогою аналізу з використанням репортерного

гена.

[18.8] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [18], яка проявляє агоністичну активність стосовно CD137 у розчині, який готують таким чином, що кінцева концентрація низькомолекулярної сполуки становить 50 мкМ або більше, і яка по суті не проявляє агоністичну активність стосовно CD137 у розчині, до якого не додана низькомолекулярна сполука.

[18.9] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [18.8], де агоністична активність стосовно CD137 у розчині, який готується таким чином, що кінцева концентрація низькомолекулярної сполуки становить 50 мкМ або більше, і агоністична активність стосовно CD137 у розчині, до якого не додана низькомолекулярна сполука, оцінюється, кожна, за кількістю IL-2, IFN-γ та/або IL-6, виміряних протягом 72 годин після того, як у розчині контактують клітина, що експресує CD137, та антигензв'язувальна молекула проти CD137.

[18.10] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [18.8], де агоністична активність стосовно CD137 у розчині, який готується таким чином, що кінцева концентрація низькомолекулярної сполуки становить 50 мкМ або більше, та агоністична активність стосовно CD137 у розчині, до якого не додана низькомолекулярна сполука, оцінюється, кожна, за сигналом люмінесценції люциферази, який вимірюється протягом 6 годин після контактування Т-клітини, що експресує репортерний конструкт NF-каппаВ-люцифераза і CD137, з антигензв'язувальною молекулою проти CD137.

[18.11] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [18]-[18.10], де низькомолекулярна сполука являє собою аденозинвмісну сполуку.

[18.12] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [18]-[18.11], де низькомолекулярна сполука являє собою АТФ (ATP).

[19] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [1]-[7.1], яка володіє агоністичною активністю стосовно CD137, залежною від низькомолекулярної сполуки.

[19.1] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [19], де агоністична активність стосовно CD137 у присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[19.2] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [19] або [19.1], де агоністична активність стосовно CD137 у присутності 10 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[19.3] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [19] або [19.1], де агоністична активність стосовно CD137 у присутності 50 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[19.4] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [19] або [19.1], де агоністична активність стосовно CD137 у присутності 250 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[19.5] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [19]-[19.4], де агоністична активність стосовно CD137 оцінюється за кількістю IL-2 та/або IFN-γ, вироблених клітиною, що експресує CD137.

[19.6] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [19.5], де CD137-експресуюча клітина являє собою виділену мононуклеарну клітину периферійної крові людини (PBMC) або Т-клітину, що походить від PBMC людини.

[19.7] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [19]-[19.4], де агоністична активність стосовно CD137 оцінюється за допомогою аналізу з використанням репортерного гена.

[19.8] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [19], яка проявляє агоністичну активність стосовно CD137 у розчині, який готують таким чином, що кінцева концентрація низькомолекулярної сполуки становить 50 мкМ або більше, і по суті не проявляє агоністичну активність стосовно CD137 у розчині, до якого не додана низькомолекулярна сполука.

[19.9] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [19.8], де агоністична активність стосовно CD137 у розчині, який готується таким чином, що кінцева концентрація низькомолекулярної сполуки становить 50 мкМ або більше, та агоністична активність стосовно CD137 у розчині, до якого не додана низькомолекулярна сполука, оцінюється, кожна, за кількістю IL-2, IFN-γ та/або IL-6, що вимірюються протягом 72 годин після контактування CD137-експресуючої клітини та антигензв'язувальної молекули проти CD137 в розчині.

[19.10] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за [19.8], де агоністична активність

стосовно CD137 у розчині, який готується таким чином, що кінцева концентрація низькомолекулярної сполуки становить 50 мкМ або більше, і агоністична активність стосовно CD137 у розчині, до якого не додана низькомолекулярна сполука, оцінюється, кожна, за сигналом люмінесценції люциферази, який вимірюється протягом 6 годин після контактування Т-клітини, що експресує репортерний конструкт NF-каппаВ-люцифераза і CD137, з антигензв'язувальною молекулою проти CD137.

[19.11] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [19]-[19.10], де низькомолекулярна сполука являє собою аденозинвмісну сполуку.

[19.12] Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з [19]-[19.11], де низькомолекулярна сполука являє собою АТР.

[20] Агоністична антигензв'язувальна молекула, яка включає змінену ділянку Fc, де змінена ділянка Fc включає щонайменше одну амінокислотну зміну, що призводить до підвищення ізоелектричної точки (pI), як порівняти з ізоелектричною точкою батьківської агоністичної антигензв'язувальної молекули, що включає батьківську ділянку Fc, і де агоністична антигензв'язувальна молекула володіє підвищеною агоністичною активністю, як порівняти з агоністичною активністю батьківської агоністичної антигензв'язувальної молекули.

[20.1] Агоністична антигензв'язувальна молекула за [20], де щонайменше одна амінокислотна зміна являє собою зміну амінокислотного залишку, який може піддаватися впливу на поверхні батьківської ділянки Fc.

[20.2] Агоністичне антигензв'язувальне антитіло за [20] або [20.1], де щонайменше одна амінокислотна зміна являє собою:

(i) заміну щонайменше одного амінокислотного залишку, що має негативний заряд на бічному ланцюзі, в батьківській Fc-ділянці амінокислотним залишком, що не має заряду на бічному ланцюзі,

(ii) заміну щонайменше одного амінокислотного залишку, що не має заряду на бічному ланцюзі, в батьківській Fc-ділянці амінокислотним залишком, що має позитивний заряд на бічному ланцюзі, та/або

(iii) заміну щонайменше одного амінокислотного залишку, що має негативний заряд на бічному ланцюзі, в батьківській Fc-ділянці амінокислотним залишком, що має позитивний заряд на бічному ланцюзі.

[20.3] Агоністична антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [20]-[20.2], де щонайменше одна амінокислотна зміна являє собою комбінацію амінокислотних замін, і де амінокислотні заміни розташовані в позиціях, конформаційно близьких одна до одної.

[20.4] Агоністична антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [20]-[20.3], де зв'язувальна активність зміненої ділянки Fc стосовно рецептора Fcγ істотно не знижена, як порівняти з активністю батьківської ділянки Fc.

[20.5] Агоністична антигензв'язувальна молекула за [20.4], де рецептором Fcγ є FcγRIIb.

[20.6] Агоністична антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [20]-[20.4], де щонайменше одна амінокислотна зміна є щонайменше однією заміною амінокислоти, вибраної з групи, що складається з Q311R, P343R та D413K, згідно з Європейською номенклатурою.

[20.7] Агоністична антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [20]-[20.6], де щонайменше одна амінокислотна зміна являє собою амінокислотну зміну за (i) P343R/D413K, (ii) Q311R/P343R, (iii) P343R, (iv) D413K, (v) Q311R, або (vi) Q311R/D413K, або їх комбінацію, згідно з Європейською номенклатурою.

[20.8] Агоністична антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [20]-[20.7], яка є антигензв'язувальною молекулою проти CD137.

[20.9] Агоністична антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [20]-[20.8], яка є антитілом проти CD137.

[21] Спосіб отримання агоністичної антигензв'язувальної молекули, що включає змінену ділянку Fc, де спосіб передбачає:

здійснення в батьківській Fc щонайменше однієї амінокислотної зміни, що призводить до підвищення ізоелектричної точки (pI), як порівняти з ізоелектричною точкою батьківської агоністичної антигензв'язувальної молекули, що включає батьківську ділянку Fc,

де агоністична активність агоністичної антигензв'язувальної молекули, що включає змінену ділянку Fc, є підвищеною, як порівняти з агоністичною активністю батьківської антигензв'язувальної молекули.

[21.1] Спосіб за [21], де агоністична активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену у присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[21.2] Спосіб за [21] або [21.1], де агоністична активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену в присутності 10 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[21.3] Спосіб за [21] або [21.1], де агоністична активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену в присутності 50 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[21.4] Спосіб за [21] або [21.1], де агоністична активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену в присутності 250 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[21.5] Спосіб за будь-яким з [21]-[21.4], де агоністична активність стосовно антигену оцінюється за кількістю IL-2 та/або IFN-γ, що продукуються клітиною, що експресує антиген.

[21.6] Спосіб за [21.5], де клітина, що експресує антиген, являє собою виділену мононуклеарну клітину периферійної крові людини (PBMC) або Т-клітину, що походить від PBMC людини.

[21.7] Спосіб за будь-яким з [21]-[21.4], де агоністична активність стосовно антигену оцінюється за допомогою аналізу з використанням репортерного гена.

[21.8] Спосіб за будь-яким з [21]-[21.7], який також включає:

(i) отримання вектора експресії, що включає відповідний промотор, функціонально зв'язаний з геном, що кодує агоністичну антигензв'язувальну молекулу, що одержується за способом за будь-яким з [21]-[21.7],

(ii) введення вектора в клітину-хазяїна та культивування клітини-хазяїна для отримання агоністичної антигензв'язувальної молекули, та

(iii) збір агоністичної антигензв'язувальної молекули з культури клітин-хазяїнів.

[21.9] Спосіб за будь-яким з [21]-[21.8], в якому є антигензв'язувальна молекула проти CD137.

[21.10] Спосіб за будь-яким з [21]-[21.9], в якому є антитіло проти CD137.

[21.11] Спосіб за будь-яким з [21.1]-[21.10], в якому низькомолекулярна сполука являє собою аденозинвмісну сполуку.

[21.12] Спосіб за будь-яким з [21.1]-[21.11], в якому низькомолекулярна сполука являє собою ATP.

[22] Спосіб підвищення агоністичної активності агоністичної антигензв'язувальної молекули, яка включає ділянку Fc, де спосіб передбачає здійснення в ділянці Fc щонайменше однієї амінокислотної зміни, що призводить до підвищення ізоелектричної точки (pI), як порівняти з ізоелектричною точкою батьківської агоністичної антигензв'язувальної молекули, що включає батьківську Fc-ділянку.

[22.1] Спосіб за [22], де агоністична активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену в присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[22.2] Спосіб за [22] або [22.1], де агоністична активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену в присутності 10 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[22.3] Спосіб за [22] або [22.1], де агоністична активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену в присутності 50 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[22.4] Спосіб за [22] або [22.1], де агоністична активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену в присутності 250 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[22.5] Спосіб за будь-яким з [22]-[22.4], де агоністична активність стосовно антигену оцінюється за кількістю IL-2 та/або IFN-γ, що продукуються клітиною, що експресує антиген.

[22.6] Спосіб за [22.5], де клітина, що експресує антиген, являє собою виділену мононуклеарну клітину периферійної крові людини (PBMC) або Т-клітину, що походить від PBMC людини.

[22.7] Спосіб за будь-яким з [22]-[22.4], де агоністична активність стосовно антигену

оцінюється за допомогою аналізу з використанням репортерного гена.

[22.8] Спосіб за будь-яким з [22]-[22.7], в якому є антигензв'язувальна молекула проти CD137.

[22.9] Спосіб за будь-яким з [22]-[22.8], в якому є антитіло проти CD137.

[22.10] Спосіб за будь-яким з [22.1]-[22.9], в якому низькомолекулярна сполука являє собою аденозинвмісну сполуку.

[21.11] Спосіб за будь-яким з [22.1]-[22.10], в якому низькомолекулярна сполука являє собою ATP.

[23] Спосіб застосування щонайменше однієї амінокислотної зміни для збільшення агоністичної активності агоністичної антигензв'язувальної молекули, що включає ділянку Fc, де амінокислотна зміна призводить до підвищення ізоелектричної точки (pI), як порівняти з ізоелектричною точкою батьківської агоністичної антигензв'язувальної молекули, що включає батьківську Fc-ділянку.

[23.1] Спосіб за [23], де агоністична активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену в присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[23.2] Спосіб за [23] або [23.1], де агоністична активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену в присутності 10 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[23.3] Спосіб за [23] або [23.1], де агоністична активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену в присутності 50 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[23.4] Спосіб за [23] або [23.1], де агоністична активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену в присутності 250 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує агоністичну активність стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

[23.5] Спосіб за будь-яким з [23]-[23.4], де агоністична активність стосовно антигену оцінюється за кількістю IL-2 та/або IFN-γ, що продукуються клітиною, що експресує антиген.

[23.6] Спосіб за [23.5], де клітина, що експресує антиген, являє собою виділену мононуклеарну клітину периферійної крові людини (PBMC) або Т-клітину, що походить від PBMC людини.

[23.7] Спосіб за будь-яким з [23]-[23.4], в якому агоністична активність стосовно антигену оцінюється за допомогою аналізу з використанням репортерного гена.

[23.8] Спосіб за будь-яким з [23]-[23.7], в якому є антигензв'язувальна молекула проти CD137.

[23.9] Спосіб за будь-яким з [23]-[23.8], в якому є антитіло проти CD137.

[23.10] Спосіб за будь-яким з [23.1]-[23.9], в якому низькомолекулярна сполука являє собою аденозинвмісну сполуку.

[23.11] Спосіб за будь-яким з [23.1]-[23.10], в якому низькомолекулярна сполука являє собою ATP.

[24] Спосіб скринінгу стосовно антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що володіють антигензв'язувальною активністю, залежною від низькомолекулярної сполуки, де спосіб передбачає:

(a) контактування антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули або бібліотеки антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул зі злитою молекулою в присутності низькомолекулярної сполуки, де в злитій молекулі дві або більше одиниць антигену злиті з однією одиницею партнера по злиттю,

(b) розміщення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що зв'язалися з антигеном у злитій молекулі на етапі (a), за відсутності низькомолекулярної сполуки або за наявності низької концентрації низькомолекулярної сполуки, та

(c) виділення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що дисоціювалися на етапі (b).

[24.1] Спосіб за [24], в якому молекула, що є партнером по злиттю, являє собою димерну ділянку Fc.

[24.2] Спосіб за [24.1], в якому Fc-ділянка включає першу Fc-субодиницю і другу Fc-субодиницю, і де одна одиниця антигену злита з кожною з першої та другої субодиниць Fc.

[24.3] Спосіб за [24.1] або [24.2], в якому одна одиниця антигену злита з N-кінцем кожної з

першої та другої субодиниць Fc.

[24.4] Спосіб за будь-яким з [24]-[24.3], в якому бібліотека антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул є фаговою бібліотекою.

[24.5] Спосіб за будь-яким з [24]-[24.4], в якому фаги, включені до фагової бібліотеки, є фагами, що презентують на своїй поверхні два або більше антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул.

[24.6] Спосіб за будь-яким з [24]-[24.5], в якому фаги, включені до фагової бібліотеки, є фагами, що мають дефект у гені pIII, що походить від хелперного фага.

[25] Спосіб скринінгу стосовно антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що володіють антигензв'язувальною активністю, залежною від двох або більше різних низькомолекулярних сполук, де спосіб передбачає:

(a) контактування антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули або бібліотеки антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул з антигеном при присутності першої низькомолекулярної сполуки,

(b) розміщення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що зв'язалися з антигеном на етапі (a), за відсутності першої низькомолекулярної сполуки або за наявності низької концентрації першої низькомолекулярної сполуки,

(c) виділення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що дисоціювалися на етапі (b),

(d) контактування антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, виділених на етапі (c), з антигеном у присутності другої низькомолекулярної сполуки,

(e) розміщення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що зв'язалися з антигеном на етапі (d), за відсутності другої низькомолекулярної сполуки або за наявності низької концентрації другої низькомолекулярної сполуки, та

(f) виділення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що дисоціювалися на етапі (e),

де спосіб не передбачає між етапами (c) і (d) ампліфікації гена, що кодує антигензв'язувальний домен або антигензв'язувальну молекулу, виділених на етапі (c).

[25.1] Спосіб за [25], де бібліотека антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул є фаговою бібліотекою.

[26] Спосіб скринінгу стосовно антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що володіють антигензв'язувальною активністю, залежною від низькомолекулярної сполуки, де спосіб передбачає:

(a) контактування наївної бібліотеки антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул з антигеном у присутності низькомолекулярної сполуки,

(b) розміщення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що зв'язалися з антигеном на етапі (a), за відсутності низькомолекулярної сполуки або за наявності низької концентрації низькомолекулярної сполуки, та

(c) виділення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що дисоціювалися на етапі (b),

де наївна бібліотека є фаговою бібліотекою, що включає фаги, що презентують на своїй поверхні два або більше антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул.

[27] Спосіб скринінгу стосовно антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що володіють антигензв'язувальною активністю, залежною від низькомолекулярної сполуки, де спосіб передбачає:

(a) контактування бібліотеки антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул з антигеном у присутності низькомолекулярної сполуки,

(b) розміщення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що зв'язалися з антигеном на етапі (a), за відсутності низькомолекулярної сполуки або за наявності низької концентрації низькомолекулярної сполуки, та

(c) виділення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що дисоціювалися на етапі (b),

де бібліотека - це бібліотека, що включає фаги, що мають дефект у гені pIII, що походить від хелперного фага.

[28] Спосіб скринінгу стосовно антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що володіють антигензв'язувальною активністю, залежною від низькомолекулярної сполуки, де спосіб передбачає:

(a) контактування бібліотеки антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул з антигеном у присутності низькомолекулярної сполуки,

(b) розміщення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що

зв'язалися з антигеном на етапі (a), за відсутності низькомолекулярної сполуки або за наявності низької концентрації низькомолекулярної сполуки, та

(c) виділення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що дисоціювалися на етапі (b),

де бібліотека - це бібліотека, що включає фаги, отримані шляхом збільшення експресії антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули низькомолекулярною добавкою, що підвищує рівень експресії від промотору, що регулює експресію антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули.

[28.1] Спосіб скринінгу за [28], в якому низькомолекулярною добавкою є ізопропіл-β-тіогалактопіранозид або арабіноза.

[28.2] Спосіб за будь-яким з [24]-[28.1], де низькомолекулярна сполука являє собою аденозинвмісну сполуку.

[28.3] Спосіб за будь-яким з [24]-[28.2], де низькомолекулярна сполука являє собою ATP.

[29] Антигензв'язувальна молекула, яка володіє антигензв'язувальною активністю, залежною від концентрації сполуки, що є специфічною для пухлинної тканини, де антигензв'язувальна активність у присутності 100 мкМ сполуки вдвічі або більше перевищує антигензв'язувальну активність за відсутності цієї сполуки.

[29.1] Антигензв'язувальна молекула за [29], де значення KD у присутності 100 мкМ сполуки становить 5×10^{-7} М або менше.

[29.2] Антигензв'язувальна молекула за [29] або [29.1], де значення KD за відсутності сполуки становить 1×10^{-6} М або більше.

[29.3] Антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [29]-[29.2], яка володіє нейтралізуючою активністю стосовно антигену.

[29.4] Антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [29]-[29.3], яка володіє цитотоксичною активністю стосовно клітини, що експресує антиген.

[29.5] Антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [29]-[29.4], де антиген являє собою антиген, експресований або секретований будь-якою пухлинною клітиною, імунною клітиною та стромальною клітиною в пухлинній тканині.

[29.6] Антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [29]-[29.5], де сполука є аденозинвмісною сполукою.

[29.7] Антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [29]-[29.6], яка включає ділянку Fc.

[29.8] Антигензв'язувальна молекула за [29.7], де ділянка Fc являє собою мутовану ділянку Fc, що має амінокислотну зміну, де мутована ділянка Fc має підвищену зв'язувальну активність стосовно щонайменше одного рецептора Fcγ, вибраного з групи, що складається з FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb і FcγRIIIa, як порівняти з ділянкою Fc дикого типу.

[29.9] Антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [29]-[29.8], де антигензв'язувальна молекула являє собою антитіло або фрагмент антитіла.

[30] Фармацевтична композиція, яка містить антигензв'язувальну молекулу за будь-яким з [29]-[29.9] та фармацевтично прийнятний носій.

[30.1] Фармацевтична композиція за [30], яка призначена для використання у лікуванні пухлини.

[30.2] Фармацевтична композиція за [30.1], яка має нижчу цитотоксичну активність у непухлинній тканині, ніж фармацевтична композиція, яка містить контрольну антигензв'язувальну молекулу.

[30.3] Фармацевтична композиція за [30.1] або [30.2], яка має нижчий рівень побічних ефектів, ніж фармацевтична композиція, яка містить контрольну антигензв'язувальну молекулу.

[30.4] Фармацевтична композиція за [30.2] або [30.3], де контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антигензв'язувальну молекулу, яка не має антигензв'язувальної активності, залежної від концентрації сполуки, специфічної для пухлинної тканини.

[31] Спосіб отримання антигензв'язувальної молекули для використання у лікуванні пухлини, де спосіб передбачає етап вибору антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої в присутності 100 мкМ сполуки, що є специфічною для пухлинної тканини, вдвічі або більше перевищує антигензв'язувальну активність за відсутності сполуки.

[32] Спосіб одержання фармацевтичної композиції для використання у лікуванні пухлини, де спосіб передбачає етап змішування антигензв'язувальної молекули за будь-яким з [29]-[29.9] з фармацевтично прийнятним носієм.

[33] Антигензв'язувальна молекула, яка володіє антигензв'язувальною активністю, залежною від концентрації сполуки, що є специфічною для тканини-мішені, де антигензв'язувальна активність у присутності 1 мкМ цієї сполуки є вдвічі або більше нижчою за антигензв'язувальну активність у присутності достатньої кількості сполуки.

[33.1] Антигензв'язувальна молекула за [33], де значення KD у присутності 1 мкМ сполуки становить $2x10^{-7}$ М або більше.

[33.2] Антигензв'язувальна молекула за [33] або [33.1], де значення KD у присутності достатньої кількості сполуки становить $1 x 10^{-7}$ М або менше.

[33.3] Антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [33]-[33.2], де сполука являє собою сполуку, що є специфічною для пухлинної тканини.

[33.4] Антигензв'язувальна молекула за [33.3], де сполука являє собою аденозинвмісну сполуку.

[33.5] Антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [33]-[33.4], яка має вищу утримувальну здатність у плазмі та/або має нижчу здатність до накопичення антигену в плазмі, ніж контрольна антигензв'язувальна молекула.

[33.6] Антигензв'язувальна молекула за [33.5], де контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антигензв'язувальну молекулу, яка не володіє антигензв'язувальною активністю, залежною від концентрації сполуки, що є специфічною для тканини-мішені.

[33.7] Антигензв'язувальна молекула за будь-яким з [33]-[33.6], де антигензв'язувальна молекула являє собою антитіло або фрагмент антитіла.

[34] Фармацевтична композиція, яка містить антигензв'язувальну молекулу за будь-яким з [33]-[33.7] та фармацевтично прийнятний носій.

[35] Спосіб отримання антигензв'язувальної молекули, яка має вищу утримувальну властивість в плазмі та/або меншу здатність накопичення антигену в плазмі, ніж контрольна антигензв'язувальна молекула, при цьому спосіб передбачає етапи: (a) отримання антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої зростає із збільшенням концентрації сполуки, що є специфічною для тканини-мішені, та (b) вимірювання утримувальної властивості в плазмі та/або здатності накопичення антигену в плазмі антигензв'язувальної молекули, отриманої в (a).

[35.1] Спосіб за [35], який передбачає етап вибору антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої в присутності 1 мкМ сполуки, що є специфічною для тканини-міщені, є вдвічі або більше нижчою за антигензв'язувальну активність у присутності достатньої кількості сполуки.

[35.2] Спосіб за [35] або [35.1], де контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антигензв'язувальну молекулу, яка не володіє антигензв'язувальною активністю, залежною від концентрації сполуки, що є специфічною для тканини-мішені.

[36] Спосіб отримання фармацевтичної композиції, який передбачає етап змішування антигензв'язувальної молекули за будь-яким з [33]-[33.7] з фармацевтично прийнятним носієм.

[37] Спосіб вимірювання концентрації ATP у розчині, який передбачає етапи: (i) контактування клітини Luc/HEK293 з розщепленою люциферазою, що експресує P2Y11, з розчином, та (ii) вимірювання активності люциферази в клітині.

[37.1] Спосіб за [37], який також передбачає етап контактування розчину, що містить субстрат люциферази, з клітиною.

[37.2] Спосіб за [37] або [37.1], де розчин - це міжклітинна рідина всередині тканини in vivo.

[37.3] Спосіб за [37.2], де тканиною є тканина пухлини.

[37.4] Спосіб за [37.2] або [37.3], де етап (i) – це етап трансплантації клітини Luc/HEK293 з розщепленою люциферазою, що експресує P2Y11, в тканину in vivo.

Стислий опис ілюстративного матеріалу

Фіг. 1 - графіки, що показують агоністичну активність різних антитіл проти CD137, що були випробувані з використанням клітин Jurkat у присутності або за відсутності ATP.

Вісь X показує концентрацію антитіла (мкг/мл), а вісь Y показує відносні світлові одиниці.

Фіг. 2 - графіки, що показують агоністичну активність різних антитіл проти CD137, що були випробувані з використанням клітин Jurkat у присутності або за відсутності ADP.

Вісь X показує концентрацію антитіла (мкг/мл), а вісь Y показує відносні світлові одиниці.

Фіг. 3 - діаграма, що показує агоністичну активність різних антитіл проти CD137, що були випробувані з використанням Т-клітин людини у присутності або за відсутності ADPbetaS.

Фіг. 4 - графік, що показує агоністичну активність dBBAT119-P253/dBBAT119L-LamLib (антитіло проти CD137, що налагоджується низькомолекулярною сполукою (далі - "свіч-антитіло проти CD137")) або NS1-P253 (нон-свіч-антитіло проти CD137), що були випробувані з використанням Т-клітин людини у присутності або за відсутності ADPbetaS.

Вісь X показує концентрацію антитіла (мкг/мл), а вісь Y показує кількісний параметр виробництва IFN-γ (нг/мл).

Фіг. 5 - графік, що показує ATP-залежну антигензв'язувальну активність різних антитіл проти CD137 (свіч-антитіло проти CD137 з покращеною зв'язувальною активністю), що були

випробувані за допомогою фагового методу ELISA.

Вісь Y показує співвідношення "сигнал-шум" при поглинанні у присутності/відсутності ATP, а вісь X показує співвідношення "сигнал-шум" при поглинанні у присутності/відсутності антигену.

Фіг. 6 - діаграми, що показують зв'язувальну активність різних варіантів антитіла проти CD137 (dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib) стосовно CD137 людини у присутності або за відсутності ATP.

Верхня діаграма показує зв'язувальну активність стосовно CD137 людини за відсутності ATP, а нижня діаграма показує зв'язувальну активність стосовно CD137 людини у присутності ATP.

Фіг. 7 - графіки, що показують агоністичну активність dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib, dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib, IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0 (контрольне) або NS1-P253 (нон-свіч-антитіло проти CD137), що були випробувані з використанням Т-клітин людини у присутності або за відсутності ADPbetaS.

Графік (A) показує результати тесту за відсутності ADPbetaS, а графік (B) показує результати тесту у присутності ADPbetaS.

Вісь X показує концентрацію антитіла (мкг/мл), а вісь Y показує кількісний параметр виробництва IFN-γ (нг/мл).

Фіг. 8 - графіки, що показують агоністичну активність різних свіч-антитіл проти CD137, що були випробувані з використанням аналізу з використанням репортерного гена 4-1BB Jurkat у присутності або за відсутності ATP.

Графік (A) показує результати тесту за відсутності ATP, а графік (B) показує результати тесту у присутності ATP.

Фіг. 9 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності ATP внаслідок підвищення зв'язувальної активності константних ділянок важкого ланцюга стосовно рецепторів Fcγ, згідно з тестами з використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 10 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності ATP внаслідок підвищення зв'язувальної активності константних ділянок важкого ланцюга стосовно рецепторів Fcγ або підвищення pI константних ділянок важкого ланцюга, згідно з тестами з використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 11 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності або за відсутності ATP внаслідок підвищення зв'язувальної активності константних ділянок важкого ланцюга стосовно рецепторів Fcγ, згідно з тестами з використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 12 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності або за відсутності ATP внаслідок підвищення зв'язувальної активності константних ділянок важкого ланцюга стосовно рецепторів Fcγ, згідно з тестами з використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 13 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності або за відсутності ATP внаслідок підвищення зв'язувальної активності константних ділянок важкого ланцюга стосовно рецепторів Fcγ, згідно з тестами з використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 14 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності або за відсутності ATP внаслідок підвищення зв'язувальної активності константних ділянок важкого ланцюга стосовно рецепторів Fcγ, згідно з тестами з

використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 15 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності або за відсутності ATP внаслідок підвищення зв'язувальної активності константних ділянок важкого ланцюга стосовно рецепторів Fcγ, згідно з тестами з використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 16 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності або за відсутності ATP внаслідок підвищення pI константних ділянок важкого ланцюга, згідно з тестами з використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 17 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності або за відсутності ATP внаслідок підвищення pI константних ділянок важкого ланцюга, згідно з тестами з використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 18 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності або за відсутності ATP внаслідок підвищення pI константних ділянок важкого ланцюга, згідно з тестами з використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 19 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності або за відсутності ATP внаслідок підвищення pI константних ділянок важкого ланцюга, згідно з тестами з використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 20 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності або за відсутності ATP внаслідок підвищення pI константних ділянок важкого ланцюга, згідно з тестами з використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 21 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності або за відсутності ATP внаслідок підвищення pI константних ділянок важкого ланцюга, згідно з тестами з використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 22 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності або за відсутності ATP внаслідок підвищення pI константних ділянок важкого ланцюга, згідно з тестами з використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 23 - діаграми, що показують підвищення агоністичної активності різних свіч-антитіл проти CD137 у присутності або за відсутності ATP внаслідок підвищення зв'язувальної активності константних ділянок важкого ланцюга стосовно рецепторів Fcγ, згідно з тестами з використанням мононуклеарних клітин периферійної крові.

Діаграма (A) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IL-2 як показника, а діаграма (B) показує агоністичну активність, визначену з використанням кількісного параметра виробництва IFN-γ як показника.

Фіг. 24 - графік, що показує концентрацію в плазмі різних свіч-антитіл та нон-свіч-антитіл проти CD137, що були випробувані з використанням миші з нокіном CD137 людини.

Всі Fc є від mIgG1.

Фіг. 25 - графік, що показує концентрацію в плазмі різних свіч-антитіл та нон-свіч-антитіл проти CD137, що були випробувані з використанням миші з нокіном CD137 людини.

Всі Fc є від MB110.

Фіг. 26 - графік, що показує концентрацію в плазмі різних свіч-антитіл та нон-свіч-антитіл проти CD137, що були випробувані з використанням миші з нокіном CD137 людини.

Всі Fc є від MB492.

Фіг. 27 - графік, що показує протипухлинний ефект A375-mIgG1/B167-ml0r у мишачої моделі, якій трансплантували клітини MC38.

Кожна точка показує середнє значення об'єму пухлин у групі (n=5).

Фіг. 28 - діаграми, що показують вагу органів мишачої моделі, якій трансплантували клітини MC38, після введення антитіл (NO1-mIgG1 або A375-mIgG1/B167-ml0r).

Діаграма (A) показує вагу лімфатичного вузла, а діаграма (B) показує вагу селезінки.

Фіг. 29 - діаграми, що показують ступінь активації Т-клітин в лімфатичних вузлах мишачої моделі, якій трансплантували клітини MC38, після введення NO1-mIgG1 або A375-mIgG1/B167-ml0r.

Діаграма (A) показує відсоток PD-1-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин, діаграма (B) показує відсоток ICOS-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин, а діаграма (C) показує відсоток гранзим B-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин.

Фіг. 30 - діаграми, що показують ступінь активації Т-клітин в селезінці мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NO1-mIgG1 або A375-mIgG1/B167-ml0r.

Діаграма (A) показує відсоток PD-1-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин, діаграма (B) показує відсоток ICOS-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин, а діаграма (C) показує відсоток гранзим B-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин.

Фіг. 31 - діаграми, що показують ступінь активації Т-клітин в печінці мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NO1-mIgG1 або A375-mIgG1/B167-ml0r.

Діаграма (A) показує відсоток PD-1-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин, а діаграма (B) показує відсоток гранзим B-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин.

Фіг. 32 - графік, що показує протипухлинний ефект A356-MB110/B040-ml0r у мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38.

Кожна точка показує середнє значення об'єму пухлин у групі (n=5).

Фіг. 33 - діаграми, що показують вагу органів мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NS2-MB110 або A356-MB110/B040-ml0r.

Діаграма (A) показує вагу лімфатичного вузла, а діаграма (B) показує вагу селезінки.

Фіг. 34 - діаграми, що показують ступінь активації Т-клітин в печінці мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NS2-MB110 або A356-MB110/B040-ml0r.

Діаграма (A) показує відсоток PD-1-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин, а діаграма (B) показує відсоток ICOS-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин.

Фіг. 35 - графік, що показує протипухлинний ефект A372-mIgG1/B040-ml0r у мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38.

Кожна точка показує середнє значення об'єму пухлин у групі (n=5).

Фіг. 36 показує кількість клітин лімфатичного вузла (діаграма (A)) та вагу селезінки (діаграма (B)) у мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення A372-mIgG1/B040-ml0r.

Фіг. 37 - діаграма, що показує ступінь активації Т-клітин в печінці мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення A372-mIgG1/B040-ml0r (відсоток гранзим B-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин).

Фіг. 38 - графік, що показує протипухлинний ефект A372-MB110/B040-ml0r у мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38.

Кожна точка показує середнє значення об'єму пухлин у групі (n=5).

Фіг. 39 - діаграми, що показують вагу органів мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NS2-MB110 або A372-MB110/B040-ml0r.

Діаграма (A) показує вагу лімфатичного вузла, а діаграма (B) показує вагу селезінки.

Фіг. 40 - діаграма, що показує ступінь активації Т-клітин в печінці мишачої моделі, якій ввели клітинну лінію MC38, після введення NS2-MB110 або A372-MB110/B040-ml0r (відсоток PD-1-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин).

Фіг. 41 - графік, що показує протипухлинний ефект A372-MB492/B040-ml0r у мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38.

Кожна точка показує середнє значення об'єму пухлин у групі (n=5).

Фіг. 42 - діаграми, що показують кількість клітин лімфатичного вузла та вагу селезінки у мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NS1-MB492 або A372-MB492/B040-ml0r.

Діаграма (A) показує кількість клітин лімфатичного вузла, а діаграма (B) показує вагу селезінки.

Фіг. 43 - діаграма, що показує ступінь активації Т-клітин в печінці мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NS1-MB492 або A372-MB492/B040-ml0r (відсоток гранзим B-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин).

Фіг. 44 - графік, що показує протипухлинний ефект A486-MB492/B167-ml0r або A488-MB492/B226-ml0r у мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38.

Кожна точка показує середнє значення об'єму пухлин у групі (n=5).

Фіг. 45 - діаграми, що показують кількість клітин на лімфатичний вузол та вагу селезінки у мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NS1-MB492, A486-MB492/B167-ml0r або A488-MB492/B226-ml0r.

Діаграма (A) показує кількість клітин на лімфатичний вузол, а діаграма (B) показує вагу селезінки.

Фіг. 46 - діаграма, що показує рівень інфільтрації ефекторних клітин в печінці мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NS1-MB492, A486-MB492/B167-ml0r або A488-MB492/B226-ml0r (відсоток CD3-позитивних та CD8-позитивних Т-клітин серед CD45-позитивних Т-клітин).

Фіг. 47 - графік, що показує протипухлинний ефект A489-MB492/B223-ml0r у мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38.

Кожна точка показує середнє значення об'єму пухлин у групі (n=5).

Фіг. 48 - діаграми, що показують кількість клітин лімфатичного вузла та кількість клітин у фракції лімфоцитів селезінки у мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NS1-MB492 або A489-MB492/B223-ml0r.

Діаграма (A) показує кількість клітин лімфатичного вузла, а діаграма (B) показує кількість клітин у фракції лімфоцитів селезінки.

Фіг. 49 - діаграма, що показує ступінь активації Т-клітин в печінці мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NS1-MB492 або A489-MB492/B223-ml0r (відсоток CD8-позитивних Т-клітин серед CD45-позитивних Т-клітин).

Фіг. 50 - графіки, що показують протипухлинний ефект A548-mIgG1/B256-ml0r та A551-mIgG1/B256-ml0r у мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38.

Графік (A) показує протипухлинний ефект A548-mIgG1/B256-ml0r, а графік (B) показує протипухлинний ефект A551-mIgG1/B256-ml0r.

Фіг. 51 - діаграми, що показують вагу органів мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NS1-mIgG1, A548-mIgG1/B256-ml0r або A551-mIgG1/B256-ml0r.

Діаграма (A) показує вагу лімфатичного вузла, а діаграма (B) показує вагу селезінки.

Фіг. 52 - діаграми, що показують ступінь активації Т-клітин в печінці мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NS1-mIgG1, A548-mIgG1/B256-ml0r або A551-mIgG1/B256-ml0r.

Діаграма (A) показує відсоток PD-1-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин, а діаграма (B) показує відсоток гранзим B-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин.

Фіг. 53 - графік, що показує протипухлинний ефект A551-MB110/B379-ml0r у мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38.

Фіг. 54 - діаграми, що показують вагу органів мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NS1-mIgG1 або A551-MB110/B379-ml0r.

Діаграма (A) показує вагу лімфатичного вузла, а діаграма (B) показує вагу селезінки.

Фіг. 55 - діаграми, що показують ступінь активації Т-клітин в селезінці мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NS1-mIgG1 або A551-MB110/B379-ml0r.

Діаграма (A) показує відсоток PD-1-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин, діаграма (B) показує відсоток ICOS-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин, а діаграма (C) показує відсоток гранзим B-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин.

Фіг. 56 - діаграми, що показують ступінь активації Т-клітин в печінці мишачої моделі, якій трансплантували клітинну лінію MC38, після введення NS1-mIgG1 або A551-MB110/B379-ml0r.

Діаграма (A) показує відсоток PD-1-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин, діаграма (B) показує відсоток ICOS-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин, а діаграма (C) показує відсоток гранзим B-позитивних Т-клітин серед CD8-позитивних Т-клітин.

Фіг. 57 - графіки, що показують агоністичну активність різних антитіл проти CD137, що були

випробувані з використанням клітин Jurkat у присутності або за відсутності L-кінуреніну.

Вісь X показує концентрацію антитіла (мкг/мл), а вісь Y показує відносні світлові одиниці.

Фіг. 58 - графіки, що показують агоністичну активність різних антитіл проти CD137, що були випробувані з використанням клітин 4-1BB Jurkat у присутності або за відсутності низькомолекулярної сполуки (ATP або ADP).

Вісь X показує концентрацію антитіла (мкг/мл), а вісь Y показує відносні світлові одиниці.

Фіг. 59 - графік, що показує реакцію на ATP (люмінесценцію люциферину, що залежить від концентрації ATP) клітин Luc/HEK293 з розщепленою люциферазою, що експресують рецептор P2Y11 (далі "P2Y11 split Luc/HEK293"), що продукується для визначення позаклітинних рівнів ATP.

Фіг. 60 - графік, що показує реакцію in vivo на ATP (люмінесценцію люциферину, що залежить від концентрації ATP) клітин P2Y11 split Luc/HEK293, при підшкірній трансплантації миші.

Фіг. 61 - ілюстрація, що показує результати здійснення люмінесцентної візуалізації на мишах при підшкірній трансплантації клітин P2Y11 split Luc/HEK293 і заздалегідь визначених концентраціях ATP і мишу з пухлиною FM3A, якій підшкірно трансплантували клітини P2Y11 split Luc/HEK293. Мітки на черевній частині мишей вказують на виявлену люмінесценцію.

Фіг. 62 - діаграма, що показує залежну від концентрації ATP зв'язувальну активність стосовно hIL6R (значення KD) антитіл проти hIL6R: MRAH-G4T1/MRAL-k0 (контрольне антитіло) та H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1 та H0052-G4T1/L1083-lam1 (усі є свіч-антитілами).

Фіг. 63 - діаграма, що показує залежну від концентрації ADP зв'язувальну активність стосовно hIL6R (значення KD) антитіл проти hIL6R: MRAH-G4T1/MRAL-k0 (контрольне антитіло) та H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1 та H0052-G4T1/L1083-lam1 (усі є свіч-антитілами).

Фіг. 64 - діаграма, що показує залежну від концентрації AMP зв'язувальну активність стосовно hIL6R (значення KD) антитіл проти hIL6R: MRAH-G4T1/MRAL-k0 (контрольне антитіло) та H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1 та H0052-G4T1/L1083-lam1 (усі є свіч-антитілами).

Фіг. 65 - діаграма, що показує залежну від концентрації ATP ADCC-активність антитіл проти hIL6R: MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (контрольне антитіло) та H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0 (усі є свіч-антитілами).

Фіг. 66 - графік, що показує протипухлинну активність in vivo антитіл проти hIL6R: MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (контрольне антитіло) та H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0 (усі є свіч-антитілами). IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 - це негативне контрольне антитіло.

Фіг. 67 - графік, що показує порівняння кінетики в плазмі антитіла проти hIL6R, MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (контрольне антитіло), у нормальних мишей та у hIL6R-трансгенних мишей. Вертикальна вісь графіка показує концентрацію антитіла в плазмі.

Фіг. 68 - графік, що показує порівняння кінетики в плазмі антитіла проти hIL6R, H0002-mFa55/L1058-ml0 (свіч-антитіло), у нормальних мишей та у hIL6R-трансгенних мишей. Вертикальна вісь графіка показує концентрацію антитіла в плазмі.

Фіг. 69 - графік, що показує порівняння кінетики в плазмі антитіла проти hIL6R, H0041-mFa55/L1088-ml0 (свіч-антитіло), у нормальних мишей та у hIL6R-трансгенних мишей. Вертикальна вісь графіка показує концентрацію антитіла в плазмі.

Фіг. 70 - графік, що показує порівняння кінетики в плазмі антитіла проти hIL6R, H0052-mFa55/L1083-ml0 (свіч-антитіло), у нормальних мишей та у hIL6R-трансгенних мишей. Вертикальна вісь графіка показує концентрацію антитіла в плазмі.

Фіг. 71 - графік, що показує накопичення антигенів у hIL6R-трансгенних мишей після введення кожного нон-свіч-антитіла проти hIL6R: MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (контрольне антитіло) та свіч-антитіл проти hIL6R: H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0 (усі є свіч-антитілами). Вертикальна вісь графіка показує концентрацію розчинного hIL6R в плазмі. IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 (на фігурі позначено як KLH-mFa55) було використано як негативне контрольне антитіло.

Фіг. 72 - графік, що показує протипухлинну активність in vivo нон-свіч-антитіла проти hIL6R, MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (контрольне антитіло), та свіч-антитіл проти hIL6R: H0002-mFa55/L1058-ml0 та H0041-mFa55/L1088-ml0 (обидва є свіч-антитілами). IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 являє собою негативне контрольне антитіло.

Фіг. 73 - графік, що показує порівняння кінетики в плазмі нон-свіч-антитіла проти hIL6R, MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (контрольне антитіло), та свіч-антитіл проти hIL6R: H0002-

mFa55/L1058-ml0 та H0041-mFa55/L1088-ml0 (обидва є свіч-антитілами). Вертикальна вісь графіка показує концентрацію антитіла в плазмі.

Фіг. 74 - графік, що показує накопичення антигенів після введення, кожного, нон-свіч-антитіла проти hIL6R, MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (контрольне антитіло), та свіч-антитіл проти hIL6R, H0002-mFa55/L1058-ml0 та H0041-mFa55/L1088-ml0 (обидва є свіч-антитілами). Вертикальна вісь графіка показує концентрацію розчинного hIL6R в плазмі. IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 (на фігурі позначено як KLH-mFa55) було використано як негативне контрольне антитіло.

Фіг. 75 - графік, що показує протипухлинну активність in vivo нон-свіч-антитіла проти hIL6R, MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (контрольне антитіло), та свіч-антитіл проти hIL6R, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0 (обидва є свіч-антитілами). IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 являє собою негативне контрольне антитіло.

Фіг. 76 - графік, що показує порівняння кінетики в плазмі нон-свіч-антитіла проти hIL6R, MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (контрольне антитіло), та свіч-антитіла проти hIL6R, H0052-mFa55/L1083-ml0 (свіч-антитіло). Вертикальна вісь графіка показує концентрацію антитіла в плазмі.

Фіг. 77 - графік, що показує накопичення антигенів після введення, кожного, нон-свіч-антитіла проти hIL6R, MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (контрольне антитіло), та свіч-антитіла проти hIL6R, H0052-mFa55/L1083-ml0 (свіч-антитіло). Вертикальна вісь графіка показує концентрацію розчинного hIL6R в плазмі. IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 (на фігурі позначено як KLH-mFa55) було використано як негативне контрольне антитіло.

Фіг. 78 - графік, що показує залежну від концентрації ATP активність антитіл проти PD1, mPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1 (контрольне антитіло) та H5029-mFa31/L3021-ml0 (свіч-антитіло), пригнічувати зв'язування PD-1/PDL-1.

Фіг. 79 - графік, що показує залежну від концентрації ATP активність антитіл проти PD1, mPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1 (контрольне антитіло) та H5041-mFa31/L3021-ml0 (свіч-антитіло), пригнічувати зв'язування PD-1/PDL-1.

Фіг. 80 - діаграма, що показує залежну від концентрації AMP нейтралізуючу активність in vitro антитіл проти PD1: mPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1 (контрольне антитіло) і H5029-mFa31/L3021-ml0 та H5041-mFa31/L3021-ml0 (обидва є свіч-антитілами).

Фіг. 81 - діаграма, що показує залежну від концентрації ATP нейтралізуючу активність in vitro антитіл проти PD1: mPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1 (контрольне антитіло) і H5029-mFa31/L3021-ml0 та H5041-mFa31/L3021-ml0 (обидва є свіч-антитілами).

Фіг. 82 - графік, що показує протипухлинну активність in vivo антитіл проти PD1, mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1 (контрольне антитіло) та H5041-mFa55/L3023-ml0 (свіч-антитіло). IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1 являє собою негативне контрольне антитіло.

Фіг. 83 - діаграми, що показують активність антитіл проти PD1, mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1 (контрольне антитіло) та H5041-mFa55/L3023-ml0 (свіч-антитіло), видаляти клітини, що експресують PD-1, з (A) пухлини та (B) селезінки. На фігурі "ізотип" означає негативне контрольне антитіло (IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1).

Фіг. 84 - ілюстрація, що показує зв'язування між ATP та фрагментом Fab свіч-антитіла проти hIL6R, H0041L1088. На фігурі ATP показано з використанням кулькострижневої моделі, а амінокислотні залишки, які взаємодіють з ATP, показані з використанням стрижневої моделі. Штрихові лінії позначають водневі зв'язки між антитілом та ATP.

Фіг. 85 - карта, що показує амінокислотну послідовність позаклітинного домену (shIL6R) hIL6R з відміченим епітопом свіч-антитіла проти hIL6R, H0041L1088. На фігурі амінокислотні залишки, затінені сірим кольором, - це залишки епітопу shIL6R, що містять один або більше неводневих атомів, розташованих на відстані 4,2 ангстрема або менше від ATP або Fab антитіла H0041L1088 в кристалічній структурі.

Фіг. 86 - ілюстрація, що показує деталі зв'язування між shIL6R та зв'язаним з ATP фрагментом Fab антитіла H0041L1088. На фігурі важкий ланцюг антитіла зображений чорним кольором, легкий ланцюг - сірим, а shIL6R - білим. На фігурі ATP показано за допомогою кульової моделі, а епітопний залишок домену shIL6R в межах 4,2 ангстрема від антитіла або ATP та паратопний залишок антитіла в межах 4,2 ангстрема від епітопного залишку показані за допомогою стрижньової моделі. Штрихові лінії позначають водневі зв'язки між антитілом та shIL6R. Для уточнення взаємодії з ATP показано лише F298 домену shIL6R за допомогою кульової моделі.

Фіг. 87 - ілюстрація, що показує структуру, де структура з фіг. 86 повернута на 180 градусів (вигляд ззаду).

Фіг. 88 - графік, що показує агоністичну активність різних свіч-антитіл проти CD137, що були

випробувані за допомогою аналізу з використанням репортерного гена 4-1BB Jurkat у присутності ATP.

Фіг. 89 - графік, що показує порівняння кінетики в плазмі кожного зі свіч-антитіл проти CD137: A375-SCF041aPh/B167-Lamlib та A375-MY201aPh/B167-Lamlib. Вертикальна вісь графіка показує концентрацію кожного антитіла в плазмі.

Фіг. 90 - графік, що показує протипухлинний ефект кожного з антитіл A375/B167-SCF041aPh та A375/B167-MY201aPh на мишачій моделі, приготованої шляхом трансплантування клітинної лінії LLC1/OVA/GPC3 мишам hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90.

Кожна точка показує середнє значення об'єму пухлин у групі (n=5).

Фіг. 91 - графік, що показує агоністичну активність різних свіч-антитіл проти CD3, що були випробувані за допомогою аналізу з використанням репортерного гена із застосуванням біопроби активованих Т-клітин (NFAT (ядерний фактор активованих Т-клітин)) у присутності ATP.

Варіанти здійснення винаходу

I. Визначення

Термін "зв'язувальна активність" відноситься до сили загальної суми нековалентних взаємодій між однією або декількома ділянками зв'язування молекули (наприклад, антитіла) та її партнером по зв'язуванню (наприклад, антигеном). У цьому винаході "зв'язувальна активність" не обмежується строго взаємодією 1:1 між членами пари зв'язування (наприклад, антитілом та антигеном). Наприклад, коли члени пари зв'язування відображають одновалентну взаємодію 1:1, тоді зв'язувальну активність зокрема називають дійсною афінністю зв'язування (афінністю). Коли член пари зв'язування здатний як до одновалентного, так і до багатовалентного зв'язування, тоді зв'язувальна активність є сумою сили кожного зв'язування. Зв'язувальна активність молекули X стосовно її партнера Y, як правило, може бути представлена константою дисоціації (KD) або "зв'язувальна кількість аналіту на одиницю кількості ліганду" (у цьому описі винаходу далі може називатися "зв'язувальна кількість"). Фахівцям в даній галузі буде зрозуміло, що, як правило, нижче значення константи дисоціації (KD) означає вищу зв'язувальну активність, а вище значення "зв'язувальної кількості аналіту на одиницю кількості ліганду" або "зв'язувальної кількості" означає вищу зв'язувальну активність. Зв'язувальну активність можна виміряти за загальноприйнятими методами, відомими в даній галузі, включаючи описані у цьому описі винаходу. Конкретні ілюстративні та наведені як приклади варіанти здійснення вимірювання зв'язувальної кількості описані нижче.

Антигензв'язувальна молекула або антитіло зі "зрілою зв'язувальною активністю" або антигензв'язувальна молекула або антитіло з "посиленою (підвищеною) зв'язувальною активністю" відноситься до антитіла з одним або декількома змінами в одній або декількох гіперваріабельних ділянках (HVR), як порівняти з батьківською антигензв'язувальною молекулою або батьківським антитілом, які не мають таких змін, а саме змін, що призводять до поліпшення зв'язувальної активності антигензв'язувальної молекули або антитіла стосовно антигену.

Терміни "антигензв'язувальна молекула проти CD137" або "антитіло проти CD137" і "антигензв'язувальна молекула, яка зв'язується з CD137" або "антитіло, яке зв'язується з CD137", відносяться до антигензв'язувальної молекули або антитіла, які є здатними зв'язуватися з CD137 з достатньою зв'язувальною активністю, такою що антигензв'язувальна молекула або антитіло є корисними як діагностичний та/або терапевтичний засіб для націлювання на CD137. У деяких варіантах здійснення антитіло проти CD137 зв'язується з епітопом CD137, який є консервативним серед CD137 від різних осіб.

Термін антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 "що володіють зв'язувальною активністю стосовно CD137, яка залежить від низькомолекулярної сполуки" означає антигензв'язувальну молекулу або антитіло, які виявляють вищу зв'язувальну активність стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки, як порівняти зі зв'язувальною активністю стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки. В одному варіанті здійснення "присутність низькомолекулярної сполуки" відноситься до стану, коли низькомолекулярна сполука присутня в концентрації 10 мкМ або більше, 50 мкМ або більше, 100 мкМ або більше, 150 мкМ або більше, 200 мкМ або більше або 250 мкМ або більше. В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла до неспорідненого білка, який не є CD137, у присутності низькомолекулярної сполуки становить менше приблизно 10 % зв'язування антигензв'язувальної молекули або антитіла стосовно CD137, при вимірянні, наприклад, за допомогою радіоімуноаналізу (RIA) або поверхневого плазмонного резонансу (SPR). У певних варіантах здійснення у присутності низькомолекулярної сполуки антигензв'язувальна молекула

проти CD137 або антитіло проти CD137 мають константу дисоціації (KD) 1 мкМ або менше, 100 нМ або менше, 10 нМ або менше, 1 нМ або менше, 0,1 нМ або менше, 0,01 нМ або менше або 0,001 нМ або менше (наприклад, 10^{-6} М або менше, 10^{-7} М або менше, 10^{-8} М або менше, 10^{-9} М або менше, 10^{-10} М або менше, наприклад, від 10^{-6} М до 10^{-10} М, від 10^{-7} М до 10^{-9} М, наприклад, від 10^{-7} М до 10^{-8} М).

У цьому описі винаходу термін "антигензв'язувальна молекула" використовується в самому широкому розумінні і стосується молекули, яка специфічно зв'язується з антигенною детермінантою. В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула являє собою антитіло, фрагмент антитіла або похідне антитіла.

"Агоністична антигензв'язувальна молекула" або "агоністичне антитіло", як застосовується в даному описі, є антигензв'язувальною молекулою або антитілом, які суттєво індукують або посилюють біологічну активність антигену, з яким вони зв'язуються (наприклад, CD137 і CD3).

Отже, якщо антигеном є, наприклад, CD137, така антигензв'язувальна молекула або антитіло, що мають агоністичну дію, називаються "CD137-агоністичною антигензв'язувальною молекулою" або "CD137-агоністичним антитілом", відповідно. Таким же чином, якщо антигеном є, наприклад, CD3, така антигензв'язувальна молекула або антитіло, що мають агоністичну дію, називаються "CD3-агоністичною антигензв'язувальною молекулою" або "CD3-агоністичним антитілом", відповідно.

Термін "антитіло" в даному описі використовується в найширшому сенсі і охоплює різні структури антитіл, включаючи, але не обмежуючись ними, моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) та фрагменти антитіл доти, поки вони виявляють бажану антигензв'язувальну активність.

"Фрагмент антитіла" відноситься до молекули, відмінної від інтактного антитіла, яка містить частину інтактного антитіла, яка зв'язується з антигеном, з яким зв'язується інтактне антитіло. Приклади фрагментів антитіл включають, але не обмежуються ними, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; діатіла; лінійні антитіла; одноланцюгові молекули антитіл (наприклад, scFv); а також мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.

"Антигензв'язувальна молекула, яка зв'язується з тим же самим епітопом", або "антитіло, що зв'язується з тим же самим епітопом", що й контрольна антигензв'язувальна молекула або контрольне антитіло, відносяться до антитіла або антигензв'язувальної молекули, які блокують зв'язування контрольного антитіла або контрольної антигензв'язувальної молекули з їх антигеном у конкурентному аналізі на 50 % або більше, і навпаки - контрольне антитіло блокує зв'язування антитіла з його антигеном у конкурентному аналізі на 50 % або більше. У цьому описі винаходу наведено приклад конкурентного аналізу. В одному варіанті здійснення у тому випадку, коли контрольна антигензв'язувальна молекула або контрольне антитіло виявляють антигензв'язувальну активність залежним від низькомолекулярної сполуки чином, тоді конкурентний аналіз проводять у присутності низькомолекулярної сполуки.

Термін "химерне" антитіло відноситься до антитіла, у якому частина важкого та/або легкого ланцюга походить від певного джерела або виду, тоді як решта важкого та/або легкого ланцюга походить від іншого джерела або виду.

"Клас" антитіла відноситься до типу константного домену або константної ділянки, якими володіє їх важкий ланцюг. Існує п'ять основних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG та IgM, і декілька з них можна додатково поділити на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 і IgA_2. Константні домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам імуноглобулінів, називаються альфа, дельта, епсилон, гамма та мю, відповідно.

"Ефекторні функції" відносяться до тих видів біологічної активності, які притаманні Fc-ділянці антитіла, які варіюються залежно від ізотипу антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіл включають: зв'язування C1q та комплементзалежну цитотоксичність (CDC); зв'язування з рецептором Fc; антитілозалежну клітинноопосередковану цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; даун-регуляцію рецепторів клітинної поверхні (наприклад, рецепторів B-клітин) і активацію B-клітин.

"Цитотоксичність" відноситься до активності, яка пригнічує або запобігає клітинній функції та/або викликає загибель або руйнування клітин. Цитотоксичність може бути, наприклад, антитілозалежною клітинноопосередкованою цитотоксичною активністю (ADCC), комплементзалежною цитотоксичною активністю (CDC) та цитотоксичністю, спричиненою T-клітинами; і може бути цитотоксичністю, спричиненою цитотоксичними агентами (наприклад, радіоізотопами та хіміотерапевтичними агентами), такими як імунокон'югати.

Термін "Fc-ділянка (ділянка Fc)" у цьому описі винаходу використовується для визначення C-кінцевої ділянки важкого ланцюга імуноглобуліну, яка містить принаймні частину константної ділянки. Термін включає ділянки Fc нативної послідовності та варіантні ділянки Fc. В одному

варіанті здійснення Fc-ділянка важкого ланцюга IgG людини простягається від Cys226 або від Pro230 до карбоксильного кінця важкого ланцюга. Проте С-кінцевий лізин (Lys447) або гліцин-лізин (залишки 446-447) Fc-ділянки можуть бути присутні або можуть бути відсутні. Якщо в цьому описі винаходу не зазначено інше, то нумерація амінокислотних залишків у Fc-ділянці або константній ділянці відповідає системі Європейської номенклатури, яка також називається EU-індексом, як це описано у Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Термін "варіантна Fc-ділянка" в цьому описі винаходу включає амінокислотну послідовність, яка відрізняється від послідовності нативної Fc-ділянки щонайменше однією модифікацією амінокислоти, переважно однією або більше амінокислотною(ими) заміною(ами). Переважно, варіантна Fc-ділянка має щонайменше одну заміну амінокислоти, як порівняти з нативною послідовністю Fc-ділянки або з Fc-ділянкою батьківського поліпептиду, наприклад приблизно від однієї до приблизно десяти амінокислотних замін, і переважно приблизно від однієї до приблизно п'яти амінокислотних замін у нативній послідовності Fc-ділянки або в Fc-ділянці батьківського поліпептиду. Варіантна Fc-ділянка в даному описі переважно матиме принаймні приблизно 80 % гомологію з нативною послідовністю Fc-ділянки та/або з Fc-ділянкою батьківського поліпептиду, і найбільш переважно принаймні приблизно 90 % гомологію з ними, більш переважно принаймні приблизно 95 % гомологію з ними.

У цьому описі винаходу амінокислотні зміни або заміни в межах Fc-ділянки або константної ділянки можуть бути представлені комбінацією системи Європейської номенклатури та амінокислот. Наприклад, S424N означає заміну на позиції 424 за Європейською номенклатурою серину (Ser) на аспарагін (Asn). EU424N означає заміну на позиції 424 за Європейською номенклатурою амінокислоти (будь-якого виду) на аспарагін (Asn).

Термін "антитіло, що містить Fc-ділянку" в цьому описі винаходу відноситься до антитіла, яке включає Fc-ділянку. С-кінцевий лізин (залишок 447 за Європейською номенклатурою) або С-кінцевий гліцин-лізин (залишки 446-447) ділянки Fc можуть бути видалені, наприклад, під час очищення антитіла або шляхом рекомбінантної інженерії стосовно нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло. Відповідно, композиція, що містить антитіло, що має Fc-ділянку згідно з цим винаходом, може включати антитіло з G446-K447, з G446 і без K447, з видаленими усіма G446-K447, або суміш трьох типів антитіл, описаних вище.

Терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" і "повне антитіло" використовуються в цьому описі винаходу як взаємозамінні для зазначення антитіла, яке має структуру, істотно схожу на структуру природного антитіла, або має важкі ланцюги, що включають Fc-ділянку або варіантну Fc-ділянку, як визначено в цьому описі винаходу.

"Антитіло людини" - це таке антитіло, яке має амінокислотну послідовність, яка відповідає послідовності антитіл, продукованих людиною або клітиною людини, або отриманих з джерела, не пов'язаного з людиною, яке використовує репертуари антитіл людини або інші послідовності, що кодують антитіла людини. Це визначення антитіла людини конкретно виключає гуманізоване антитіло, що містить нелюдські антигензв'язувальні залишки.

"Каркасна ділянка" або "FR" відноситься до залишків варіабельного домену, крім залишків гіперваріабельної ділянки (HVR). FR варіабельного домену зазвичай складається з чотирьох FR-доменів: FR1, FR2, FR3 та FR4. Відповідно, послідовності HVR та FR зазвичай відображаються у такій послідовності у VH (або VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

"Акцепторна каркасна ділянка людини" для цілей цього опису винаходу являє собою каркасну ділянку, що включає амінокислотну послідовність каркасної ділянки варіабельного домену легкого ланцюга (VL) або каркасної ділянки варіабельного домену важкого ланцюга (VH), що походять від каркасної ділянки імуноглобуліну людини або консенсусної каркасної ділянки людини, як визначено нижче. Акцепторна каркасна ділянка людини, "що походить від" каркасної ділянки імуноглобуліну людини або консенсусної каркасної ділянки людини, може включати ту ж саму амінокислотну послідовність або може містити зміни амінокислотної послідовності. В деяких варіантах кількість амінокислотних змін становить 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, 7 або менше, 6 або менше, 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше або 2 або менше. В деяких варіантах здійснення акцепторна каркасна ділянка VL людини є ідентичною за своєю послідовністю послідовності каркасної ділянки VL імуноглобуліну людини або послідовності консенсусної каркасної ділянки людини.

"Консенсусна каркасна ділянка людини" - це каркасна ділянка, яка репрезентує амінокислотні залишки, що найбільш часто зустрічаються, у добірці послідовностей каркасних ділянок VL або VH імуноглобуліну людини. Як правило, вибір послідовностей VL або VH імуноглобуліну людини здійснюється з підгрупи послідовностей варіабельного домену. Як правило, підгрупа послідовностей є підгрупою, як у Kabat et al., Sequences of Proteins of

Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. В одному варіанті здійснення для VL підгрупа є підгрупою каппа I, як у Kabat et al., вище. В одному варіанті здійснення для VH підгрупа є підгрупою III, як у Kabat et al., вище.

"Гуманізоване" антитіло відноситься до химерного антитіла, що включає амінокислотні залишки від HVR не людини та амінокислотні залишки від FR людини. У певних варіантах здійснення гуманізоване антитіло буде включати, по суті, усі з щонайменше одного і, як правило, двох варіабельних доменів, в яких усі або по суті усі з HVR (наприклад, CDR) відповідають HVR антитіла не людини, і усі або по суті усі FR відповідають FR антитіла людини. Гуманізоване антитіло необов'язково може включати принаймні частину константної ділянки антитіла, яка походить від антитіла людини. "Гуманізована форма" антитіла, наприклад, антитіло не людини, відноситься до антитіла, яке зазнало гуманізації.

Термін "варіабельна ділянка" або "варіабельний домен" відноситься до домену важкого або легкого ланцюга антитіла, який бере участь у зв'язуванні антитіла з антигеном. Варіабельні домени важкого ланцюга та легкого ланцюга (VH та VL, відповідно) нативного антитіла, як правило, мають подібні структури, причому кожен домен містить чотири консервативні каркасні ділянки (FR) та три гіперваріабельні ділянки (HVR). (Див., наприклад, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) Одного домену VH або VL може бути достатньо для надання антигензв'язувальної специфічності. Крім того, антитіла, які зв'язуються з певним антигеном, можуть бути виділені за допомогою домену VH або VL з антитіла, яке зв'язуються з цим антигеном, щоб здійснити скринінг бібліотеки комплементарних доменів VL або VH, відповідно. Див., наприклад, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).

Термін "гіперваріабельна ділянка" або "HVR", як використовується в цьому описі, відноситься до кожної з ділянок варіабельного домену антитіла, які є гіперваріабельними в послідовності ("ділянки, що визначають комплементарність" або "CDR") та/або утворюють структурно визначені петлі ("гіперваріабельні петлі") та/або включають залишки, що контактують з антигеном ("контакти до антигену"). Як правило, антитіла включають шість HVR: три в VH (H1, H2, H3) і три в VL (L1, L2, L3). Приклади HVR в цьому описі включають:

(a) гіперваріабельні петлі, що виникають на амінокислотних залишках 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

(b) CDR, що виникають на амінокислотних залишках 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) і 95-102 (H3) [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)];

(c) контакти до антигену, що відбуваються на амінокислотних залишках 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) і 93-101 (H3) [MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)]; і

(d) комбінації (a), (b) та/або (c), включаючи амінокислотні залишки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) і 94-102 (H3).

Якщо не вказано інше, залишки HVR та інші залишки у варіабельному домені (наприклад, залишки FR) в цьому описі нумеруються відповідно до Kabat et al., вище. В цьому описі залишки HVR або інші залишки у варіабельному домені (наприклад, залишки FR) та амінокислотні зміни або заміни у таких залишках можуть бути представлені комбінацією системи нумерації Кебота та амінокислотних залишків. Наприклад, N99 означає аспарагін (Asn) у позиції 99 за нумерацією Кебота, а N99A означає заміну в позиції 99 за нумерацією Кебота аспарагіну (Asn) на аланін (Ala).

"Імунокон'югат" - це антитіло, кон'юговане з однією або декількома гетерологічними молекулами, включаючи, але не обмежуючись ним, цитотоксичний агент.

Термін "цитотоксичний агент", як використовується в даному описі, відноситься до речовини, яка пригнічує або запобігає клітинній функції та/або викликає загибель або руйнування клітин. Цитотоксичні агенти включають, але не обмежуються ними, радіоактивні ізотопи (наприклад, ^{211}At, ^{131}I, ^{125}I, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{212}Bi, ^{32}P, ^{212}Pb і радіоактивні ізотопи Lu); хіміотерапевтичні засоби або препарати (наприклад, метотрексат, адріаміцин, алкалоїди барвінку (вінкристин, вінбластин, етопозид), доксорубіцин, мелфалан, мітоміцин C, хлорамбуцил, даунорубіцин або інші інтеркалюючі агенти); засоби, що пригнічують ріст; ферменти та їх фрагменти, такі як нуклеолітичні ферменти; антибіотики; токсини, такі як низькомолекулярні токсини або ферментативно активні токсини бактеріального, грибкового, рослинного або тваринного походження, включаючи їх фрагменти та/або їх варіанти; і різні протипухлинні або протиракові агенти, розкриті нижче.

"Виділене" антитіло - це антитіло, яке було відокремлено від компонента його природного середовища. У деяких варіантах здійснення антитіло очищують до чистоти понад 95 % або

99 %, як це визначається, наприклад, електрофоретичним шляхом (наприклад, SDS-PAGE, ізоелектричним фокусуванням (IEF), капілярним електрофорезом) або хроматографічним шляхом (наприклад, іонообмінною або HPLC зі зворотною фазою). Огляд методів оцінки чистоти антитіл див., наприклад, [Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)].

Термін "виділена" нуклеїнова кислота відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, яка була відокремлена від компонента її природного середовища. Виділена нуклеїнова кислота включає молекулу нуклеїнової кислоти, що міститься в клітинах, які зазвичай включають молекулу нуклеїнової кислоти, але молекула нуклеїнової кислоти присутня екстрахромосомно або в такому місці хромосоми, яке відрізняється від її природного місця розташування в хромосомі.

Термін "вектор", як використовується в даному описі, відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, здатної розмножувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона пов'язана. Цей термін включає вектор як структуру нуклеїнової кислоти, що самореплікується, а також вектор, включений в геном клітини-хазяїна, в яку він був введений. Певні вектори здатні направляти експресію нуклеїнових кислот, з якими вони оперативно пов'язані. Такі вектори в даному описі винаходу називаються "векторами експресії".

Вираз "кодована нуклеїнова кислота, що кодує антигензв'язувальну молекулу проти CD137", відноситься до однієї або декількох молекул нуклеїнової кислоти, що кодує(ють) поліпептид(и), що утворює(ють) антигензв'язувальну молекулу. Вираз "виділена нуклеїнова кислота, що кодує антитіло проти CD137", відноситься до однієї або декількох молекул нуклеїнових кислот, що кодує(ють) важкі та легкі ланцюги антитіл (або їх фрагменти), включаючи таку(і) молекулу(и) нуклеїнової(их) кислоти(кислот) в одному векторі або окремих векторах, і така(і) молекула(и) нуклеїнової(их) кислоти(кислот), що знаходиться(яться) в одному або декількох місцях клітини-хазяїна.

Терміни "клітина-хазяїн", "лінія клітин-хазяїнів" та "культура клітин-хазяїнів" використовуються як взаємозамінні і стосуються клітин, у які була введена екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство таких клітин. Клітини-хазяїни включають "трансформанти" і "трансформовані клітини", які включають первинну трансформовану клітину і потомство, що походить від неї, незалежно від кількості пасажів. Потомство може бути не повністю ідентичним батьківській клітині за вмістом нуклеїнової кислоти, але може містити мутації. Сюди включено мутантне потомство, яке має ту ж саму функцію або біологічну активність, що і піддані скринінгу або вибрані первинно трансформованої клітини.

Термін "моноклональне антитіло", як використовується в даному описі, відноситься до антитіла, отриманого з популяції по суті однорідних антитіл, тобто окремі антитіла, що складають популяцію, ідентичні та/або зв'язують один і той же епітоп, за винятком можливих варіантних антитіл, наприклад таких, що містять природно виникаючі мутації або виникаючі під час виробництва препарату моноклонального антитіла, такі варіанти, як правило, присутні в незначних кількостях. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які зазвичай включають різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло препарату моноклонального антитіла спрямоване проти однієї детермінанти антигену. Таким чином, означення "моноклональне" вказує на характер антитіла, отриманого із по сутті однорідної популяції антитіл, і не повинно тлумачитися як таке, що вимагає продукування антитіла яким-небудь конкретним методом. Наприклад, моноклональні антитіла, які будуть використані згідно з цим винаходом, можуть бути виготовлені за допомогою різних методів, включаючи, але не обмежуючись ними, гібридомний метод, методи рекомбінантної ДНК, методи фагового дисплея та методи, що використовують трансгенних тварин, які включають усі або частину локусів імуноглобуліну людини, такі методи та інші приклади методів отримання моноклональних антитіл описані у цьому описі винаходу.

Термін "голе антитіло" відноситься до антитіла, яке не кон'юговане з гетерологічним фрагментом (наприклад, цитотоксичним фрагментом) або радіоміткою. Голе антитіло може бути присутнім у фармацевтичній композиції.

Термін "нативні антитіла" відноситься до природних молекул імуноглобуліну з різною структурою. Наприклад, нативні антитіла IgG - це гетеротетрамерні глікопротеїни у приблизно 150000 дальтон, що складаються з двох однакових легких ланцюгів та двох однакових важких ланцюгів, які пов'язані дисульфідом. Від N- до C-кінця кожний важкий ланцюг має варіабельну ділянку (VH), яку також називають варіабельним доменом важкого ланцюга, за чим розташовані три константні домени (CH1, CH2 та CH3). Подібним чином, від N- до C-кінця, кожний легкий ланцюг має варіабельну ділянку (VL), яку також називають варіабельним доменом легкого ланцюга, за чим розташований константний домен легкого ланцюга (CL). Легкий ланцюг антитіла може бути віднесений до одного з двох типів, що називаються каппа (κ) та лямбда (λ),

на основі амінокислотної послідовності його константного домену.

"Відсоток (%) ідентичності амінокислотної послідовності" щодо контрольної поліпептидної послідовності визначається як відсоток амінокислотних залишків у послідовності-кандидаті, які ідентичні амінокислотним залишкам у контрольній поліпептидній послідовності, після вирівнювання послідовностей і введення проміжків, якщо необхідно, для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовності, і не враховуючи будь-які консервативні заміни як частину ідентичності послідовності. Вирівнювання для цілей визначення відсотка ідентичності амінокислотної послідовності можна досягнути різними способами, що відповідають фаховим знанням у цій галузі техніки, наприклад, за допомогою загальнодоступного комп'ютерного програмного забезпечення, такого як програмне забезпечення BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign (DNASTAR) або GENETYX (зареєстрована торговельна марка) [Genetyx Co., Ltd.]. Фахівці в даній галузі здатні визначити відповідні параметри для вирівнювання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання по всій довжині послідовностей, що порівнюються.

Комп'ютерна програма для порівняння послідовностей ALIGN-2 була створена Genentech, Inc., а вихідний код зареєстрований разом з документацією користувача в Бюро з авторських прав США, Вашингтон, округ Колумбія, 20559, [U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559], де він зареєстрований під реєстраційним номером США TXU510087. Програма ALIGN-2 є загальнодоступною у Genentech, Inc., South San Francisco, California, або може бути скомпільована за допомогою вихідного коду. Програма ALIGN-2 повинна бути складена для використання в операційній системі UNIX, включаючи цифровий UNIX V4.0D.

Усі параметри порівняння послідовностей встановлюються програмою ALIGN-2 і не змінюються. У ситуаціях, коли ALIGN-2 використовується для порівняння амінокислотних послідовностей, % ідентичності амінокислотної послідовності даної амінокислотної послідовності A, з або щодо даної амінокислотної послідовності B (що можна альтернативно сформулювати як дану амінокислотну послідовність A, яка має або містить певний % ідентичності амінокислотної послідовності до, з або щодо даної амінокислотної послідовності B) розраховується наступним чином:

100 помножити на дріб X/Y,

де X - кількість амінокислотних залишків, оцінених як ідентичні програмою вирівнювання послідовностей ALIGN-2 у цьому програмному вирівнюванні A та B, і де Y - це загальна кількість амінокислотних залишків у B. Зрозуміло, коли довжина амінокислотної послідовності A не дорівнює довжині амінокислотної послідовності B, % ідентичності амінокислотної послідовності A відносно B не буде дорівнювати % ідентичності амінокислотної послідовності B відносно A. Якщо не вказано інше, всі % значення ідентичності амінокислотної послідовності, що використовуються в цьому описі винаходу, отримані з використанням комп'ютерної програми ALIGN-2, як це описано в попередньому абзаці.

Термін "фармацевтична композиція" відноситься до препарату, який має таку форму, що дозволяє забезпечити ефективність біологічної активності активного інгредієнта, що міститься в ньому, і який не містить ніяких додаткових компонентів, які є неприпустимо токсичними для суб'єкта, якому препарат буде вводитися.

Термін "фармацевтично прийнятний носій" відноситься до інгредієнта фармацевтичної композиції, крім активного інгредієнта, який є нетоксичним для суб'єкта. Фармацевтично прийнятний носій включає, але не обмежується ними, буфер, допоміжну речовину, стабілізатор або консервант.

Термін "ефективна кількість" агента, наприклад, фармацевтичної композиції, відноситься до кількості, ефективної у дозах та протягом періодів часу, необхідних для досягнення бажаного терапевтичного або профілактичного результату.

"Індивід" або "суб'єкт" - це ссавець. Ссавці включають, але не обмежуючись ними, одомашнених тварин (наприклад, корів, овець, котів, собак та коней), приматів (наприклад, людей та приматів, які не є людьми, таких як мавпи), кроликів та гризунів (наприклад, мишей та щурів). У певних варіантах здійснення індивід або суб'єкт є людиною.

Термін "CD137", як використовується в даному описі, відноситься до будь-якого природного CD137 з будь-якого джерела, що належить до хребетних, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, людина) та гризуни (наприклад, миші та щури), якщо не зазначено інше. Цей термін охоплює "повнорозмірний" необроблений CD137, а також будь-яку форму CD137, яка є результатом процесингу в клітині. Цей термін також охоплює природні варіанти CD137, наприклад, варіанти сплайсингу або алельні варіанти.

Амінокислотна послідовність типового повнорозмірного CD137 людини наведена в SEQ ID NO: 1 (NCBI Reference Sequence: NP_001552.2), а амінокислотна послідовність типової

позаклітинної ділянки CD137 людини наведена в SEQ ID NO: 2. Амінокислотна послідовність типового повнорозмірного CD137 миші наведена в SEQ ID NO: 3 (NCBI Reference Sequence: NP_035742.1), а амінокислотна послідовність типової позаклітинної ділянки CD137 миші наведена в SEQ ID NO: 4. Амінокислотна послідовність типового повнорозмірного CD137 мавпи наведена в SEQ ID NO: 5 (NCBI Reference Sequence: ABY47575.1), а амінокислотна послідовність типової позаклітинної ділянки CD137 мавпи наведена в SEQ ID NO: 6.

CD137 є членом сімейства рецепторів фактора некрозу пухлини (TNF). Його альтернативні назви – це член 9 надродини рецепторів фактора некрозу пухлини (TNFRSF9), 4-1BB та ILA. Окрім його експресії на активованих $CD4^+$ і $CD8^+$ Т-клітинах, CD137 експресується у В-клітинах, дендритних клітинах, природних кілерах (NK) і клітинах NK-T, макрофагах, моноцитах, нейтрофілах, регуляторних Т-клітинах $CD4^+CD25^+$ і ендотеліальних клітинах судин. Також повідомляється про експресію в ракових клітинах [Labiano, et al. Oncoimmunology, vol. 24: e1062967 (2015)]. Природний ліганд CD137, CD137L, є представленим антиген-презентуючими клітинами, такими як В-клітини, моноцити/макрофаги та дендритні клітини (Watts, et al., Annu. Rev. Immunol., vol. 23: p. 23-68 (2005)). Завдяки своїй взаємодії з лігандом, CD137 спричиняє збільшення TCR-індукованої проліферації Т-клітин, вироблення цитокінів, функціональне дозрівання, пригнічення апоптозу та довготривале виживання Т-клітин $CD8^+$ [Nam, et al., Curr. Cancer Drug Targets, vol. 5: p. 357-363 (2005); Watts, et al., Annu. Rev. Immunol., vol. 23: p. 23-68 (2005)].

Терміни "карцинома", "рак" і "раковий" стосуються або описують фізіологічний стан ссавців, який, як правило, характеризується нерегульованим ростом/проліферацією клітин.

Термін "пухлина" відноситься до всіх випадків неопластичного росту і проліферації клітин, будь то злоякісні чи доброякісні, а також до передракових та злоякісних клітин і тканин. Терміни "карцинома", "рак", "злоякісний", "клітинне проліферативне порушення", "проліферативне порушення" і "пухлина" не є взаємовилучальними, як зазначено в цьому описі винаходу.

Терміни "клітинне проліферативне порушення" та "проліферативне порушення" стосуються порушень, які пов'язані з певним ступенем аномальної проліферації клітин. В одному варіанті здійснення клітинним проліферативним порушенням є рак.

Використовуваний у цьому описі винаходу термін "лікування" (та його граматичні варіації, такі як "лікувати" або "здійснювати лікування") відноситься до клінічного втручання з метою зміни природного розвитку захворювання індивідуума, якого лікують, і його можна здійснювати як для профілактики, так і під час проведення курсу клінічної патології. Бажані ефекти лікування включають, але не обмежуючись ними, запобігання виникненню або рецидиву захворювання, пом'якшення симптомів, зменшення будь-яких прямих або непрямих патологічних наслідків захворювання, запобігання метастазуванню, зменшення швидкості прогресування захворювання, покращення або полегшення хворобливого стану та ремісію або покращений прогноз. В деяких варіантах здійснення антитіла за цим винаходом використовуються для затримки розвитку захворювання або для уповільнення прогресування захворювання.

II. Композиції та методи (агоністичні антигензв'язувальні молекули проти CD137)

В одному аспекті даний винахід частково базується на агоністичних антигензв'язувальних молекулах проти CD137 та їх застосуванні. У певних варіантах здійснення пропонуються антитіла, які зв'язуються з CD137. Антитіла в цьому винаході здатні виявляти активуючу дію на імунні клітини, цитотоксичність або протипухлинну активність і, отже, корисні, наприклад, для діагностики або лікування раку.

A. Типові антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137

В одному аспекті цим винаходом пропонуються виділені антигензв'язувальні молекули або антитіла, які зв'язуються з CD137. У певних варіантах здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137

- володіють зв'язувальною активністю стосовно CD137, залежною від низькомолекулярної сполуки;
- зв'язуються з позаклітинною ділянкою CD137;
- утворюють потрійний комплекс разом з низькомолекулярною сполукою та CD137;
- зв'язуються з CD137, що походить від людини, та з CD137, що походить від мавпи;
- є агоністичними стосовно активності CD137;
- проявляють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки;
- мають низьку агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки; та/або
- по суті не виявляють агоністичної активності стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

Зв'язувальна активність антигензв'язувальних молекул або антитіл

У деяких варіантах здійснення зв'язувальна активність антигензв'язувальних молекул або антитіл, передбачених у цьому винаході, у присутності низькомолекулярної сполуки має константу дисоціації (KD) 1 мкМ або менше, 100 нМ або менше, 10 нМ або менше, 1 нМ або менше, 0,1 нМ або менше, 0,01 нМ або менше або 0,001 нМ або менше (наприклад, 10^{-6} М або менше, 10^{-7} М або менше, 10^{-8} М або менше, 10^{-9} М або менше, 10^{-10} М або менше, наприклад від 10^{-6} М до 10^{-10} М, від 10^{-7} М до 10^{-9} М, наприклад від 10^{-7} М до 10^{-8} М).

В одному варіанті здійснення зв'язувальну активність антигензв'язувальної молекули або антитіла вимірюють за допомогою радіоімунологічного аналізу зв'язування з антигеном (RIA) і представляють за допомогою KD. В одному варіанті здійснення RIA проводиться з версією Fab антитіла, що представляє інтерес, та його антигеном. Наприклад, афінітет зв'язування Fab з антигеном у розчині вимірюється шляхом урівноваження Fab з використанням мінімальної концентрації [^{125}I]-міченого антигену в присутності титрувальної серії розведень неміченого антигену, а потім захоплення зв'язаного антигену пластиною, покритою антитілами проти Fab [див., наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)]. Щоб встановити умови для аналізу, багатолункові планшети MICROTITER (зареєстрована торговельна марка) (Thermo Scientific) покривають на ніч розчином 5 мкг/мл захоплюючого антитіла проти Fab (Cappel Labs) у 50 мМ карбонаті натрію (pH 9,6) і потім блокують 2 % (мас./об.) бичачим сироватковим альбуміном в PBS протягом двох-п'яти годин при кімнатній температурі (приблизно 23 градуси С). У неадсорбуючому планшеті (Nunc # 269620) 100 пМ або 26 пМ [^{125}I]-антигену змішують із серійними розведеннями Fab, що представляє інтерес (наприклад, відповідно до оцінки антитіла проти VEGF, Fab-12, у [Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997))]. Потім Fab, що представляє інтерес, інкубують протягом ночі; однак інкубація може тривати протягом тривалішого періоду (наприклад, близько 65 годин), щоб забезпечити досягнення рівноваги. Потім суміші переносять на планшет для захоплення для інкубації при кімнатній температурі (наприклад, протягом однієї години). Потім розчин видаляють і планшет промивають вісім разів 0,1 % полісорбатом 20 (TWEEN-20 (зареєстрована торговельна марка)) у PBS. Коли планшети висохли, додають 150 мікролітрів/лунку сцинтилянту (MICROSCINT-20™; Packard), і планшети підраховують на гамма-лічильнику TOPCOUNT™ (Packard) протягом десяти хвилин. Концентрації кожного Fab, які дають 20 % максимального зв'язування або менше, вибираються для використання в аналізах конкурентного зв'язування.

В одному варіанті здійснення для вимірювання зв'язувальної активності антитіла використовуються методи захоплення лігандів, наприклад, з використанням BIACORE (зареєстрована торговельна марка) T200 або BIACORE (зареєстрована торговельна марка) 4000 (GE Healthcare, Уппсала, Швеція), які базуються на методах аналізу з використанням поверхневого плазмонного резонансу як принципі вимірювання. Програмне забезпечення BIACORE (зареєстрована торговельна марка) Control Software використовується для роботи пристроїв. В одному варіанті здійснення набір для зв'язування амінів (GE Healthcare, Уппсала, Швеція) використовується згідно з інструкціями виробника, щоб дозволити молекулі для захоплення ліганду, наприклад, антитілу проти tag, антитілу проти IgG, білку A тощо зафіксуватися на сенсорному чипі (GE Healthcare, Упсала, Швеція), покритому карбоксиметилдекстраном. Молекула, що захоплює ліганд, розбавляється 10 мМ розчином ацетату натрію при відповідному pH і впорскується з відповідною витратою потоку та протягом відповідного часу ін'єкції. Вимірювання зв'язувальної активності здійснюють із застосуванням буфера, що містить 0,05 % полісорбату 20 (інша назва Tween (зареєстрована торговельна марка)-20), як буфера для вимірювання при витраті потоку 10-30 мікролітрів/хвилину і при температурі вимірювання, переважно при 25 градусах С або 37 градусах С. Для вимірювання, здійснюваного з антитілом, захопленим молекулою, що захоплює ліганд, як лігандом, антитіло вводять, щоб дозволити захопитися цільовій кількості антитіла, а потім впорскують послідовні розведення антигену та/або Fc-рецептора (аналіт), приготованих з використанням буфера для вимірювання. Для вимірювання, здійснюваного з антигеном та/або Fc-рецептором, захопленими молекулою, що захоплює ліганд, як лігандами, вводять антиген та/або Fc-рецептор, щоб дозволити захопитися їх цільовій кількості, а потім впорскують послідовні розведення антитіла (аналіт), приготованого за допомогою буфера для вимірювання.

В одному варіанті здійснення результати вимірювання аналізуються за допомогою програмного забезпечення BIACORE (зареєстрована торговельна марка) Evaluation Software. Розрахунок кінетичних параметрів проводиться шляхом підгонки сенсограм асоціації та дисоціації разом з використанням моделі зв'язування 1:1, та можуть бути розраховані швидкості асоціації (kon або ka), швидкості дисоціації (koff або kd) та рівноважна константа дисоціації (KD). Для випадку слабкої зв'язувальної активності, зокрема, для випадків, коли дисоціація є

швидкою, а кінетичні параметри важко розрахувати, може бути використана модель стаціонарного стану для обчислення рівноважної константи дисоціації (KD). Як додаткові параметри, що стосуються зв'язувальної активності, "кількість зв'язувальної речовини аналіту на одиницю кількості ліганду" може бути розрахована шляхом ділення кількості зв'язувальної речовини аналіту (одиниця резонансну, RU) при конкретній концентрації на кількість захопленого ліганду.

Зв'язувальна активність, що залежить від низькомолекулярної сполуки

В одному аспекті антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 володіють CD137-зв'язувальною активністю, що залежить від низькомолекулярної сполуки. В одному необмежувальному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 володіють вищою зв'язувальною активністю стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки, як порівняти зі зв'язувальною активністю стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки. В іншому варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 володіють вищою зв'язувальною активністю стосовно CD137 за наявності високої концентрації низькомолекулярної сполуки, як порівняти зі зв'язувальною активністю стосовно CD137 за наявності низької концентрації низькомолекулярної сполуки. В одному переважному варіанті здійснення зв'язувальна активність стосовно CD137 антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки є вищою у 2 рази або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 15 разів або більше, 20 разів або більше, 25 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 100 разів або більше, 200 разів або більше, 300 разів або більше, 500 разів або більше, $1x10^3$ разів або більше, $2x10^3$ разів або більше, $3x10^3$ разів або більше, $5x10^3$ разів або більше, $1x10^4$ разів або більше, $2x10^4$ разів або більше, $3x10^4$ разів або більше, $5x10^4$ разів або більше або $1 x 10^5$ разів або більше, як порівняти зі зв'язувальною активністю за відсутності низькомолекулярної сполуки. У іншому переважному варіанті здійснення зв'язувальна активність стосовно CD137 антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки є вищою більше ніж у 2 рази, більше ніж у 3 рази, більше ніж у 5 разів, більше ніж у 10 разів, більше ніж у 15 разів, більше ніж у 20 разів, більше ніж у 25 разів, більше ніж у 30 разів, більше ніж у 50 разів, більше ніж у 100 разів, більше ніж у 200 разів, більше ніж у 300 разів, більше ніж у 500 разів, більше ніж у $1x10^3$ разів, більше ніж у $2x10^3$ разів, більше ніж у $3x10^3$ разів, більше ніж у $5x10^3$ разів, більше ніж у $1x10^4$ разів, більше ніж у $2x10^4$ разів, більше ніж у $3x10^4$ разів, більше ніж у $5x10^4$ разів або більше ніж у $1 x 10^5$ разів, як порівняти зі зв'язувальною активністю за відсутності низькомолекулярної сполуки.

Концентрація низькомолекулярної сполуки може бути будь-якою довільною концентрацією доти, поки виявляється різниця у зв'язувальній активності антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137. В одному варіанті здійснення концентрація низькомолекулярної сполуки "у присутності низькомолекулярної сполуки" та/або "за наявності високої концентрації низькомолекулярної сполуки" становить, наприклад, 100 нМ або більше, 500 нМ або більше, 1 мкМ або більше, 3 мкМ або більше, 5 мкМ або більше, 10 мкМ або більше, 50 мкМ або більше, 100 мкМ або більше, 150 мкМ або більше, 200 мкМ або більше, 250 мкМ або більше, 300 мкМ або більше, 400 мкМ або більше, 500 мкМ або більше або 1 мМ або більше. Іншим чином цю концентрацію можна визначити як кількість, достатню для того, щоб антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 виявляли максимальну зв'язувальну активність. Крім того, в одному варіанті здійснення концентрація низькомолекулярної сполуки "за наявності низької концентрації низькомолекулярної сполуки" може становити, наприклад, 500 мкМ або менше, 250 мкМ або менше, 200 мкМ або менше, 150 мкМ або менше, 100 мкМ або менше, 50 мкМ або менше, 10 мкМ або менше, 1 мкМ або менше, 500 нМ або менше, 100 нМ або менше, 50 нМ або менше, або 10 нМ або 1 нМ або менше. Випадок, коли концентрація низькомолекулярної сполуки дорівнює нулю або концентрація по суті дорівнює нулю, також може бути вибраний як варіант визначення низької концентрації.

У цьому описі винаходу термін "концентрація по суті дорівнює нулю" означає, наприклад, концентрацію, яка є настільки низькою, що її неможливо визначити за сучасною технологією, хоча низькомолекулярна сполука присутня.

В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки в концентрації 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ є вищою у 2 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 15 разів або більше, 16 разів або більше, 17 разів або більше, 18 разів або більше, 19 разів або більше або 20 разів або більше, як порівняти зі зв'язувальною активністю стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки. В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність стосовно

CD137 антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 10 мкМ або більше є вищою у 2 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 15 разів або більше, 16 разів або більше, 17 разів або більше, 18 разів або більше, 19 разів або більше або 20 разів або більше, як порівняти зі зв'язувальною активністю стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки. В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність стосовно CD137 антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 100 мкМ або більше є вищою у 2 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 15 разів або більше, 16 разів або більше, 17 разів або більше, 18 разів або більше, 19 разів або більше або 20 разів або більше, як порівняти зі зв'язувальною активністю стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність (KD) антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 10 мкМ або більше виражається як константа дисоціації (KD) у $9x10^{-7}$ М або менше, $8x10^{-7}$ М або менше, $7x10^{-7}$ М або менше, $6x10^{-7}$ М або менше, $5x10^{-7}$ М або менше або $4x10^{-7}$ М або менше або, переважно, як константа дисоціації (KD) у $5x10^{-7}$ М або менше. У ще одному варіанті здійснення зв'язувальна активність (KD) антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки занадто велика, щоб її можна було розрахувати за допомогою Biacore (слабка зв'язувальна активність) або вона виражається як константа дисоціації (KD) у $1x10^{-7}$ М або більше, $5x10^{-7}$ М або більше, $7x10^{-7}$ М або більше, $8x10^{-7}$ М або більше, $9x10^{-7}$ М або більше, $1x10^{-6}$ М або більше, $2x10^{-6}$ М або більше, $3x10^{-6}$ М або більше або $4x10^{-6}$ М або більше або, переважно, як константа дисоціації (KD) у $1x10^{-6}$ М або більше. В іншому варіанті здійснення зв'язувальна активність (KD) антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 100 мкМ або більше становить $9x10^{-7}$ М або менше, $8x10^{-7}$ М або менше, $7x10^{-7}$ М або менше, $6x10^{-7}$ М або менше, $5x10^{-7}$ М або менше, $4x10^{-7}$ М або менше, $3x10^{-7}$ М або менше, $2x10^{-7}$ М або менше або $1x10^{-7}$ М або менше, або, переважно, константа дисоціації (KD) становить $2x10^{-7}$ М або менше. У наступному варіанті здійснення зв'язувальна активність (KD) антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки занадто велика, щоб її можна було розрахувати за допомогою Biacore (слабка зв'язувальна активність), або вона виражається як константа дисоціації (KD) у $1x10^{-7}$ М або більше, $5x10^{-7}$ М або більше, $7x10^{-7}$ М або більше, $8x10^{-7}$ М або більше, $9x10^{-7}$ М або більше, $1x10^{-6}$ М або більше, $2x10^{-6}$ М або більше, $3x10^{-6}$ М або більше, або $4x10^{-6}$ М або більше або, переважно, як константа дисоціації (KD) у $1x10^{-6}$ М або більше.

В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність (KD) антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 10 мкМ або більше виражається константою дисоціації (KD) у 8×10^{-8} М або менше, а зв'язувальна активність (KD) стосовно CD137 за відсутності сполуки занадто велика, щоб її можна було розрахувати за допомогою Biacore (слабка зв'язувальна активність). В іншому варіанті здійснення зв'язувальна активність (KD) антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 100 мкМ виражається константою дисоціації (KD) у $2x10^{-8}$ М або менше, а зв'язувальна активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки занадто велика, щоб її можна було розрахувати за допомогою Biacore (слабка зв'язувальна активність).

В одному аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, у яких значення відношення [зв'язувальна активність (зв'язувальна кількість) стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 10 мкМ або більше]/[зв'язувальна активність (зв'язувальна кількість) стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки)] таке ж або більше, ніж значення у контрольної антигензв'язувальної молекули проти CD137. В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, у яких значення відношення [зв'язувальна активність (зв'язувальна кількість) стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 100 мкМ або більше]/[зв'язувальна активність (зв'язувальна кількість) стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки)] таке ж або більше, ніж значення у контрольної антигензв'язувальної молекули проти CD137. У будь-якому з вищезазначених аспектів контрольну антигензв'язувальну молекулу проти CD137 можна вибрати з антитіл проти CD137, що включають HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що мають ті ж самі амінокислотні послідовності, що й HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, які містяться у A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167,

A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 або A549/B167, наведених в таблиці 17.

В одному варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула проти CD137 являє собою антитіло, що включає амінокислотну послідовність з A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 або A549/B167, наведених в таблиці 17 як комбінації варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга. У переважному варіанті здійснення контрольною антигензв'язувальною молекулою є антитіло проти CD137, що включає HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що мають ті ж самі амінокислотні послідовності, що й HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що містяться в A375/B167. У ще одному варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула проти CD137 являє собою антитіло проти CD137, що включає A375/B167 як комбінацію варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга. В іншому переважному варіанті здійснення контрольною антигензв'язувальною молекулою є антитіло проти CD137, що включає HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 та HVR-L3, що мають ті ж самі амінокислотні послідовності, що й HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 та HVR-L3, які містяться в A551/B379. У подальшому варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула проти CD137 являє собою антитіло проти CD137, що включає A551/B379 як комбінацію варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга. У переважному варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула включає константні ділянки важкого та легкого ланцюгів людського походження (наприклад, G1T3 (SEQ ID NO: 138) як константну ділянку важкого ланцюга, λ-ланцюг Lamlib людини (SEQ ID NO: 63) як константну ділянку легкого ланцюга).

В одному аспекті цим винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, у яких зв'язувальна активність (зв'язувальна кількість) стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки така ж або нижче, ніж у контрольної антигензв'язувальної молекули проти CD137, а також зв'язувальна активність (зв'язувальна кількість) стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 10 мкМ або більше дорівнює зв'язувальній активності контрольної антигензв'язувальної молекули проти CD137 стосовно CD137 при тих же умовах або є більшою за неї. В іншому аспекті цим винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, у яких зв'язувальна активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки така ж або нижче, ніж у контрольної антигензв'язувальної молекули проти CD137, а також зв'язувальна активність (зв'язувальна кількість) стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 10 мкМ або більше дорівнює зв'язувальній активності (зв'язувальній кількості) контрольної антигензв'язувальної молекули проти CD137 стосовно CD137 при тих же умовах або є більшою за неї. У будь-якому з вищевказаних аспектів контрольну антигензв'язувальну молекулу проти CD137 можна вибрати з антитіл проти CD137, що включають HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що мають ті ж самі амінокислотні послідовності, що й HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що містяться в A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 або A549/B167, наведених в таблиці 17.

В одному варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антитіло проти CD137, що включає амінокислотну послідовність з A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 або A549/B167, наведених в таблиці 17 як комбінації варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга. У іншому переважному варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антитіло проти CD137, що включає HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що мають ті ж самі амінокислотні послідовності, що й HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що містяться в A375/B167. У подальшому варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антитіло проти CD137, що включає A375/B167 як комбінацію варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга. В переважному варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антитіло проти CD137, що включає HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що мають ті ж самі амінокислотні послідовності, що й HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що містяться в A551/B379. У подальшому варіанті здійснення еталонна антигензв'язувальна молекула являє собою антитіло проти CD137, що включає A551/B379 як комбінацію варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга. У переважному варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула включає константні ділянки важкого та легкого

ланцюгів людського походження (наприклад, G1T3 (SEQ ID NO: 138) як константну ділянку важкого ланцюга, λ-ланцюг Lamlib людини (SEQ ID NO: 63) як константну ділянку легкого ланцюга).В одному аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, у яких значення [зв'язувальна активність (KD) стосовно CD137 в присутності низькомолекулярної сполуки при 1 мкМ]/[зв'язувальна активність (KD) стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 10 мкМ або більше] є однаковим або більшим, ніж значення у контрольної антигензв'язувальної молекули. В іншому аспекті цим винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, у яких значення [зв'язувальна активність (KD) стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 1 мкМ]/[зв'язувальна активність (KD) стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 100 мкМ або більше] є однаковим або більшим, ніж значення у контрольної антигензв'язувальної молекули. У будь-якому з вищезазначених аспектів контрольну антигензв'язувальну молекулу можна вибрати з антитіл проти CD137, що включають HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що мають ті ж самі амінокислотні послідовності, що й HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що містяться в A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 або A549/B167, наведених в таблиці 17.

В одному варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антитіло, що включає амінокислотну послідовність з A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 або A549/B167, наведених в таблиці 17 як комбінації варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга. У переважному варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антитіло, що включає HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що мають ті ж самі амінокислотні послідовності, що й HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що містяться в A375/B167. У подальшому варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антитіло, що включає A375/B167 як комбінацію варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга. В іншому варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антитіло, що включає HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що мають ті ж самі амінокислотні послідовності, що й HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що містяться в A551/B379. У подальшому варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антитіло, що включає A551/B379 як комбінацію варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга. У переважному варіанті здійснення еталонна антигензв'язувальна молекула включає константні ділянки важкого та легкого ланцюгів людського походження (наприклад, G1T3 (SEQ ID NO: 138) як константну ділянку важкого ланцюга, λ-ланцюг Lamlib людини (SEQ ID NO: 63) як константну ділянку легкого ланцюга).

В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність антитіла проти CD137 стосовно CD137 у присутності, за відсутності, при високій концентрації та/або при низькій концентрації низькомолекулярної сполуки вимірюється, наприклад, за методом захоплення ліганду за допомогою BIACORE (зареєстрована торговельна марка) T200 із спектроскопією поверхневого плазмонного резонансу як принципу вимірювання.

Деталі типового методу вимірювання зв'язувальної активності антитіла проти CD137 стосовно CD137 описані нижче. В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність антитіла проти CD137 стосовно CD137 оцінюється за допомогою BIACORE (зареєстрована торговельна марка) T200. У переважному варіанті здійснення у цьому аналізі використовується 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$ і 0,05 % Tween 20 як буфер прогону, і аналіз проводиться при 37 °C. В одному варіанті здійснення це вимірювання проводиться після захоплення антитіла як ліганду молекулою, що захоплює ліганд. Зокрема, відповідна кількість (наприклад, приблизно 100 RU, 200 RU, 300 RU, 400 RU або 500 RU) антитіла захоплюється шляхом взаємодії розчину антитіла, приготованого за допомогою буфера прогону, з чипом, приготованим спочатку шляхом іммобілізації Sure Protein A (GE Healthcare) на сенсорному чипі CM3 серії S (Series S Sensor Chip CM3) (GE Healthcare).

У переважному варіанті здійснення захоплюється приблизно від 100 до 500 RU, переважно приблизно від 250 до 400 RU антитіла. Потім зв'язувальна активність стосовно CD137 у присутності та за відсутності низькомолекулярної сполуки оцінюється шляхом взаємодії розчину CD137, приготованого з використанням буфера прогону, до якого додано низькомолекулярну сполуку у цільовій концентрації (наприклад, 1 мкМ, 10 мкМ, 50 мкМ або 100 мкМ), або розчину CD137, приготованого із застосуванням буфера прогону, який не містить низькомолекулярної

сполуки. Хоча концентрацію CD137 у розчині CD137 можна визначити відповідним чином, наприклад, коли hCD137-HisBAP (див. приклад 1-1) використовується як антиген, вимірювання проводять з використанням концентрації антигену у 0 нМ, 15,625 нМ, 62,5 нМ, 250 нМ та 1000 нМ, відповідно. В одному варіанті здійснення константа дисоціації (KD) антитіла проти CD137 до людського CD137 розраховується за допомогою програмного статку Biacore T200 Evaluation Software 2.0. Зокрема, константа швидкості зв'язування ka (л/моль/с) та константа швидкості дисоціації kd (1/с) розраховуються шляхом загального узгодження сенсограми, отриманої шляхом вимірювання, за допомогою моделі зв'язування 1:1 за Ленгмюром. Константа дисоціації KD (моль/л) розраховується за цими величинами.

Подальші приклади методів аналізів для вимірювання зв'язувальної активності антитіла проти CD137 стосовно CD137 будуть докладно описані нижче. Зв'язування антитіл проти CD137 з CD137 людини оцінюють за допомогою Biacore T200. Зв'язування з людським CD137 вимірювали з використанням 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$ і 0,05 % Tween 20 як буфера прогону, і аналіз проводили при 37 °C. Спочатку антитіло у кількості приблизно від 250 до 400 RU захоплюється шляхом взаємодії розчину антитіла, приготованого за допомогою буфера прогону, з чипом, де Sure Protein A (GE Healthcare) був іммобілізований на сенсорному чипі CM3 серії S (Series S Sensor Chip CM3) (GE Healthcare). Потім розчин CD137 людини, приготований з використанням буфера прогону, до якого доданий ATP (АТФ) у цільовій концентрації (наприклад, у 1 мкМ, 10 мкМ, 50 мкМ або 100 мкМ), або розчин CD137 людини, приготований із застосуванням буфера прогону, який не містить ATP, взаємодіють для оцінки зв'язувальної активності стосовно CD137 у присутності та за відсутності ATP. hCD137-HisBAP, отриманий за методом з прикладу 1-1, використовується як CD137 людини, який є антигеном, і вимірювання проводять при концентраціях антигену у 0 нМ, 15,625 нМ, 62,5 нМ, 250 нМ і 1000 нМ, відповідно. Чип регенерують із використанням 25 мМ NaOH та 10 мМ гліцину-HCl (pH 1,5), і вимірювання проводять шляхом багаторазового захоплення антитіл. Константа дисоціації кожного антитіла стосовно CD137 людини розраховується за допомогою програмного статку Biacore T200 Evaluation Software 2.0. Конкретно, константа швидкості зв'язування ka (л/моль/с) та константа швидкості дисоціації kd (1/с) розраховуються шляхом загального узгодження сенсограми, отриманої шляхом вимірювання, за допомогою моделі зв'язування 1:1 за Ленгмюром. Константа дисоціації KD (моль/л) розраховується за цими величинами.

В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність антитіла проти CD137 стосовно CD137 (переважно CD137 людини) також може бути перефразована як "кількість зв'язаного CD137 на одиницю кількості антитіла". Конкретно: за допомогою сенсограм, отриманих за вищезазначеним методом аналізу з використанням BIACORE (зареєстрована торговельна марка) T200, зв'язувальна кількість CD137 стосовно антитіла (RU) ділиться на кількість захопленого антитіла для розрахунку "зв'язувальної кількості CD137 на одиницю кількості антитіла". В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність антитіла проти CD137 стосовно CD137 (переважно CD137 людини) також може бути виміряна за методом, описаним у прикладах 5-3 або 6-2.

Терміни "молекула з низькою масою" та "низькомолекулярна сполука" відносяться до природних хімічних речовин, відмінних від "біополімерів", що містяться в живому організмі, або хімічних речовин, що не зустрічаються в природі. Переважно, це сполука, специфічна для тканини-мішені, або сполука, яка не зустрічається в природі, але не обмежується ними. В одному варіанті здійснення "низькомолекулярна сполука" у цьому винаході є "сполукою, специфічною для ракової тканини" або "метаболітом, специфічним для ракової тканини". У цьому описі винаходу термін "сполука, специфічна для ракової тканини (специфічна для раку сполука)", відноситься до сполуки, яка відмінним чином існує в пухлинній тканині, як порівняти з непухлинною тканиною. Використовуваний у цьому описі винаходу термін "рак" зазвичай використовується для опису злоякісного новоутворення і може бути метастатичним або неметастатичним. Термін "метаболізм" відноситься до хімічних змін, що відбуваються в тканині організму, включаючи "асиміляцію" та "катаболізм". Асиміляція відноситься до біосинтезу або накопичення молекул, а катаболізм до деградації молекул. "Метаболіт" - це проміжна сполука або продукт, що є результатом метаболізму речовин.

Термін "тканина-мішень" означає будь-яку тканину в живому організмі, до якої передбачається доставити антигензв'язувальну молекулу цього винаходу. Тканина-мішень може бути гістологічно розрізнюваною тканиною, такою як різні органи, або патологічно розрізнюваною тканиною, такою як нормальні тканини та хворі тканини. У певних варіантах здійснення тканиною-мішенню є тканина пухлини. На відміну від цього, термін "тканина(и), що не є мішенню(ями)" відноситься до тканини в живому організмі, які не є тканиною-мішенню.

Термін "пухлинна тканина" означає тканину, яка включає щонайменше одну пухлинну

клітину. Як правило, пухлинна тканина складається з популяції пухлинних клітин, що складають основне тіло пухлини (паренхіму) та зв'язувальні тканини та кровоносні судини, що існують між клітинами пухлини та підтримують пухлину (строма). У деяких випадках їх можна чітко розрізнити, але бувають випадки, коли вони змішуються. У деяких випадках існують такі клітини, як імунні клітини, які інфільтрували в тканини пухлини. На відміну від цього, "непухлинна тканина" означає тканину в живому організмі, відмінну від пухлинної(их) тканини(тканин). Нехворі здорові тканини/нормальні тканини є представниками таких непухлинних тканин.

Як необмежувальний варіант здійснення сполуки, специфічної для ракової тканини, або метаболіту, специфічного для ракової тканини, як використовується в цьому описі винаходу, щонайменше одна сполука, вибрана із сполук, докладно описаних нижче, може бути відповідним прикладом. Значення терміну "щонайменше одна сполука" включає не тільки випадок, коли зв'язувальна активність стосовно антигену тих же самих антигензв'язувальних доменів, описаних нижче, залежить від одного типу сполуки, специфічної для ракової тканини, або метаболіту, специфічного для ракової тканини, а й випадок, коли зв'язувальна активність залежить від декількох типів сполук, специфічних для ракової тканини, або метаболітів, специфічних для ракової тканини.

Використовуваний у цьому описі винаходу термін "сполука, специфічна для тканини-мішені" відноситься до сполуки, яка присутня в тканині-мішені іншим чином, ніж в нецільовій тканині. У декількох варіантах здійснення сполука, специфічна для тканини-мішені, може бути сполукою, що визначається якісною специфічністю тканини-мішені, такою як бути присутньою в тканині-мішені, але не в нецільових тканинах, або бути присутньою в нецільовій тканині, але не в тканині-мішені. В іншому варіанті здійснення сполука, специфічна для тканини-мішені, може бути сполукою, що визначається кількісною специфічністю тканини-мішені, такою як бути присутньою у тканині-мішені у концентрації, яка відрізняється (наприклад, є більшою концентрацією або меншою концентрацією), як порівняти з нецільовою тканиною. У конкретному варіанті здійснення сполука, специфічна для тканини-мішені, присутня в тканині-мішені в концентрації, яка є вищою, наприклад, в 1,05 раза або більше, 1,1 раза або більше, 1,15 раза або більше, 1,2 раза або більше, 1,25 раза або більше, 1,3 раза або більше, 1,35 раза або більше, 1,4 раза або більше, 1,45 раза або більше, 1,5 раза або більше, 1,55 раза або більше, 1,6 раза або більше, 1,65 раза або більше, 1,7 раза або більше, 1,75 раза або більше, 1,8 раза або більше, 1,85 раза або більше, 1,9 раза або більше, 1,95 раза або більше, 2 рази або більше, 2,1 раза або більше, 2,2 раза або більше, 2,3 раза або більше, 2,4 раза або більше, 2,5 раза або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 50 разів або більше, 100 разів або більше, 10^3 разів або більше, 10^4 разів або більше, 10^5 разів або більше, 10^6 разів або більше або ще вищою, як порівняти з нецільовою тканиною. В іншому варіанті здійснення сполука, специфічна для тканини-мішені, присутня в тканині-мішені в концентрації, яка є вищою, наприклад, в 1,05 раза або більше, 1,1 раза або більше, 1,15 раза або більше, 1,2 раза або більше, 1,25 раза або більше, 1,3 раза або більше, 1,35 раза або більше, 1,4 раза або більше, 1,45 раза або більше, 1,5 раза або більше, 1,55 раза або більше, 1,6 раза або більше, 1,65 раза або більше, 1,7 раза або більше, 1,75 раза або більше, 1,8 раза або більше, 1,85 раза або більше, 1,9 раза або більше, 1,95 раза або більше, 2 рази або більше, 2,1 раза або більше, 2,2 раза або більше, 2,3 раза або більше, 2,4 раза або більше, 2,5 раза або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 50 разів або більше, 100 разів або більше, 10^3 разів або більше, 10^4 разів або більше, 10^5 разів або більше, 10^6 разів або більше або ще вищою, як порівняти з нецільовою тканиною. У конкретному варіанті здійснення сполука, специфічна для тканини-мішені, як порівняти з нецільовою тканиною, присутня в тканині-мішені в концентрації, яка є статистично значущо вищою або нижчою (тобто, як визначено за допомогою або t-критерію Велча (Welch's t-test), або критерію суми рангів Вілкоксона (rank sum test of Wilcoxon), значення p менше 0,05 та/або значення q менше 0,10). У конкретному варіанті здійснення сполука, специфічна для тканини-мішені, являє собою сполуку, специфічну для пухлини.

У конкретному варіанті здійснення сполука, специфічна для пухлини, є метаболітом, що продукується метаболізмом, специфічним для пухлинної клітини. Метаболіт може бути продуктом, який генерується метаболізмом, необхідним для життєдіяльності (первинний метаболіт), або продуктом, що генерується метаболізмом, необов'язково необхідним для життєдіяльності (вторинний метаболіт). Приклади первинних метаболітів можуть включати цукри, білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти тощо. Приклади вторинних метаболітів включають антибіотики та барвники. Метаболіт може бути біополімером або молекулою з невеликою масою. У конкретному варіанті здійснення біополімер являє собою молекулу, що має молекулярну масу близько 5000 або більше, яка складається з одного або декількох типів

повторюваних одиниць, включаючи, наприклад, полісахариди, поліпептиди та полінуклеотиди. У конкретному варіанті здійснення молекули з невеликою масою - це молекули, що мають молекулярну масу приблизно 500 або менше і являють собою хімічні речовини, присутні в живому організмі. У ще одному варіанті здійснення специфічна для пухлини сполука являє собою низькомолекулярний метаболіт, який специфічно продукується в клітинах пухлини [Eva Gottfried, Katrin Peter and Marina P. Kreutz, у Molecular and Modular Tumor Therapy (2010) 3 (2), 111-132)]. У наступному варіанті здійснення специфічна для пухлини сполука являє собою метаболіт, який специфічно продукується клітиною, що інфільтрує тканину пухлини (наприклад, імунною клітиною), або стромальною клітиною (наприклад, пов'язаним з раком фібробластом (CAF)), присутньою в тканині пухлини. Прикладами імунних клітин, що інфільтрують в тканину пухлини, є дендритні клітини, супресивні дендритні клітини, регуляторні Т-клітини, виснажені Т-клітини, мієлоїдні супресорні клітини (MDSC) й тощо. У ще одному варіанті здійснення метаболіт, який продукується клітинами, присутніми в тканині пухлини (наприклад, клітинами пухлини, імунними клітинами, стромальними клітинами тощо), який виділяється назовні клітини, коли клітини гинуть внаслідок апоптозу або некрозу, або тому подібного, також може бути включений до сполук цього винаходу, специфічних для тканини пухлини.

Для ідентифікації сполуки, специфічної для тканини пухлини, може бути відповідним чином використаний аналіз на рівні транскриптома [наприклад, Dhanasekaran et al. (Nature (2001) 41 2, 822-826), Lapointe et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101, 811-816), або Perou et al. (Nature (2000) 406, 747-752)), аналіз на рівні протеома (наприклад, Ahram et al. (Mol. Carcinog. (2002) 33, 9-15), і Hood et al. (Mol. Cell. Proteomics (2005) 4], 1741-1753 і аналіз метаболології, що зосереджується на метаболомічному профілюванні (метаболоміці). Тобто, для ідентифікації метаболіту в досліджуваному зразку можуть бути відповідним чином використані окремо та/або в комбінації високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), ядерно-магнітний резонанс (ЯМР) [Brindle et al. (J. Mol. Recognit. (1997) 10, 182-187)], мас-спектрометрія (GC/MS і LC/MS) [Gates and Sweeley (Clin. Chem. (1978) 24, 1663-1673)] та метаболічне профілювання, яке використовує ELISA, і т.п.

У конкретному варіанті здійснення сполукою, специфічною для тканини пухлини, є щонайменше одна сполука, вибрана з групи, що складається з: нуклеозидів, що мають структуру пуринового кільця, амінокислоти та їх метаболіти, ліпіди та їх метаболіти, первинні метаболіти вуглеводного обміну речовин, а також нікотинамід та його метаболіти. У ще одному варіанті здійснення сполукою, специфічною для тканини пухлини, є щонайменше одна сполука, вибрана з (1)-(6), наведених нижче:

(1) нуклеозиди, що мають пуринову структуру, такі як аденозин (ADO), аденозинтрифосфат (ATP), аденозиндифосфат (ADP), аденозинмонофосфат (AMP) та інозин;

(2) амінокислоти, такі як аланін, глутамінова кислота та аспарагінова кислота;

(3) метаболіти амінокислот, такі як кінуренін, антранілова кислота, 3-гідроксикінуренін та кінуренова кислота;

(4) метаболіти арахідонової кислоти, такі як простагландин E2;

(5) первинні метаболіти гліколітичного шляху або циклу Кребса, такі як молочна кислота, бурштинова кислота та лимонна кислота; та

(6) метаболіти нікотинаміду, такі як 1-метилнікотинамід.

(1) Нуклеозиди, що мають пуринову структуру, такі як аденозин (ADO), аденозинтрифосфат (ATP), аденозиндифосфат (ADP), аденозинмонофосфат (AMP) та інозин

Відомо, що коли пухлинні клітини зазнають клітинної загибелі, витікає велика кількість внутрішньоклітинного ATP. Отже, концентрація ATP у тканині пухлини значно вища, ніж у нормальній тканині (PLoS One. (2008) 3, e2599). AMP метаболізується ферментами на поверхні клітини, такими як позаклітинна 5'-нуклеотидаза (еко-5'-нуклеотидаза) (CD73) [Resta and Thompson (Immunol. Rev. (1998) 161, 95-109) і Sadej et al. (Melanoma Res. (2006) 16, 21 3-222)]. Аденозин - це пуриновий нуклеозид, який конститутивно присутній у позаклітинному середовищі у низьких концентраціях, однак, як повідомлялося, спостерігається помітне збільшення позаклітинної концентрації аденозину в гіпоксичних тканинах, виявлених у солідних пухлинах [Blay and Hoskin (Cancer Res. (1997) 57, 260 2-2605)]. CD73 експресується на поверхні пухлин та імунних клітин [Kobie et al. (J. Immunol. (2006) 17 7, 6780-6786)], і підвищена активність виявлена при раку молочної залози (Canbolat et al. (Breast Cancer Res. Treat. (1996) 37, 189-193)), раку шлунка (Durak et al. (Cancer Lett. (1994) 84, 199-202)], раку підшлункової залози [Flocke and Mannherz (Biochim. Biophys. Acta (1991) 1076, 273-281)] і гліобластомі [Bardot et al. (Br. J. Cancer (1994) 70, 212-218)]. Було запропоновано, що накопичення аденозину в тканині пухлини є результатом збільшення дефосфорилювання AMP цитоплазматичною 5'-нуклеотидазою [Headrick and Willis (Biochem. J. (1989) 261, 541-550)]. Крім того, регуляторні Т-клітини, що

інфільтрують тканини пухлини, також експресують аденозинтрифосфотазу (АТФазу (ATPase)) і продукують аденозин [Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (35), 13132-13137; Curr. Med. Chem. (2011) 18: 5217-5223]. Вважається, що вироблений аденозин утримує тканини пухлини в імунодепресивному середовищі через аденозинові рецептори, такі як рецептор A2A [Curr. Med. Chem. (2011) 18, 5217-5223]. Таким чином, ATP, ADP, AMP, аденозин і їм подібні, які, як вважається, повинні накопичуватися з високою концентрацією в тканині пухлини завдяки метаболізму пуринових нуклеотидів, є прикладами сполук, специфічних для тканини пухлини, що використовуються в цьому винаході. Крім того, оскільки аденозин піддається деградації аденозиндезаміназою до інозину, інозин накопичується у високій концентрації.

У конкретному варіанті здійснення нуклеозиди, що мають структуру пуринового кільця, включають аденозинвмісні сполуки. У конкретних варіантах здійснення аденозинвмісні сполуки включають, наприклад, аденозин (ADO), аденозинтрифосфат (ATP), аденозиндифосфат (ADP), аденозинмонофосфат (AMP), циклічний аденозинмонофосфат (cAMP), дезоксиаденозин (dADO), дезоксиаденозинтрифосфат (dATP), дезоксиаденозиндифосфат (dADP), дезоксиаденозинмонофосфат (dAMP), аденозин [γ-тіо]трифосфат (ATPγS) і т. п. В іншому варіанті здійснення нуклеозиди, що мають структуру пуринового кільця, включають інозин, який є метаболітом аденозину.

Крім того, у конкретному варіанті здійснення нуклеозиди, що мають пуринову кільцеву структуру, включають комерційно доступні нуклеозиди, що мають пуринову кільцеву структуру, такі як ADPbetaS (Sigma Inc.) і т. п.

(2) Амінокислоти, такі як аланін, глутамінова кислота та аспарагінова кислота

Швидкість поглинання глутаміну, який діє як носій азоту в живому організмі, збільшується в пухлинних клітинах, і таке включення глутаміну та перетворення на глутамінову кислоту та молочну кислоту (деградація глутаміну (глутаміноліз)) вважаються особливостями клітин пухлини [Mazurek and Eigenbrodt (Anticancer Res. (2003) 23, 1149-1154, і Mazurek et al. (J. cell. Physiol. (1999) 181, 136-146)]. Рівні глутаміну в плазмі знижуються у хворих на рак, тоді як концентрація глутамінової кислоти збільшується [Droge et al. (Immunobiology (1987) 174, 473-479)], а дослідження метаболізму ^{13}C-міченої глюкози в тканині раку легенів показали кореляцію між концентраціями ^{13}C-міченої бурштинової кислоти, ^{13}C-міченого аланіну, ^{13}C-міченої глутамінової кислоти та ^{13}C-міченого цитрату. З цих причин аланін, глутамінова кислота, аспарагінова кислота та і їм подібні, які, як вважається, накопичуються у високих концентраціях в тканині пухлини внаслідок, наприклад, деградації глутаміну, є прикладами сполук, специфічних для тканини пухлини, що використовуються в цьому винаході.

(3) Метаболіти амінокислот, таких як кінуренін, антранілова кислота, 3-гідроксикінуренін та кінуренова кислота

Індоламін 2,3-діоксигеназа (IDO) - це фермент, який метаболізує триптофан, сильно експресується при багатьох видах раку, таких як меланома, рак товстої кишки, рак нирок та ін. [Uyttenhove et al. (Nat. Med. (2003) 9, 1269-1274)]. IDO каталізує перетворення триптофану на кінуренін. У гліомах, які не експресують IDO, кінуренін виробляється з триптофану за допомогою триптофан-2,3-діоксигенази (TDO) печінки [Opitz et al. (Nature (2011) 478 (7368), 197-203)]. IDO також експресується на дендритних клітинах, що інфільтрують пухлинні тканини, і дендритні клітини також продукують кінуренін [J. Immunol. (2008) 181, 5396-5404]. Крім того, IDO також експресується в мієлоїдних супресорних клітинах (MDSC) тканин пухлини, і MDSC також виробляють кінуренін [Yu et al. (J. Immunol. (2013) 190, 3783-3797)]. Кінуренін перетворюється на антранілову кислоту за допомогою кінуренінази та на 3-гідроксикінуренін за допомогою кінуренін-3-гідроксилази. Як антранілова кислота, так і 3-гідроксикінуренін перетворюються на 3-гідроксіантранілову кислоту, попередник NAD. Кінуренін перетворюється на кінуренову кислоту за допомогою кінуренінамінотрансферази. З цих причин кінуренін та його метаболіти, тобто антранілова кислота, 3-гідроксикінуренін, кінуренова кислота і т. п., є прикладами сполук, специфічних для тканини пухлини, що використовуються в цьому винаході, зокрема, метаболітів, специфічних для пухлинних клітин.

(4) Метаболіти арахідонової кислоти, такі як простагландин E2

Простагландин E2 (PGE2) сприяє зростанню клітин раку товстої кишки і пригнічує їх апоптоз [Sheng et al. (Cancer Res. (1998) 58, 362-366)]. З PGE2-синтетаз, було виявлено, що, головним чином, COX-1 конститутивно експресується майже у всіх тканинах, тоді як COX-2 індукується деякими запальними цитокінами і онкогенами в пухлинах [Warner and Mitchell (FASEB J. (2004) 18, 790-804)]. Повідомляється, що надмірна експресія COX-2 пов'язана з поганим прогнозом раку молочної залози [Denkert et al. (Clin. Breast Cancer (2004) 4, 428-433)] і швидким прогресуванням захворювання при раку яєчників [Denker et al. (Mod. Pathol. (2006) 19, 1261-1269)]. Крім того, регуляторні Т-клітини, що інфільтрують тканини пухлини, також продукують

PGE2 [Curr. Med. Chem. (2011) 18, 5217-5223]. З цих причин метаболіти арахідонової кислоти, такі як PGE2, є прикладами сполук, специфічних для тканини пухлини, зокрема метаболітів, специфічних для пухлинних клітин, або метаболітів, специфічних для імунних клітин, що інфільтрують тканини пухлини. Крім PGE2, продукування тромбоксану A2 (TXA2) посилюється в пухлинних тканинах, наприклад, в пухлинних тканинах раку товстої кишки [J. Lab. Clin. Med. (1993) 122, 518-523].

(5) Первинні метаболіти гліколітичного шляху або циклу Кребса, такі як молочна кислота, бурштинова кислота та лимонна кислота

Гліколітичний фенотип, що характеризується ап-регуляцією гліколітичних (шлях Ембдена-Мейєргофа) ферментів, таких як піруваткіназа, гексокіназа та лактатдегідрогеназа (ЛДГ (LDH)), традиційно відомий як ефект Варбурга, що є особливістю солідних пухлин. Відомо, що молочна кислота, яка є кінцевим продуктом гліколізу, і бурштинова кислота та лимонна кислота, що виробляються за циклом Кребса, накопичуються в пухлинних тканинах [Teresa et al. (Mol. Cancer (2009) 8, 41-59)]. Внаслідок цих причини молочна кислота, бурштинова кислота, лимонна кислота та їм подібні, які є первинними метаболітами, що утворюються в результаті гліколізу, є прикладами сполук, специфічних для тканини пухлини, зокрема метаболітів, специфічних для пухлинних клітин, що використовуються в цьому описі. Крім того, відомо, що внаслідок загибелі клітин сукцинат, який присутній у високій концентрації в клітинах, витікає з клітин (Nature Immunology, (2008) 9, 1261-1269). Вважається, що це є причиною підвищення концентрації бурштинової кислоти в тканинах пухлини, де часто відбувається загибель клітин.

(6) Метаболіти нікотинаміду, такі як 1-метилнікотинамід

Відомо, що нікотинамід-N-метилтрансфераза сильно експресується в безлічі пухлинних тканин людини. Також відомо, що 1-метилнікотинамід, який є стабільним метаболітом нікотинаміду, що продукується цим ферментом, секретується назовні пухлинних клітин [Yamada et al. (J. Nutr. Sci. Vitaminol. (2010) 56, 83-86)]. З цієї причини 1-метилнікотинамід та йому подібні, які, як вважається, накопичуються в пухлинній тканині з високою концентрацією в результаті метаболізму нікотинаміду, є прикладами сполук, специфічних для тканини пухлини, що використовуються в цьому винаході.

"Антигензв'язувальна молекула" цього винаходу містить "антигензв'язувальний домен". Як "антигензв'язувальний домен" можна використовувати домен будь-якої структури, доки він зв'язується з цільовим антигеном. В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні домени цього винаходу включають, наприклад, варіабельні ділянки важких ланцюгів та/або легких ланцюгів антитіл, авімери, що містять модуль (A-домен) з приблизно 35 амінокислот, що містяться в різних білках клітинної мембрани в живому організмі [міжнародні публікації WO2004/044011 та WO2005/040229], аднектини, що містять домен 10Fn3 фібронектину, який є глікопротеїном, що експресується на клітинній мембрані [міжнародна публікація WO2002/032925], афітіла, що використовують як каркас IgG-зв'язувальний домен з 58 амінокислот білка A [WO WO1995/001937], дарпіни [DARPins-Designed Ankyrin Repeat proteins - сконструйовані білки з анкириновим повтором], що використовують анкіриновий повтор (AR), який є 33-амінокислотною повторюваною послідовністю, як основу (міжнародна публікація WO2002/020565), антикаліни, що включають ліпокалін, такий як ліпокалін, асоційований з желатиназою нейтрофілів (NGAL), як основу [міжнародна публікація WO2003/029462], варіабельні лімфоцитарні рецептори (VLR), які є білками, що функціонують в адаптивних імунних системах безщелепних, таких як Lampetra japonica (тихоокеанська японська мінога) та Eptatretus (міксини), і містять збагачений лейцином повтор (LRR) [міжнародна публікація WO2008/016854] тощо. У конкретному варіанті здійснення антигензв'язувальний домен цього винаходу включає варіабельні ділянки важкого та легкого ланцюгів антитіла. У ще одному варіанті здійснення антигензв'язувальний домен цього винаходу включає, наприклад, scFv (одноланцюговий Fv), одноланцюгові антитіла, Fv, scFv2 (одноланцюговий Fv2), Fab або F(ab')2.

HVR і варібельна ділянка

В одному аспекті цим винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, які включають щонайменше одну, щонайменше дві або всі три послідовності HVR VH, вибрані з: (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає будь-яку з амінокислотних послідовностей, вибрану із SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 та 16; та (c) HVR-H3, що включає будь-яку з амінокислотних послідовностей, вибрану з SEQ ID NO: 17, 18, 19 або 20. В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають: (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає будь-яку з амінокислотних послідовностей, вибрану із SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 та 16; та (c) HVR-H3, що включає будь-яку з амінокислотних послідовностей, вибрану з SEQ ID NO: 17, 18,

19 або 20.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 являє собою антитіло, що включає амінокислотну послідовність з A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 або A549/B167, наведених в таблиці 17, як комбінації варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга. У переважному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула являє собою антитіло проти CD137, що містить HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що мають ті ж самі амінокислотні послідовності, що і HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, які містяться в A375/B167. У ще одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 являє собою антитіло проти CD137, що включає A375/B167 як комбінацію варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга. В іншому переважному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 являє собою антитіло проти CD137, що містить HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, що мають ті ж самі амінокислотні послідовності, що і HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, які містяться в A551/B379.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 8; і (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 9; і (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 10; і (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 11; і (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 8; і (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 12; і (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 13; і (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14; і (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 19.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 15; і (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 16; і (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14; і (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17.

В іншому аспекті цим винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, які включають щонайменше одну, щонайменше дві або всі три послідовності HVR VL, вибрані з: (a) HVR-L1, що включає будь-яку з амінокислотних послідовностей, вибрану з SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24 і 25; (b) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (c) HVR-L3, що включає будь-яку з амінокислотних послідовностей, вибрану з SEQ ID NO: 27, 28 і 29. В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-L1, що включає будь-яку з амінокислотних послідовностей, вибрану з SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24 і 25; (b) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (c) HVR-L3, що включає будь-яку з амінокислотних послідовностей, вибрану з SEQ ID NO: 27, 28 і 29.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21; (b) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (c) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 22; (b) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (c) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21; (b) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (c) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 28.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21; (b) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (c) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 29.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 23; (b) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (c) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 24; (b) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (c) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають (a) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 25; (b) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (c) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В іншому аспекті антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 за даним винаходом включають (a) домен VH, що включає щонайменше одну, щонайменше дві або всі три послідовності HVR VH, вибрані з (i) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (ii) HVR-H2, що включає будь-яку з амінокислотних послідовностей, вибрану з SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 і 16; і (iii) HVR-H3, що включає будь-яку з амінокислотних послідовностей, вибрану з SEQ ID NO: 17, 18, 19 або 20; і (b) домен VL, що містить щонайменше одну, щонайменше дві або всі три послідовності HVR VL, вибрані з (i) HVR-L1, що включає будь-яку з амінокислотних послідовностей, вибрану з SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24 і 25; (ii) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (iii) HVR-L3, що включає будь-яку з амінокислотних послідовностей, вибрану з SEQ ID NO: 27, 28 і 29.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17; (d) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (f) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 9; (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17; (d) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 22; (e) HVR-L2, що включає амінокислотну

послідовність за SEQ ID NO: 26; і (f) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 10; (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17; (d) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 22; (e) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (f) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 11; (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18; (d) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (f) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18; (d) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (f) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 12; (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18; (d) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (f) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 28.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 13; (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 18; (d) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (f) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 29.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14; (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 19; (d) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 23; (e) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (f) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 15; (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20; (d) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 24; (e) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (f) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 15; (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20; (d) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 25; (e) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (f) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну

послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 16; (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 20; (d) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 25; (e) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (f) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14; (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 19; (d) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 24; (e) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (f) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 14; (c) HVR-H3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 17; (d) HVR-L1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (f) HVR-L3, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 27.

У конкретному варіанті здійснення будь-яка одна або декілька амінокислот вищеописаного антитіла проти CD137 замінені в наступних позиціях HVR:

в HVR-H2 (SEQ ID NO: 30): позиції 5, 6, 7, 10, 13, 14 і/або 17;

в HVR-H3 (SEQ ID NO: 31): позиції 3 і/або 6;

в HVR-L1 (SEQ ID NO: 32): позиції 4, 5, 9 і/або 11;

в HVR-L3 (SEQ ID NO: 33): позиції 6, 7 і/або 8.

У конкретному варіанті здійснення заміни, передбачені цим описом, є консервативними замінами. У конкретному варіанті здійснення будь-яка одна або декілька замін у вказаному далі можуть бути виконані в будь-якій комбінації:

в HVR-H2 (SEQ ID NO: 8): K5H або S; S6G; T7S; E10Y; D13E; S14Q; V17G або L;

в HVR-H3 (SEQ ID NO: 17): A3P, K або I; F6E;

в HVR-L1 (SEQ ID NO: 21): R4S; Y5T; Y9F; E11N;

в HVR-L3 (SEQ ID NO: 27): E6P; H7A; Q8I.

Усі можливі комбінації вищезазначених замін охоплені консенсусними послідовністями за SEQ ID NO: 30, 31, 32 і 33 для HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1 і HVR-L3, відповідно.

У будь-якому з вищевказаних варіантів здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 є гуманізованими. В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають HVR, як у будь-якому з вищевказаних варіантів здійснення, і також включають акцепторну каркасну ділянку людини, наприклад каркасну ділянку імуноглобуліну людини або консенсусну каркасну ділянку людини. В іншому варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають HVR, як у будь-якому з вищевказаних варіантів здійснення, і також включають варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH) або варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), що включають послідовність каркасної ділянки (FR). В одному варіанті здійснення FR1 варіабельної ділянки важкого ланцюга включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 35, FR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 36, FR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 37 і FR4 варіабельної ділянки важкого ланцюга включає амінокислотну послідовність за SEQ ID №: 38. В одному варіанті здійснення FR1 варіабельної ділянки легкого ланцюга включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 39, FR2 варіабельної ділянки легкого ланцюга включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 40, FR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 41, і FR4 варіабельної ділянки легкого ланцюга включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 42.

В іншому аспекті антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 містять послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH), що має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 або 53. У деяких варіантах здійснення послідовність VH, що має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність, включає заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції відносно контрольної послідовності, але антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають цю послідовність, зберігають

здатність зв'язуватися з CD137. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот замінено, вставлено в та/або видалено з SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 або 53. В певних варіантах здійснення заміни, вставки або делеції відбуваються в ділянках поза HVR (тобто в FR). Необов'язково, антитіло проти CD137 включає послідовність VH в SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 або 53, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. У конкретному варіанті здійснення VH включає одну, дві або три HVR, вибрані з: (a) HVR-H1, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 7; (b) HVR-H2, що включає будь-яку амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 і 16; і (c) HVR-H3, що включає будь-яку амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 17, 18, 19 або 20. Посттрансляційні модифікації включають, але не обмежуючись ними, модифікацію глутаміну або глутамату до піроглутамінової кислоти шляхом піроглутамілації в N-кінці важкого ланцюга або легкого ланцюга.

В іншому аспекті пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, де антитіло включає варіабельний домен легкого ланцюга (VL), що має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності з амінокислотною послідовністю за SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59 або 60. У деяких варіантах здійснення послідовність VL, що має принаймні 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції відносно контрольної послідовності, але антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що включають цю послідовність, зберігають здатність зв'язуватися з CD137. У певних варіантах здійснення загалом від 1 до 10 амінокислот було замінено, вставлено в та/або видалено з SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59 або 60. У деяких варіантах заміни, вставки або делеції відбуваються в ділянках поза HVR (тобто в FR). Необов'язково, антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 включають послідовність VL в SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59 або 60, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. У конкретному варіанті здійснення VL включає одну, дві або три HVR, вибрані з (a) HVR-L1, що включає будь-яку амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24 і 25; (b) HVR-L2, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 26; і (c) HVR-L3, що включає будь-яку амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 27, 28 і 29. Посттрансляційні модифікації включають, але не обмежуються ними, модифікацію глутаміну або глутамату до піроглутамінової кислоти шляхом піроглутамілації в N-кінці важкого ланцюга або легкого ланцюга.

В іншому аспекті пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, де антигензв'язувальна молекула або антитіло включають VH, як у будь-якому з варіантів здійснення, наведених вище, і VL, як у будь-якому з варіантів здійснення, наведених вище.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 містять послідовності VH та VL в SEQ ID NO: 43 і SEQ ID NO: 54, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 містять послідовності VH та VL в SEQ ID NO: 44 і SEQ ID NO: 55, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 містять послідовності VH та VL в SEQ ID NO: 45 і SEQ ID NO: 55, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 містять послідовності VH та VL в SEQ ID NO: 46 і SEQ ID NO: 54, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 містять послідовності VH та VL в SEQ ID NO: 47 і SEQ ID NO: 54, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 містять послідовності VH та VL в SEQ ID NO: 48 і SEQ ID NO: 56, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 містять послідовності VH та VL в SEQ ID NO: 49 і SEQ ID NO: 57, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 містять послідовності VH та VL в SEQ ID NO: 50 і SEQ ID NO: 58, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 містять послідовності VH та VL в SEQ ID NO: 51 і SEQ ID NO: 59, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 містять послідовності VH та VL в SEQ ID NO: 51 і SEQ ID NO: 60, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 містять VH і VL послідовності в SEQ ID NO: 52 і SEQ ID NO: 60, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 містять послідовності VH та VL в SEQ ID NO: 50 і SEQ ID NO: 59, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 містять послідовності VH та VL в SEQ ID NO: 53 і SEQ ID NO: 54, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

Вищезазначені посттрансляційні модифікації включають, але не обмежуються ними, модифікацію глутаміну або глутамату до піроглутамінової кислоти шляхом піроглутамілації в N-кінці важкого ланцюга або легкого ланцюга.

SEQ ID NO, що відповідають амінокислотним послідовностям переважної варіабельної ділянки важкого ланцюга та варіабельної ділянки легкого ланцюга та їх HVR1, 2 та 3 для кожної антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 цього винаходу, наведені в таблиці нижче.

Таблиця 1

Варібельні ділянки важкого ланцюга/легкого ланцюга	SEQ ID NO варібельної ділянки		SEQ ID NO гіперваріабельних ділянок (HVR)					
	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	H1	H2	H3	L1	L2	L3
A375/B167	43	54	7	8	17	21	26	27
A372/B040	44	55	7	9	17	22	26	27
A356/B040	45	55	7	10	17	22	26	27
A486/B167	46	54	7	11	18	21	26	27
A487/B167	47	54	7	8	18	21	26	27
A488/B226	48	56	7	12	18	21	26	28
A489/B223	49	57	7	13	18	21	26	29
A548/B376	50	58	7	14	19	23	26	27
A551/B256	51	59	7	15	20	24	26	27
A551/B379	51	60	7	15	20	25	26	27
A555/B379	52	60	7	16	20	25	26	27
A548/B256	50	59	7	14	19	24	26	27
A549/B167	53	54	7	14	17	21	26	27

Коли антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, запропоновані цим винаходом, мають глутамін як кінцеву амінокислоту N-кінця важкого ланцюга або легкого ланцюга, ця амінокислота може бути замінена глутаміновою кислотою. Коли антитіло проти CD137, запропоноване цим винаходом, має глутамінову кислоту як кінцеву амінокислоту N-кінця важкого ланцюга або легкого ланцюга, ця амінокислота може бути замінена глутаміном.

У переважному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, що включають описані вище HVR, варіабельні ділянки важкого ланцюга та/або варіабельні ділянки легкого ланцюга, володіють залежною від низькомолекулярної сполуки антигензв'язувальною активністю стосовно CD137, як описано вище.

Константні ділянки

В іншому аспекті антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 включають константну ділянку. Константна ділянка може бути константною ділянкою важкого ланцюга (включаючи ділянку Fc), константною ділянкою легкого ланцюга або і тим, і іншим. У наступному аспекті антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 включають ділянку Fc. У певних варіантах здійснення константною ділянкою є ділянка з нативною послідовністю. Приклади константних ділянок важкого ланцюга, що походять від нативних антитіл, включають, наприклад, константну ділянку важкого ланцюга IgG1 людини

(SEQ ID NO: 61, 62), IgG2 людини, IgG3 людини, IgG4 людини і т. п. Приклади константних ділянок легкого ланцюга, що походять від нативних антитіл, включають, наприклад, каппа-ланцюг людини, лямбда-ланцюг людини (наприклад, SEQ ID NO: 63) і т. п.

Використовуваний в цьому описі винаходу вирази "батьківська константна ділянка" або "батьківська Fc-ділянка" відносяться до константної ділянки або Fc-ділянки до введення амінокислотної(их) зміни(змін), описаної(их) у цьому описі винаходу. "Батьківська антигензв'язувальна молекула" відноситься до антигензв'язувальної молекули, яка включає батьківську константну ділянку або батьківську Fc-ділянку. У деяких варіантах здійснення батьківська Fc-ділянка являє собою Fc-ділянку, що має нативну послідовність (або Fc-ділянку нативного антитіла). Антитіла включають, наприклад, IgA (IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM тощо. Антитіла можуть бути походити від людини або мавпи (наприклад, яванської макаки, макаки-резус, ігрунки, шимпанзе або бабуїна). Нативні антитіла можуть також мати природні мутації. Безліч послідовностей алотипів IgG, обумовлених генетичним поліморфізмом, описані в "Sequences of proteins of immunological interest", NIH Publication № 91-3242, і будь-яка з них може бути використана в цьому винаході. В одному варіанті здійснення батьківська ділянка Fc являє собою ділянку Fc, що походіть від константної ділянки важкого ланцюга IgG1 людини, наведеної у SEQ ID NO: 61, 62 або 182.

В одному аспекті антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 мають підвищену ізоелектричну точку (pI), як порівняти з антигензв'язувальними молекулами проти CD137 або антитілами проти CD137, які включають нативну послідовність Fc-ділянки або батьківську Fc-ділянку. В деяких варіантах здійснення варіанти Fc-ділянок мають щонайменше одну амінокислотну зміну. У подальших варіантах здійснення амінокислотна зміна призводить до підвищення ізоелектричної точки (pI) варіанта Fc-ділянки, як порівняти з батьківською Fc-ділянкою. Не обмежуючись певною теорією, вважається, що pH біологічних рідин (наприклад, плазми) знаходиться в нейтральному діапазоні pH. У біологічних рідинах сумарний позитивний заряд антигензв'язувальної молекули або антитіла з підвищеною pI збільшується завдяки підвищеній pI, і в результаті антигензв'язувальна молекула або антитіло сильніше притягуються фізико-хімічною кулонівською взаємодією до поверхні ендотеліальної клітини, яка має сумарний негативний заряд, як порівняти з антигензв'язувальною молекулою або антитілом, що не мають підвищеної pI. Таким чином, агоністичні антигензв'язувальні молекули (або антитіла) або зв'язані з антигеном агоністичні антигензв'язувальні молекули (або антитіла) можуть щільніше наблизитися до поверхні клітин, які експресують рецептор Fc-гамма, що призводить до посиленого зв'язування антигензв'язувальної молекули або антитіла з клітинами, що експресують рецептор Fc-гамма. Щодо тих агоністичних антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137, які проявляють агоністичну активність стосовно CD137 на основі внеску зв'язувальної активності стосовно рецептора Fc-гамма, то агоністичні антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, що мають підвищене зв'язування з клітинами, які експресують рецептор Fc-гамма, зумовлене замінами амінокислот, що підвищують pI, здатні виявляти сильнішу агоністичну активність стосовно CD137, як порівняти з агоністичними антигензв'язувальними молекулами проти CD137 або антитілами проти CD137, що не мають амінокислотних змін, які підвищують pI.

У цьому винаході pI може бути або теоретично, або експериментально визначеним pI. Значення pI можна визначити, наприклад, шляхом ізоелектричного фокусування, відомого фахівцям в даній галузі. Значення теоретичного pI можна розрахувати, наприклад, використовуючи програмне забезпечення для аналізу послідовностей генів та амінокислот (Genetyx та ін.). При розрахунку властивості антитіла можуть бути відображені у формулі розрахунку. Наприклад, (i) як правило, Cys, що зберігається в антитілі, утворює дисульфідний зв'язок і не несе електричного заряду бічного ланцюга; отже, такий Cys може бути виключений із розрахунку, і лише вільна форма Cys, яка не утворює дисульфідного зв'язку, може бути включена до розрахунку. Альтернативно, (ii) стан заряду або ізоелектрична точка антитіл можуть змінюватися завдяки посттрансляційним модифікаціям; отже, формула розрахунку може бути змінена наступним чином, враховуючи такі посттрансляційні модифікації: (a) коли N-кінець важкого ланцюга являє собою Q (глутамін), тоді N-кінцеву аміногрупу виключають з розрахунку, припускаючи, що відбувається піроглутамілування, (b) коли C-кінець важкого ланцюга являє собою K (лізин), тоді K (лише один залишок) виключають з розрахунку, припускаючи, що відбувається усічення; і (c) бічні ланцюги всіх C (цистеїнів), присутніх у в цілому збережених позиціях, виключають з розрахунку, припускаючи, що всі ці C утворюють дисульфідні зв'язки всередині молекули. В одному переважному варіанті здійснення, як описані вище (i), так і (ii) можуть бути відображені у формулі розрахунку.

В одному варіанті здійснення значення pI може бути підвищено, наприклад, принаймні на

0,01, 0,03, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 або більше, принаймні на 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 або більше, принаймні на 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 або більше, або принаймні на 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 3,0 або більше, як порівняти з pI перед модифікаціями.

В одному варіанті здійснення амінокислотні зміни, що стосуються підвищення pI, і способи підвищення pI антигензв'язувальної молекули або антитіла докладно описані у цьому описі винаходу в розділі "III. Композиції та методи (агоністичні антигензв'язувальні молекули, що включають варіант Fc-ділянки з підвищеною ізоелектричною точкою (pI))". Фахівцям в даній галузі зрозуміло, що будь-які зміни амінокислот і способи підвищення pI, описані в розділі "III. Композиції та методи (агоністичні антигензв'язувальні молекули, що включають варіант Fc-ділянки з підвищеною ізоелектричною точкою (pI))", можна застосовувати до антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 мають варіант Fc-ділянки з підвищеною pI, і цей варіант Fc-ділянки включає щонайменше одну амінокислотну зміну в щонайменше одній позиції, вибраній з групи, що складається з позицій 285, 311, 312, 315, 318, 333, 335, 337, 341, 342, 343, 384, 385, 388, 390, 399, 400, 401, 402, 413, 420, 422 і 431, відповідно до Європейської номенклатури. У подальших варіантах здійснення варіанти Fc-ділянок із підвищеною pI включають Arg або Lys у кожній вибраній позиції.

У подальших варіантах здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 мають варіант Fc-ділянки з підвищеною pI, і цей варіант Fc-ділянки включає щонайменше одну амінокислотну зміну на щонайменше одній позиції, вибраній з групи, що складається з позицій 311, 343 та 413, згідно з Європейською номенклатурою. У подальших варіантах здійснення варіанти Fc-ділянок з підвищеною pI включають амінокислотну зміну в позиціях 311, 343 або 413 згідно з Європейською номенклатурою. У ще одному варіанті здійснення варіанти Fc-ділянок із підвищеною pI включають Arg або Lys у кожній вибраній позиції.

В іншому аспекті цим винаходом пропонуються антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, що включають варіант Fc-ділянки з підвищеною pI, який включає амінокислотні зміни згідно з будь-яким з наступних пунктів (1) - (3): (1) у позиціях 311 та 343; (2) у позиціях 311 та 413 та (3) у позиціях 343 та 413, згідно з Європейською номенклатурою. У подальших варіантах здійснення варіанти Fc-ділянок із підвищеною pI включають Arg або Lys у кожній вибраній позиції.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 за цим винаходом включають варіант Fc-ділянки, який включає амінокислотну(і) зміну(и), зазначену(і) в таблиці 2 нижче.

Таблиця 2

Амінокислотні зміни для підвищення pI Fc-ділянки

Номер	Амінокислотні зміни (Європейська номенклатура)
1	P343R/D413K
2	Q311R/P343R
3	P343R
4	D413K
5	Q311R
6	Q311R/D413K

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 включають варіант Fc-ділянки, отриманий шляхом внесення амінокислотної(их) зміни(змін) у ділянку Fc, що має нативну послідовність. В одному варіанті здійснення варіанти Fc-ділянок мають підвищену зв'язувальну активність стосовно щонайменше одного рецептора Fc-гамма, вибраного із групи, що складається з Fc-гамма-RIa, Fc-гамма-RIIa, Fc-гамма-RIIb, Fc-гамма-RIIIa та Fc- гамма-RIIIb, як порівняти з Fc-ділянкою, що має нативну послідовність, або батьківською Fc-ділянкою. Переважно, варіанти Fc-ділянок мають підвищену зв'язувальну активність стосовно Fc-гамма-RIIb, як порівняти з Fc-ділянкою, що має нативну послідовність, або батьківською Fc-ділянкою. Повідомляється, що антитіло проти CD137, що містить варіант Fc-ділянки з підвищеною зв'язувальною активністю стосовно Fc-гамма-RIIb, має підвищену

агоністичну активність, як порівняти з антитілом проти CD137, що включає ділянку Fc з нативною послідовністю. В одному варіанті здійснення як амінокислотні зміни для підвищення зв'язувальної активності стосовно Fc-гамма-RIIb можуть бути використані, наприклад, амінокислотні зміни, викладені в WO2012/115241, WO2014/030728, WO2014/163101 та/або WO2017/104783. В одному переважному варіанті здійснення зміни для підвищення зв'язувальної активності стосовно Fc-гамма-RIIb являють собою зміну(и) амінокислот в щонайменше одній позиції, вибраній з групи, що складається з позицій 234, 235, 236, 237, 238, 264, 268, 295, 326 та 330, згідно з Європейською номенклатурою.

Термін "рецептори Fc-гамма" (у цьому описі винаходу іменуються Fc-гамма-рецептори, Fc-гамма-R або FcgR) стосується рецепторів, які можуть зв'язуватися з Fc-ділянкою моноклональних антитіл IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4, і практично означає будь-якого члена сімейства білків, кодованих генами Fc-гамма-рецепторів. У людей до цього сімейства належать Fc-гамма-RI (CD64), включаючи ізоформи Fc-гамма-RIa, Fc-гамма-RIb та Fc-гамма-RIc; Fc гамма-RII (CD32), включаючи ізоформи Fc-гамма-RIIa (включаючи алотипи H131 (тип H) і R131 (тип R)), Fc-гамма-RIIb (включаючи Fc-гамма-RIIb-1 і Fc-гамма-RIIb-2) та Fc-гамма-RIIc; і Fc-гамма-RIII (CD16), включаючи ізоформи Fc-гамма-RIIIa (включаючи алотипи V158 та F158), та Fc-гамма-RIIIb (включаючи алотипи Fc-гамма-RIIIb-NA1 та Fc-гамма-RIIIb-NA2), та будь-які людські Fc-гамма-R, ізоформи або алотипи Fc-гамма R, які ще не відкриті, але не треба обмежуватися ними. Повідомляється, що Fc-гамма-RIIb1 та Fc-гамма-RIIb2 є сплайс-варіантами Fc-гамма-RIIb людини. Крім того, повідомляється про сплайс-варіант під назвою Fc гамма-RIIb3 [J Exp Med, 1989, 170: 1369-1385]. На додаток до цих сплайс-варіантів людський Fc-гамма-RIIb включає AAI46679.1, зареєстрований в NCBI [National Center For Biotechnology Information - Національному центрі біотехнологічної інформації], і всі сплайс-варіанти, зареєстровані в NCBI, а саме NP_001002273.1, NP_001002274.1, NP_001002275.1, NP_001177757.1 та NP_003992.3. Крім того, людський Fc-гамма-RIIb включає кожен генетичний поліморфізм, про який повідомлялося раніше, а також Fc-гамма-RIIb [Arthritis Rheum. 48: 3242-3252 (2003); Kono et al., Hum. Mol. Genet. 14: 2881-2892 (2005); і Kyogoju et al., Arthritis Rheum. 46: 1242-1254 (2002)], і кожен генетичний поліморфізм, про який буде повідомлено в майбутньому.

У Fc-гамма-RIIa є два алотипи: один, де амінокислотою в позиції 131 Fc-гамма-RIIa є гістидин (тип H), а другий, де амінокислота в позиції 131 замінена аргініном (тип R) [Warrmerdam, J. Exp. Med. 172: 19-25 (1990)].

Fc-гамма-R включає людські, мишачі, щурячі, кролячі та мавпячі Fc-гамма-R, але не треба обмежуватися ними, і він може бути отриманий з будь-якого організму. Мишачі Fc-гамма-R включають Fc-гамма-RI (CD64), Fc-гамма-RII (CD32), Fc-гамма-RIII (CD16) та Fc-гамма-RIII-2 (CD16-2), а також будь-які мишачі Fc-гамма-R або ізоформи Fc-гамма-R, але не треба обмежуватися ними.

В іншому аспекті цим винаходом пропонуються антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, що включають варіант Fc-ділянки, що має підвищену зв'язувальну активність стосовно Fc-гамма-RIIb, що включає амінокислотні зміни за будь-яким з наступних (1)-(8): (1) у позиціях 234, 238, 264 та 330; (2) у позиціях 234, 238 та 330; (3) у позиціях 234, 237, 238 та 330; (4) у позиціях 236, 268 та 330; (5) у позиціях 235, 236, 268, 295, 326 та 330, за Європейською номенклатурою.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 за цим винаходом включають варіант Fc-ділянки, що має амінокислотні зміни, зазначені в таблиці 3 нижче. У наступному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 за цим винаходом включають варіант Fc-ділянки, який додатково має, крім амінокислотної(их) зміни(змін), наведеної(их) в таблиці 2 (амінокислотні зміни, що передбачають підвищення pI ділянки Fc), будь-яку одну комбінацію амінокислотних змін, визначених у таблиці 3 нижче.

Таблиця 3

Амінокислотні зміни для підвищення зв'язувальної активності Fc-ділянки стосовно Fc-гамма-RIIb

Номер	Амінокислотні зміни (Європейська номенклатура)
1	L234Y/P238D/V264I/A330K
2	L234Y/P238D/A330K
3	L234Y/G237D/P238D/A330K
4	G236N/H268D/A330K
5	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K

В одному варіанті здійснення цим винаходом пропонуються варіанти Fc-ділянок, включаючи ті варіанти Fc-ділянок, які мають зміну щонайменше однієї амінокислоти і мають зв'язувальну активність стосовно Fc-гамма-RIIb, еквівалентну або вищу, ніж у контрольної ділянки Fc. В одному варіанті здійснення контрольна Fc-ділянка являє собою Fc-ділянку, що включає будь-яку одну комбінацію амінокислотних змін, визначених у таблиці 3 вище. В одному переважному варіанті здійснення контрольна ділянка Fc являє собою ділянку Fc, що міститься в константній ділянці важкого ланцюга TT14 (SEQ ID NO: 149), TT16 (SEQ ID NO: 150), MY201 (SEQ ID NO: 153) або MY518 (SEQ ID NO: 154). В одному переважному варіанті здійснення контрольна ділянка Fc являє собою ділянку Fc, що міститься в константній ділянці важкого ланцюга MY201 (SEQ ID NO: 153) або MY518 (SEQ ID NO: 154).

В іншому аспекті цим винаходом пропонуються виділені агоністичні антигензв'язувальні молекули або антитіла, які включають варіант Fc-ділянки з підвищеною зв'язувальною активністю стосовно рецептора Fc-гамма (переважно, Fc-гамма-RIIb) і підвищеною pI. У певному варіанті здійснення описані у цьому описі винаходу варіанти Fc-ділянок мають щонайменше дві амінокислотні зміни в батьківських Fc-ділянках. Як описано вище, антигензв'язувальна молекула або антитіло з підвищеною pI сильніше притягуються за рахунок фізико-хімічної кулонівської взаємодії до поверхні ендотеліальної клітини, яка має сумарний негативний заряд, як порівняти з антигензв'язувальною молекулою або антитілом, що не мають підвищеної pI. Отже, для тих агоністичних антигензв'язувальних молекул або антитіл, які проявляють агоністичну активність на основі вкладу зв'язувальної активності стосовно рецептора Fc-гамма (переважно Fc-гамма-RIIb), агоністичну активність антигензв'язувальних молекул або антитіл можна підвищити, поєднуючи амінокислотну(і) зміну(и) для підвищення зв'язувальної активності стосовно рецептора Fc-гамма (переважно Fc-гамма RIIb) та амінокислотну(і) зміну(и) для підвищення pI.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 включають варіант Fc-ділянки, що має як амінокислотну(і) зміну(и) для підвищення зв'язувальної активності стосовно рецептора Fc-гамма (наприклад, Fc-гамма-RIIb), так і амінокислотну(і) зміну(и) для підвищення ізоелектричної точки (pI), що описано вище. Як описано вище, антигензв'язувальна молекула або антитіло з підвищеною pI сильніше притягуються за рахунок фізико-хімічної кулонівської взаємодії до поверхні ендотеліальної клітини, яка має сумарний негативний заряд, як порівняти з антигензв'язувальною молекулою або антитілом, що не має підвищеної pI. Отже, для тих агоністичних антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137, які проявляють агоністичну активність стосовно CD137 на основі вкладу зв'язувальної активності стосовно рецептора Fc-гамма (переважно Fc-гамма-RIIb), агоністична активність антигензв'язувальних молекул або антитіла проти CD137 можна підвищити, поєднуючи амінокислотну(і) зміну(и) для підвищення зв'язувальної активності стосовно рецептора Fc-гамма (переважно Fc-гамма RIIb) та амінокислотну(і) зміну(и) для підвищення pI.

В одному аспекті цим винаходом пропонуються поліпептиди, що включають варіант Fc-ділянки з підвищеною зв'язувальною активністю стосовно Fc-гамма-RIIb і з підвищеною pI, який має щонайменше три амінокислотні зміни, включаючи (a) щонайменше одну амінокислотну зміну в щонайменше одній позиції, вибраній з групи, що складається з позицій 234, 235, 236, 237, 238, 264, 268, 295, 326 та 330, згідно з Європейською номенклатурою, та (b) щонайменше дві амінокислотні зміни в щонайменше двох позиціях, вибраних з групи, що складається з позицій 311, 343 та 413, згідно з Європейською номенклатурою.

В іншому аспекті цим винаходом пропонуються поліпептиди, що включають варіант Fc-ділянки з підвищеною зв'язувальною активністю стосовно Fc-гамма-RIIb і підвищеною pI, який має амінокислотні зміни за будь-яким з наступних пунктів (1)-(26):

(1) позиції 235, 236, 268, 295, 326, 330, 343 і 413;
(2) позиції 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330, 343 і 413;
(3) позиції 234, 238, 250, 264, 307, 330, 343 і 413;
(4) позиції 234, 238, 264, 330, 343 і 413;
(5) позиції 234, 237, 238, 250, 307, 330, 343 і 413;
(6) позиції 234, 237, 238, 330, 343 і 413;
(7) позиції 235, 236, 268, 295, 326, 330, 311 і 343;
(8) позиції 234, 238, 250, 264, 307, 330, 311 і 343;
(9) позиції 234, 238, 264, 330, 311 і 343;
(10) позиції 234, 237, 238, 250, 307, 330, 311 і 343;
(11) позиції 234, 237, 238, 330, 311 і 343;

(12) позиції 235, 236, 268, 295, 326, 330 і 343;
(13) позиції 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330 і 343;
(14) позиції 235, 236, 268, 295, 326, 330 і 413;
(15) позиції 214, 236, 268, 330 і 343;
(16) позиції 214, 235, 236, 268, 330 і 343;
(17) позиції 214, 236, 268, 330 і 413;
(18) позиції 214, 236, 268, 330, 343 і 413;
(19) позиції 214, 235, 236, 268, 330, 343 і 413;
(20) позиції 214, 236, 268, 330 і 311;
(21) позиції 214, 235, 236, 268, 330 і 311;
(22) позиції 214, 236, 268, 330, 311 і 343;
(23) позиції 214, 235, 236, 268, 330, 311 і 343;
(24) позиції 214, 236, 268, 330, 311 і 413;
(25) позиції 214, 235, 236, 268, 330, 311 і 413;
(26) позиції 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330 і 311,
згідно з Європейською номенклатурою.

В одному варіанті здійснення варіанти ділянки Fc цього винаходу мають будь-яку одну комбінацію амінокислотних змін, наведених у таблиці 4 нижче.

Таблиця 4

Номер	Амінокислотні заміни (Європейська номенклатура)
1	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K
2	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K
3	L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/P343R/D413K
4	L234Y/P238D/V264I/A330K/P343R/D413K
5	L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/P343R/D413K
6	L234Y/G237D/P238D/A330K/P343R/D413K
7	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R/P343R
8	L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/Q311R/P343R
9	L234Y/P238D/V264I/A330K/Q311R/P343R
10	L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/Q311R/P343R
11	L234Y/G237D/P238D/A330K/Q311R/P343R
12	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R
13	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R
14	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/D413K
15	K214R/G236N/H268D/A330K/P343R
16	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R
17	K214R/G236N/H268D/A330K/D413K
18	K214R/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K
19	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K
20	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R
21	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R
22	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R
23	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R
24	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K
25	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K
26	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R

В одному варіанті здійснення варіант Fc-ділянки, що має будь-яку комбінацію амінокислотних змін, наведених у таблиці 4 вище, не має амінокислоти в позиції 447 згідно з Європейською номенклатурою. У переважному варіанті здійснення варіант Fc-ділянки, що має будь-яку комбінацію амінокислотних змін, наведених у таблиці 4 вище, не має амінокислот у позиціях 446 та 447 згідно з Європейською номенклатурою.

Фахівцям в даній галузі зрозуміло, що може бути застосована щонайменше одна амінокислотна зміна для підвищення зв'язувальної активності стосовно Fc-гамма-R (включаючи Fc-гамма-RIIb), як порівняти з батьківською Fc-ділянкою, як описано або запропоновано, наприклад, у WO2013/047752, WO2013/125667, WO2014/030728, WO2014/163101 або WO2017/104783, і, щонайменше, одна амінокислотна зміна для підвищення pI, як порівняти з

батьківською Fc-ділянкою, як описано або запропоновано, наприклад, у WO2017/104783, WO2017/046994, і може бути застосована будь-яка комбінація цих амінокислотних змін на додаток до змін, наведених як ілюстрація вище.

Крім того, амінокислотні зміни, виконані для іншої(их) цілі(ей), можуть бути скомбіновані у варіанті Fc-ділянки, описаному у цьому описі винаходу. Наприклад, можуть бути здійснені амінокислотні заміни, що підвищують FcRn-зв'язувальну активність [Hinton et al., J. Immunol. 176(1): 346-356 (2006); Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281(33): 23514-23524 (2006); Petkova et al., Intl. Immunol. 18(12): 1759-1769 (2006); Zalevsky et al., Nat. Biotechnol. 28(2): 157-159 (2010); WO 2006/019447; WO 2006/053301; і WO 2009/086320], і амінокислотні заміни для поліпшення гетерогенності або стабільності антитіл (WO 2009/041613). Альтернативно, поліпептиди з властивістю сприяти кліренсу антигену, які описані в WO 2011/122011, WO 2012/132067, WO 2013/046704 або WO 2013/180201, поліпептиди з властивістю специфічного зв'язування з тканиною-мішенню, які описані у WO 2013/180200, поліпептиди, що мають властивість багаторазового зв'язування з безліччю молекул антигену, які описані в WO 2009/125825, WO 2012/073992 або WO 2013/047752, можуть бути об'єднані з варіантом Fc-ділянки, описаним у цьому описі винаходу. Альтернативно, з метою надання зв'язувальної активності стосовно інших антигенів, амінокислотні зміни, розкриті в EP1752471 та EP1772465, можуть бути скомбіновані в CH3 варіанта Fc-ділянки, описаного у цьому описі винаходу.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 за цим винаходом включають константну ділянку важкого ланцюга, яка включає будь-яку амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 64-85. Переважно, щоб антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 за цим винаходом включали константну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 75 або 82.

В одному переважному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, що включають описаний вище варіант Fc-ділянки, володіють описаною вище CD137-зв'язувальною активністю, що залежить від низькомолекулярної сполуки.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 за цим винаходом включають наступні варіабельну ділянку і константну ділянку: варіабельну ділянку, що включає вищеописаний HVR, варіабельну ділянку важкого ланцюга та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга і описаний вище варіант Fc-ділянки. В одному переважному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 за цим винаходом можуть бути будь-якими антитілами проти CD137, вибраними з антитіл, наведених в таблиці 52.

У наступному аспекті цим винаходом пропонуються антигензв'язувальні молекули або антитіла, що зв'язуються з тим же самим епітопом на CD137, що й антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, запропоновані у цьому винаході, у присутності низькомолекулярної сполуки (наприклад, в присутності 10 мкМ або більше, 50 мкМ або більше, 100 мкМ або більше, 150 мкМ або більше, 200 мкМ або більше або 250 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки). Наприклад, у певному варіанті здійснення пропонуються ті антигензв'язувальні молекули або антитіла, які зв'язуються з тим же самим епітопом, що і антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, що включають A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 та/або A549/B167, наведені в таблиці 17 як комбінації варібельної ділянки важкого ланцюга/варібельної ділянки легкого ланцюга. В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 за цим винаходом, що мають зв'язувальну активність стосовно CD137, яка є антигензв'язувальною активністю, що залежить від низькомолекулярної сполуки, розпізнають епітоп, утворений комплексом, утвореним з антигену (наприклад, CD137) та низькомолекулярної сполуки (наприклад, ATP).

У ще одному аспекті цим винаходом пропонується антигензв'язувальні молекули або антитіла, які конкурують за зв'язування з CD137 з антигензв'язувальними молекулами проти CD137 або антитілами проти CD137, запропонованими у цьому винаході, у присутності низькомолекулярної сполуки (наприклад, в присутності 10 мкМ або більше, 50 мкМ або більше, 100 мкМ або більше, 150 мкМ або більше, 200 мкМ або більше або 250 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки). Наприклад, у певному варіанті здійснення вони конкурують за сайт зв'язування з CD137 з антигензв'язувальними молекулами проти CD137 або антитілами проти CD137, що включають A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 і/або A549/B167, наведені в таблиці 17 як комбінації варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга.

У подальшому аспекті цього винаходу антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 згідно з будь-яким із вищевказаних варіантів здійснення є моноклональним антитілом, включаючи химерне, гуманізоване або антитіло людини. В одному варіанті здійснення антитіло проти CD137 являє собою фрагмент антитіла, наприклад, Fv, Fab, Fab', scFv, діатіло або фрагмент $F(ab')_2$. В іншому варіанті здійснення антитіло являє собою повнорозмірне антитіло, наприклад, інтактне антитіло IgG1 або антитіло іншого класу або ізотипу, як визначено у цьому описі винаходу.

У додатковому аспекті антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 згідно з будь-яким з вищевказаних варіантів можуть мати будь-яку з ознак, окремо або в поєднанні, як описано в розділах 1-7 нижче:

1. Агоністична активність антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137

У конкретному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 у цьому винаході володіють агоністичною активністю стосовно CD137. CD137-сигналізація не тільки стимулює секрецію IFN-γ і проліферацію клітин-кілерів (Buechele et al., 2012; Lin et al., 2008; Melero et al., 1998), але також посилює їх виживання та активацію дендритних клітин, що вказується ап-регуляцією костимулюючих молекул та секреції цитокінів [Choi et al., 2009; Futagawa et al., 2002; Wilcox et al., 2002]. Однак CD137 найкраще характеризувати як костимулюючу молекулу, що регулює TCR-індуковану активацію як у CD4+, так і в CD8+ підтипах Т-клітин. У поєднанні з активацією TCR агоністичні антитіла проти CD137 підвищують проліферацію Т-клітин, стимулюють секрецію лімфокінів та зменшують чутливість Т-лімфоцитів до індукованої активацією загибелі клітин (огляд зроблений в Snelet al., 2011). З цих явищ фізіологічні явища, що спостерігаються після CD137-сигналізації на Т-клітинах, опосередковуються наступними сигналами, що активуються CD137-сигналізацією, такими як TRAF2, TRAF1, зокрема NF-kappaB [ядерний фактор каппа-бі (NF-каппаВ)), JNK, Erk, Akt, сурвівін, Bcl-XL та/або Bcl-2 (Ward-Kavanagh et al., Immunity, 44: 1005 (2016)].

В одному варіанті здійснення "агоністична антигензв'язувальна молекула проти CD137" або "агоністичне антитіло проти CD137" є антигензв'язувальною молекулою або антитілом, які, зв'язуючись з CD137, трансдукують сигнал CD137 і значно індукують або посилюють секрецію IFN-гамма, проліферацію та збільшення виживання клітин-кілерів; активацію дендритних клітин, що підтверджується ап-регуляцією секреції цитокінів та костимулюючих молекул; індукцію TCR; проліферацію Т-клітин та/або секрецію лімфокінів. В іншому варіанті здійснення "агоністична антигензв'язувальна молекула проти CD137" або "агоністичне антитіло проти CD137" є антигензв'язувальною молекулою або антитілом, які трансдукують сигнал CD137 шляхом зв'язування з CD137 на Т-клітинах і значно індукують активацію NF-каппаВ Т-клітин. Крім того, антигензв'язувальна молекула або антитіло "демонструють агоністичну активність стосовно CD137" означає, що будь-яке із згаданих вище фізіологічних явищ спостерігається, коли антигензв'язувальна молекула або антитіло зв'язуються з CD137. Спосіб вимірювання агоністичної активності стосовно CD137 докладно описаний у розділі "C. Аналізи" нижче.

У конкретному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 в цьому винаході володіють залежною від низькомолекулярних сполук агоністичною активністю стосовно CD137. В одному необмежувальному варіанті здійснення агоністична активність стосовно CD137 антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки вища, ніж агоністична активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки. В іншому варіанті здійснення CD137-агоністична активність антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 за наявності високої концентрації низькомолекулярної сполуки вища, як порівняти з агоністичною активністю стосовно CD137 за наявності низької концентрації низькомолекулярної сполуки. У ще одному варіанті здійснення агоністична активність стосовно CD137 антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки є вищою у 2 рази або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 100 разів або більше, 200 разів або більше, 300 разів або більше, 500 разів або більше, $1x10^3$ разів або більше, $2x10^3$ разів або більше, $3x10^3$ разів або більше, $5x10^3$ разів або більше, $1x10^4$ разів або більше, $2x10^4$ разів або більше, $3x10^4$ разів або більше, $5x10^4$ разів або більше або $1x10^5$ разів або більше, як порівняти з агоністичною активністю стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

Будь-яка відповідна концентрація може бути вибрана як концентрація низькомолекулярної сполуки за умови, що виявляється різниця в зв'язувальній активності антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137. В одному варіанті здійснення

антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 трансдукують сигнал CD137 шляхом зв'язування з CD137 на клітинній поверхні. Отже, фахівцеві в даній галузі зрозуміло, що антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що володіють залежною від низькомолекулярної сполуки активністю стосовно CD137, мають агоністичну активність стосовно CD137, що залежить від низькомолекулярної сполуки. Однак, з іншого боку, оскільки методи вимірювання зв'язувальної активності та агоністичної активності є різними, фахівцеві буде зрозуміло, що концентрація низькомолекулярної сполуки, для якої виявляється різниця в зв'язувальній активності, може відрізнятися від концентрації низькомолекулярної сполуки, для якої виявляється різниця в агоністичній активності (наприклад, для антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 зв'язувальна активність стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 10 мкМ є вищою у 2 рази або більше, як порівняти зі зв'язувальною активністю стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки, агоністична активність стосовно CD137 (значення за аналізом) у присутності низькомолекулярної сполуки при 10 мкМ може бути менш ніж 2-кратною, як порівняти з агоністичною активністю стосовно CD137 (значення за аналізом) за відсутності низькомолекулярної сполуки). Крім того, фахівцям в даній галузі техніки зрозуміло, що визначення агоністичної активності може змінюватися в залежності від аналізу агоністичної активності стосовно CD137 (дивись "C. Аналізи").

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 (i) проявляють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ і (ii) не виявляють по суті ніякої агоністичної активності стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки або мають низьку агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки (як порівняти з випадком, коли низькомолекулярна сполука присутня).

В одному варіанті здійснення, коли агоністична активність антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіл проти CD137 оцінюється за допомогою "a) аналізу агоністичної активності (PBMC)", детально поясненого в "C. Аналізи", антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 (i) проявляють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 250 мкМ та (ii) мають низьку агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки (як порівняти з випадком, коли низькомолекулярна сполука присутня). У ще одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 (i) проявляють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки при 250 мкМ і (ii) практично не виявляють агоністичної активності стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

В одному варіанті здійснення, коли агоністична активність антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 оцінюється за допомогою "b) аналізу агоністичної активності (аналізу з використанням репортерного гена)", докладно поясненому в "C. Аналізи", антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 (i) проявляють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки і (ii) не мають по суті ніякої агоністичної активності стосовно CD137 або мають меншу агоністичну активність за відсутності низькомолекулярної сполуки (як порівняти з агоністичною активністю у присутності низькомолекулярної сполуки). Концентрації антитіл в аналізі з використанням репортерного гена можуть бути вибрані довільно, наприклад, кінцева концентрація антитіла становить 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 або 10 мкг/мл. У переважному варіанті здійснення кінцева концентрація антитіла становить 0,1 мкг/мл або 1 мкг/мл.

В одному варіанті здійснення, коли кінцева концентрація антитіла становить 0,1 мкг/мл у "b) Аналізі агоністичної активності (аналізі з використанням репортерного гена)", докладно поясненому в "C. Аналізи", (i) агоністична активність стосовно CD137 (відносна світлова одиниця) антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 у присутності 10 мкМ низькомолекулярної сполуки є вищою у 2 рази або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 60 разів або більше, 70 разів або більше, 80 разів або більше або 90 разів або більше, як порівняти з (ii) агоністичною активністю стосовно CD137 (відносна світлова одиниця) за відсутності низькомолекулярної сполуки. В одному варіанті здійснення, коли кінцева концентрація антитіла дорівнює 0,1 мкг/мл у "b) Аналізі агоністичної активності (аналізі з використанням репортерного гена)", докладно поясненому в "C. Аналізи", (i) агоністична активність стосовно CD137 (відносна світлова одиниця) антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 в присутності 100 мкМ низькомолекулярної сполуки є вищою у

2 рази або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 60 разів або більше, 70 разів або більше, 80 разів або більше або 90 разів або більше, як порівняти з (ii) агоністичною активністю стосовно CD137 (відносна світлова одиниця) за відсутності низькомолекулярної сполуки. В одному варіанті здійснення, коли кінцева концентрація антитіла дорівнює 0,1 мкг/мл у "b) Аналізі агоністичної активності (аналізі з використанням репортерного гена)", докладно поясненому в "C. Аналізи", (i) агоністична активність стосовно CD137 (відносна світлова одиниця) антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 в присутності 250 мкМ низькомолекулярної сполуки є вищою у 2 рази або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 60 разів або більше, 70 разів або більше, 80 разів або більше, або 90 разів або більше, як порівняти з (ii) агоністичною активністю стосовно CD137 (відносна світлова одиниця) за відсутності низькомолекулярної сполуки. У будь-якому з вищевказаних варіантів здійснення, окрім того, 0,1 мкг/мл антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 практично не виявляє агоністичної активності стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

В одному варіанті здійснення, коли кінцева концентрація антитіла дорівнює 1 мкг/мл у "b) Аналізі агоністичної активності (аналізі з використанням репортерного гена)", докладно поясненому в "C. Аналізи", (i) агоністична активність стосовно CD137 (відносна світлова одиниця) антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 у присутності 10 мкМ низькомолекулярної сполуки є вищою у 2 рази або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 60 разів або більше, 70 разів або більше, 80 разів або більше або 90 разів або більше, як порівняти з (ii) агоністичною активністю стосовно CD137 (відносна світлова одиниця) за відсутності низькомолекулярної сполуки. В одному варіанті здійснення, коли кінцева концентрація антитіла дорівнює 0,1 мкг/мл у "b) Аналізі агоністичної активності (аналізі з використанням репортерного гена)", докладно поясненому в "Аналізи", (i) агоністична активність стосовно CD137 (відносна світлова одиниця) антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 в присутності 100 мкМ низькомолекулярної сполуки є вищою у 2 рази або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 60 разів або більше, 70 разів або більше, у 80 разів або більше, або 90 разів або більше, як порівняти з (ii) агоністичною активністю стосовно CD137 (відносна світлова одиниця) за відсутності низькомолекулярної сполуки. В одному варіанті здійснення, коли кінцева концентрація антитіла дорівнює 0,1 мкг/мл у "b) Аналізі агоністичної активності (аналізі з використанням репортерного гена)", докладно поясненому у "C. Аналізи", (i) агоністична активність стосовно CD137 (відносна світлова одиниця) антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 у присутності 250 мкМ низькомолекулярної сполуки є вищою у 2 рази або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 60 разів або більше, 70 разів або більше, 80 разів або більше, або 90 разів або більше, як порівняти з (ii) агоністичною активністю стосовно CD137 (відносна світлова одиниця) за відсутності низькомолекулярної сполуки. У будь-якому з вищевказаних варіантів здійснення, окрім того, 1 мкг/мл антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 практично не виявляє агоністичної активності стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки.

2. Фрагменти антитіл

У певних варіантах здійснення антитіло, передбачене в цьому винаході, є фрагментом антитіла. Фрагменти антитіл включають, але не обмежуються ними, фрагменти Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv та scFv та інші фрагменти, описані нижче. Огляд певних фрагментів антитіл див. у [Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003)]. Огляд фрагментів scFv див., наприклад, [Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); дивись також WO 93/16185 та патенти США № 5,571,894 та 5,587,458]. Для обговорення фрагментів Fab та $F(ab')_2$, які включають залишки епітопу зв'язування рецептора реутилізації і які мають збільшений період напіввиведення in vivo, див. патент США № 5,869,046.

Діатіла - це фрагменти антитіл з двома антигензв'язувальними ділянками, які можуть бути бівалентними або біспецифічними. Дивіться, наприклад, [EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); та Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]. Триатіла і тетратіла також описані в [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)].

Однодоменні антитіла - це фрагменти антитіла, що включають увесь варіабельний домен важкого ланцюга антитіла або його частину або увесь варіабельний домен легкого ланцюга

антитіла або його частину. У певних варіантах здійснення однодоменне антитіло є людським однодоменним антитілом [Domantis, Inc., Waltham, MA; дивись, наприклад, патент США № 6,248,516 B1].

Фрагменти антитіл можуть бути отримані за різними методами, включаючи, але не обмежуючись ними, протеолітичне перетравлення інтактного антитіла, а також продукування рекомбінантними клітинами-хазяїнами (наприклад, E. coli або фагом), як описано у цьому описі винаходу.

3. Химерні та гуманізовані антитіла

У певних варіантах здійснення антитіло, передбачене в цьому винаході, є химерним антитілом. Деякі химерні антитіла описані, наприклад, у [патенті США № 4,816,567 і Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]. В одному прикладі химерне антитіло включає варіабельну ділянку, не пов'язану з людиною (наприклад, варіабельну ділянку, що походить від миші, щура, хом'яка, кролика або примата, який не є людиною, наприклад, мавпи), і константну ділянку людини. У наступному прикладі химерне антитіло - це антитіло з переключеним класом, клас або підклас якого було змінено відносно класу або підкласу батьківського антитіла. Химерні антитіла включають їх антигензв'язувальні фрагменти.

У деяких варіантах здійснення химерним антитілом є гуманізоване антитіло. Як правило, антитіло, яке не є антитілом людини, гуманізують для зниження імуногенності стосовно людини, зберігаючи при цьому специфічність та афінність батьківських антитіл, які не є людськими. Як правило, гуманізоване антитіло містить один або більше варіабельних доменів, в яких HVR, наприклад, CDR (або їх частини) походять від антитіла, яке не є антитілом людини, а FR (або їх частини) походять від послідовностей антитіл людини. Гуманізоване антитіло, необов'язково, також включатиме щонайменше частину константної ділянки людини. У деяких варіантах здійснення деякі залишки FR в гуманізованому антитілі замінені відповідними залишками від антитіла, яке не є антитілом людини (наприклад, антитіла, з якого походять залишки HVR), наприклад, для відновлення або поліпшення специфічності або афінності антитіл.

Гуманізовані антитіла та способи їх отримання розглядаються, наприклад, в [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008), а також описані, наприклад, в Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); патентах США №№ 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321 та 7,087,409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (описується трансплантація ділянки, яка визначає специфічність (SDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (описується "перекладання варіабельного домену" ("resurfacing")); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (описується "перетасування FR" ("FR shuffling")); і Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) і Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (описується підхід "спрямованої селекції" до перетасування FR)].

Каркасні ділянки людини, які можуть бути використані для гуманізації, включають, але не обмежуються ними: каркасні ділянки, вибрані за методом "найкращого узгодження" [див., наприклад, Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)]; каркасні ділянки, які походять від консенсусної послідовності людських антитіл певної підгрупи варіабельних ділянок легкого або важкого ланцюгів [див., наприклад, Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); і Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)]; зрілі (соматично мутовані) каркасні ділянки людини або людські каркасні ділянки ембріонального типу [див., наприклад, Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)]; і каркасні ділянки, похідні від скринінгу бібліотек FR [див., наприклад, Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) і Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)].

4. Антитіла людини

У певних варіантах здійснення антитіло, передбачене в цьому винаході, є людським антитілом. Людські антитіла можуть бути отримані з використанням різних методик, відомих в даній галузі техніки. Антитіла людини [описані взагалі у роботі van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) і Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)].

Людські антитіла можуть бути отримані шляхом введення імуногену трансгенній тварині, яка була модифікована для отримання інтактних людських антитіл або інтактних антитіл із варіабельними ділянками людини у відповідь на стимуляцію антигеном. Такі тварини зазвичай мають всі або частину локусів імуноглобуліну людини, які замінюють ендогенні локуси імуноглобуліну або які присутні екстрахромосомно або інтегровані в хромосоми тварини випадковим чином. У таких трансгенних мишей ендогенні локуси імуноглобуліну, як правило, інактивовані. Огляд методів отримання антитіл людини від трансгенних тварин див. [Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)]. Дивись також, наприклад, [патенти США №№ 6,075,181 і 6,150,584, що описують технологію XENOMOUSE™; патент США № 5,770,429, що описує технологію HuMab (зареєстрована торговельна марка); патент США № 7,041,870, що описує

технологію K-M MOUSE (зареєстрована торговельна марка) та публікацію заявки на патент США № US 2007/0061900], що описує технологію VelociMouse (зареєстрована торговельна марка)). Варіабельні ділянки людини від інтактних антитіл, що утворюються такими тваринами, можуть бути додатково модифіковані, наприклад, шляхом комбінування з іншою константною ділянкою людини.

Антитіла людини також можуть бути отримані за методами на основі гібридоми. Описані клітинна лінія мієломи людини та мишачо-людська клітинна лінія гетеромієломи для виробництва моноклональних антитіл людини. [Дивись, наприклад, Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); і Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991).] Антитіла людини, що утворюються за допомогою гібридомної технології з використанням В-клітин людини, також описані в [Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]. До додаткових методів належать методи, описані, наприклад, у [патенті США № 7,189,826] (що описує продукування моноклональних антитіл IgM людини лінією гібридомних клітин) та [Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)] (що описує людино-людські гібридоми). Технологія людської гібридоми (технологія Trioma) також описана в [Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) та Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)].

Людські антитіла можуть також генеруватися шляхом виділення послідовностей варіабельних доменів Fv-клону, вибраних з фаг-дисплейних бібліотек, що походять від людини. Потім такі послідовності варіабельних доменів можуть бути об'єднані з бажаним константним доменом людини. Методи відбору людських антитіл з бібліотек антитіл описані нижче.

5. Антитіла, що походять з бібліотек

Антитіла за цим винаходом можуть бути виділені шляхом скринінгу комбінаторних бібліотек стосовно антитіл з бажаною активністю або з бажаними різними видами активності. Наприклад, у цій галузі відомі різноманітні методи створення бібліотек фагового дисплея та скринінгу таких бібліотек стосовно антитіл, що мають бажані характеристики зв'язування. Такі методи розглядаються, наприклад, в [Hoogenboom et al. в Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001), а також описані, наприклад, у McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, в Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); і Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)].

У деяких методах фагового дисплея репертуари генів VH та VL окремо клонують методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) та рекомбінують випадковим чином у фагові бібліотеки, які потім можна піддати скринінгу на антигензв'язувальний фаг, як [описано у Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]. Фаги, як правило, відображають фрагменти антитіл або як одноланцюгові фрагменти Fv (scFv), або як фрагменти Fab. Бібліотеки з імунізованих джерел забезпечують антитілами з високою афінністю до імуногену без потреби в конструюванні гібридом. Альтернативно, наївний репертуар можна клонувати (наприклад, від людини), щоб забезпечити єдине джерело антитіл до широкого спектра ксеноантигенів, а також аутоантигенів без будь-якої імунізації, як [описано в Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993)]. Нарешті, наївні бібліотеки також можна створити синтетично шляхом клонування нереаранжованих сегментів V-гена зі стовбурових клітин та використання праймерів ПЛР, що включають випадкову послідовність, для кодування високоваріабельних ділянок CDR3 та здійснення реаранжування in vitro, як [описано у Hoogenboom and Winter, J. Мол. Biol., 227: 381-388 (1992)]. Патентні публікації, що описують фагові бібліотеки людських антитіл, включають, наприклад: [патент США №5,750,373 та патентні публікації США №№ 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 та 2009/0002360].

Антитіла або фрагменти антитіл, виділені з бібліотек людських антитіл, у цьому винаході розглядаються як антитіла людини або фрагменти антитіл людини.

Антигензв'язувальні молекули або антитіла цього винаходу, що володіють антигензв'язувальною активністю, залежною від низькомолекулярної сполуки, можуть бути вибрані шляхом проведення скринінгу бібліотеки антигензв'язувальних молекул. Вищеописані комбінаторні бібліотеки можуть бути використані як така бібліотека. Бібліотека антигензв'язувальних молекул може бути з об'єктивним репертуаром антигензв'язувальних молекул (наївна бібліотека) або може мати тенденційний репертуар антигензв'язувальних молекул. Приклади останнього типу бібліотек включають бібліотеку антигензв'язувальних молекул, яким заздалегідь надається зв'язувальна активність стосовно визначеної сполуки. У

певному варіанті здійснення бібліотека антигензв'язувальних молекул - це бібліотека антигензв'язувальних молекул, до яких заздалегідь вноситься(яться) амінокислотна(і) зміна(и) для надання зв'язувальної активності стосовно визначеної сполуки. Приклади такого типу бібліотеки включають бібліотеки, описані, наприклад, у міжнародній публікації [WO 2015/083764].

6. Мультиспецифічні антитіла

У певних варіантах здійснення антитіло, передбачене в цьому винаході, є мультиспецифічним антитілом, наприклад біспецифічним антитілом. Мультиспецифічні антитіла - це моноклональні антитіла, які мають специфічність зв'язування стосовно щонайменше двох різних сайтів. У певних варіантах здійснення однією зі зв'язувальних специфічностей є специфічність зв'язування з CD137, а іншою - з будь-яким іншим антигеном. У деяких варіантах здійснення біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися з двома різними епітопами CD137. Біспецифічні антитіла можуть також використовуватися для розміщення цитотоксичних агентів у клітинах, які експресують CD137. Біспецифічні антитіла можуть бути отримані як повнорозмірні антитіла або як фрагменти антитіл.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 за цим винаходом є біспецифічними антитілами, одне їх плече володіє залежною від низькомолекулярної сполуки зв'язувальною активністю стосовно CD137, а інше плече зв'язується з антигеном, відмінним від CD137. "Антиген", відмінний від CD137, особливо не обмежений щодо своєї структури. Іншими словами, цим антигеном можуть бути неорганічні або органічні речовини. Приклади антигенів розкриті у цьому описі винаходу (наприклад, у "IV. Композиції та методи (антигензв'язувальні молекули, зв'язувальна активність яких з антигенами змінюється залежно від концентрації низькомолекулярної сполуки)", "B. Антиген"). В одному варіанті здійснення антигени переважно є антигенами, експресованими в ракових клітинах, імунних клітинах, клітинах строми або клітинах у ракових тканинах або тканинах із запаленням.

Методи отримання мультиспецифічних антитіл включають, але не обмежуються ними, рекомбінантну коекспресію двох пар важкий ланцюг-легкий ланцюг імуноглобуліну, що мають різну специфічність [див. Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)), WO 93/08829, і Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)], та технологію "виступ-у-западину" [дивись, наприклад, патент США № 5,731,168]. Мультиспецифічні антитіла також можуть бути отримані за допомогою: побудови білків з використанням ефекту електростатичної взаємодії для отримання Fc-гетеродимерних молекул антитіла [WO 2009/089004A1]; зшивання двох або більше антитіл або їх фрагментів [дивись, наприклад, патент США № 4676980 та Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)]; використання лейцинових застібок-блискавок для отримання біспецифічних антитіл [дивись, наприклад, Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)]; використання технології побудови "діатіла" для отримання біспецифічних фрагментів антитіл [дивись, наприклад, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)], та використання одноланцюгових димерів Fv (scFv) [див., наприклад, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)]; та отримання триспецифічних антитіл, як описано, наприклад, в [Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)].

До цього опису винаходу також включені сконструйовані антитіла з трьома або більше функціональними сайтами зв'язування антигену, включаючи "антитіла-восьминоги" [див., наприклад, US 2006/0025576A1].

Антитіло або фрагмент у цьому описі винаходу також включають "Fab подвійної дії" або "DAF", що містить антигензв'язувальний сайт, який зв'язується з CD137, а також з іншим, відмінним антигеном [див., наприклад, US 2008/0069820].

7. Варіанти антитіл

У певних варіантах здійснення розглядаються варіанти амінокислотної послідовності антитіл, передбачених в цьому винаході. Наприклад, може бути бажаним покращити афінність зв'язування та/або інші біологічні властивості антитіла. Варіанти амінокислотної послідовності антитіла можуть бути отримані шляхом здійснення відповідних модифікацій в нуклеотидній послідовності, що кодує антитіло, або шляхом синтезу пептидів. Такі модифікації включають, наприклад, делеції та/або вставки в та/або заміни залишків в амінокислотних послідовностях антитіла. Будь-яка комбінація делеції, вставки та заміни може бути зроблена для досягнення кінцевої конструкції за умови, що кінцева конструкція має бажані характеристики, наприклад, зв'язування з антигеном.

а) Варіанти заміни, вставки та делеції

У певних варіантах здійснення пропонуються варіанти антитіл, що мають одну або більше амінокислотних замін. Сайти, що представляють інтерес для мутагенезу шляхом здійснення заміни, включають HVR та FR. Консервативні заміни наведені в таблиці 1 під заголовком

"переважні заміни". Більш суттєві зміни наведені в таблиці 1 під заголовком "типові заміни" і, як також описано нижче, в посиланні на класи бічних ланцюгів амінокислот. Заміни амінокислот можуть бути зроблені в антитілі, що представляє інтерес, а продукти можуть бути піддані скринінгу на бажану активність, наприклад, збереження/поліпшення зв'язування антигену, зниження імуногенності або покращення ADCC або CDC.

Таблиця 5

Початковий залишок	Типові заміни	Переважні заміни
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Амінокислоти можна згрупувати за загальними властивостями бічного ланцюга:

(1) гідрофобні: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) кислотні: Asp, Glu;

(4) лужні: His, Lys, Arg;

(5) залишки, що впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro;

(6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміни спричинять обмін члена одного з цих класів на член іншого класу.

Один тип варіантів заміни включає заміну одного або декількох залишків гіперваріабельної ділянки батьківського антитіла (наприклад, гуманізованого або людського антитіла). Як правило, отриманий(і) варіант(и), вибраний(і) для подальшого дослідження, матиме(уть) модифікації (наприклад, покращення) певних біологічних властивостей (наприклад, підвищену афінність, знижену імуногенність), як порівняти з батьківським антитілом, та/або будуть по суті зберігати певні біологічні властивості батьківського антитіла. Типовим суттєвим варіантом є антитіло зі зрілою афінністю, яке можна зручно генерувати, наприклад, використовуючи методи дозрівання афінності на основі фагового дисплея, як ті, що описані у цьому описі винаходу. Стисло кажучи, один або більше залишків HVR піддають мутації, а варіанти антитіл відображаються на фагах та піддаються скринінгу на певну біологічну активність (наприклад, афінність зв'язування).

У HVR можуть бути зроблені зміни (наприклад, заміни), наприклад, для поліпшення афінності антитіл. Такі зміни можуть бути зроблені в "гарячих точках мутагенезу" HVR, тобто в залишках, кодованих кодонами, які піддаються мутації з високою частотою в процесі соматичного дозрівання [дивись, наприклад, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)], та/або в залишках, що контактують з антигеном, при цьому отриманий варіант VH або VL тестується на афінність зв'язування. Дозрівання афінності шляхом побудови та повторного вибору з вторинних бібліотек було описано, наприклад, у [Hoogenboom et al. в Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).] У деяких варіантах дозрівання афінності забезпечують досягнення різноманітності у варіабельних генах, вибраних для дозрівання, за будь-яким із численних методів (наприклад, ПЛР з внесенням

помилок, перетасовка ланцюгів або спрямований на олігонуклеотиди мутагенез). Потім створюється вторинна бібліотека. Потім цю бібліотеку піддають скринінгу для ідентифікації будь-яких варіантів антитіл із бажаною афінністю. Інший метод забезпечення різноманітності включає підходи, спрямовані на HVR, при яких декілька залишків HVR (наприклад, 4-6 залишків одночасно) рандомізують. Залишки HVR, що беруть участь у зв'язуванні з антигеном, можуть бути специфічно ідентифіковані, наприклад, за допомогою аланін-скануючого мутагенезу або моделювання. CDR-H3 та CDR-L3 особливо часто є цільовими об'єктами.

У певних варіантах здійснення заміни, вставки або делеції можуть відбуватися в межах однієї або більше HVR, доки такі зміни істотно не зменшують здатність антитіла зв'язуватися з антигеном. Наприклад, консервативні зміни (наприклад, консервативні заміни, як передбачено у цьому описі винаходу), які істотно не зменшують афінність зв'язування, можуть бути зроблені в HVR. Такі зміни можуть, наприклад, бути у HVR поза залишками, що контактують з антигеном. У певних варіантах здійснення варіантів послідовностей VH і VL, наведених вище, кожна HVR або незмінена, або містить не більше однієї, двох або трьох амінокислотних замін.

Корисний метод ідентифікації залишків або ділянок антитіла, які можуть бути піддані мутагенезу, називається "аланін-скануючим мутагенезом", як описано у [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]. У цьому методі залишок або група цільових залишків (наприклад, заряджені залишки, такі як arg, asp, his, lys та glu) ідентифікуються та замінюються нейтральною або негативно зарядженою амінокислотою (наприклад, аланіном або поліаланіном) для визначення того, чи впливає це на взаємодію антитіла з антигеном. Подальші заміни можуть бути зроблені в місцях розташування цих амінокислот, що демонструє функціональну чутливість до початкових замін. Альтернативно або додатково можна проаналізувати кристалічну структуру комплексу антиген-антитіло для виявлення точок контакту між антитілом та антигеном. Такі контактуючі залишки та сусідні залишки можуть бути розглянуті як цільові кандидати на заміну або виключені з кандидатів на заміну. Варіанти можуть бути піддані скринінгу, щоб визначити, чи мають вони бажані властивості.

Вставки в амінокислотну послідовність включають аміно- та/або карбоксил-термінальні злиття довжиною від одного залишку до поліпептидів, що містять сотню або більше залишків, а також вставки всередині послідовності одного або декількох амінокислотних залишків. Приклади кінцевих вставок включають антитіло з N-кінцевим метіонільним залишком. Інші варіанти молекули антитіла зі вставками включають злиття на N- або C-кінці антитіла з ферментом (наприклад, для ADEPT (спрямованої на антитіла ферментно-пролікарської терапії)) або поліпептидом, який збільшує період напіввиведення антитіла в плазмі.

b) Варіанти глікозилювання

У деяких варіантах здійснення антитіло, передбачене в цьому винаході, змінюють для збільшення або зменшення ступеня, до якого антитіло глікозиловане. Додавання сайтів глікозилювання до антитіла або видалення їх може бути зручно здійснено шляхом здійснення змін в амінокислотній послідовності таким чином, що створюється або видаляється один або декілька сайтів глікозилювання.

Якщо антитіло включає Fc-ділянку, приєднаний до неї вуглевод може бути змінений. Власні антитіла, що продукуються клітинами ссавців, зазвичай включають розгалужений біантенарний олігосахарид, який, як правило, приєднаний N-зв'язком до Asn297 домену CH2 Fc-ділянки. Дивись, [наприклад, Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997)]. Олігосахарид може містити різні вуглеводи, наприклад, манозу, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), галактозу та сіалову кислоту, а також фукозу, приєднану до GlcNAc у "стовбурі" біантенарної олігосахаридної структури. В деяких варіантах можуть бути зроблені модифікації олігосахариду в антитілі за цим винаходом для того, щоб створити варіанти антитіла з певними поліпшеними властивостями.

В одному варіанті здійснення пропонуються варіанти антитіл, що мають вуглеводну структуру з нестачею фукози, приєднану (безпосередньо або опосередковано) до ділянки Fc. Наприклад, кількість фукози в таких антитілах може становити від 1 % до 80 %, від 1 % до 65 %, від 5 % до 65 % або від 20 % до 40 %. Кількість фукози визначається шляхом розрахунку середньої кількості фукози в межах цукрового ланцюга при Asn297 відносно суми всіх глікоструктур, приєднаних до Asn 297 (наприклад, комплексних, гібридних та високоманозних структур), що виміряється за допомогою мас-спектрометрії MALDI-TOF, як описано, наприклад, у [WO 2008/077546]. Asn297 означає аспарагін, розташований приблизно в позиції 297 в ділянці Fc (Європейська номенклатура залишків в ділянці Fc); однак Asn297 може також знаходитися приблизно на +/- 3 амінокислоти вище або нижче позиції 297, тобто між позиціями 294 і 300, завдяки незначним змінам в послідовності антитіл. Такі варіанти фукозилювання можуть забезпечити покращену функцію ADCC. Дивись, наприклад, [патентні публікації США № US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)]. Приклади публікацій,

що стосуються варіантів "дефукозильованих" або " фукоза-дефіцієнтних" антитіл, включають: [US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]. Приклади клітинних ліній, здатних продукувати дефукозильовані антитіла, включають клітини Lec13 CHO, дефіцієнтні стосовно фукозилювання білка [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); патентна публікація США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; і WO 2004/056312 A1, Adams et al., особливо у прикладі 11)], і нокаутні клітинні лінії, такі як нокаутні стосовно гена альфа-1,6-фукозилтрансферази, FUT8, клітини CHO [дивись, наприклад, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); і WO2003/085107)].

Варіанти антитіл забезпечують також розділеними олігосахаридами, наприклад, у яких біантенарний олігосахарид, приєднаний до Fc-ділянки антитіла, розділяється за допомогою GlcNAc. Такі варіанти антитіл можуть мати знижене фукозилювання та/або покращену функцію ADCC. Приклади таких варіантів антитіл описані, наприклад, в [WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патенті США № 6,602,684 (Umana et al.); і патентній публікації США 2005/0123546 (Umana et al.)]. Також пропонуються варіанти антитіл з щонайменше одним залишком галактози в олігосахариді, приєднаному до ділянки Fc. Такі варіанти антитіл можуть мати покращену функцію CDC. Такі варіанти антитіл описані, наприклад, в [WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.) і WO 1999/22764 (Raju, S.)].

c) Варіанти ділянки Fc

У певних варіантах здійснення одна або декілька модифікацій амінокислот можуть бути зроблені в ділянці Fc антитіла, передбаченого цим винаходом, тим самим генеруючи варіант ділянки Fc (який також може називатися "зміненою Fc-ділянкою"). Варіант Fc-ділянки може включати послідовність Fc-ділянки людини (наприклад, Fc-ділянку IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 людини), що має амінокислотну модифікацію (наприклад, заміну) в одній або декількох амінокислотних позиціях.

У певних варіантах здійснення цього винаходу передбачається варіант антитіла, який має деякі, але не всі ефекторні функції, що робить його бажаним кандидатом для застосувань, у яких період напіввиведення антитіла in vivo є важливим, але певні ефекторні функції (такі як комплементзалежна цитотоксичність та ADCC) непотрібні або шкідливі. Аналізи цитотоксичності in vitro та/або in vivo можуть бути проведені для підтвердження зменшення/виснаження CDC-активності та/або ADCC-активності. Наприклад, аналізи зв'язування з Fc-рецепторами (FcR) можуть бути проведені для того, щоб переконатись, що антитіло не має зв'язку з Fc-гамма-R (отже, ймовірно, не має ADCC-активності), але зберігає зв'язувальну активність стосовно FcRn. Первинні клітини для опосередкування ADCC, клітини-кілери, експресують лише Fc-гамма-RIII, тоді як моноцити експресують Fc-гамма-RI, Fc-гамма-RII та Fc-гамма-RIII. Експресія FcR на гемопоетичних клітинах узагальнена в таблиці 3 на сторінці 464 роботи Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Необмежувальні приклади аналізів in vitro для оцінки ADCC-активності молекули, що представляє інтерес, описані в патенті США № 5500362 [див., наприклад, Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) і Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (див. Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)]. Як альтернатива можуть застосовуватися методи нерадіоактивних аналізів (див., наприклад, нерадіоактивний тест цитотоксичності ACT1™ для проточної цитометрії (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA) та нерадіоактивний аналіз цитотоксичності CytoTox 96 (зареєстрована торговельна марка) (Promega, Медісон, штат Вісконсин)). Корисні ефекторні клітини для таких аналізів включають мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) та клітини-кілери (NK). Альтернативно або додатково ADCC-активність молекули, яка представляє інтерес, може бути оцінена in vivo, наприклад, на тваринній моделі, так як розкрито в [Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]. Аналізи зв'язування з C1q також можуть бути проведені для підтвердження того, що антитіло не здатне зв'язуватися з C1q і, отже, не має CDC-активності. Дивись, наприклад, ELISA зв'язування з C1q та C3c у [WO 2006/029879 та WO 2005/100402]. Для оцінки активації комплементу може бути проведений аналіз CDC [див., наприклад, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); і Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)]. Визначення зв'язування з FcRn та кліренсу/періоду напіввиведення in vivo також можна проводити, використовуючи методи, відомі в даній галузі [дивись, наприклад, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)].

Антитіла зі зниженою ефекторною функцією включають антитіла із заміною одного або

декількох залишків 238, 265, 269, 270, 297, 327 та 329 Fc-ділянки [патент США № 6,737,056]. Такі Fc-мутанти включають Fc-мутанти із замінами у двох або більше амінокислотних позиціях 265, 269, 270, 297 та 327, включаючи так званий "DANA" Fc-мутант із заміною залишків 265 та 297 на аланін [патент США № 7,323,281].

Описані певні варіанти антитіл із підвищеним або зниженим зв'язуванням з FcR. (Дивись, наприклад, [патент США № 6,737,056; WO 2004/056312, і Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).]

У певних варіантах здійснення варіант антитіла включає ділянку Fc з однією або декількома замінами амінокислот, які покращують ADCC, наприклад, заміни в позиціях 298, 333 та/або 334 ділянки Fc (за Європейською номенклатурою).

У певних варіантах здійснення робляться такі зміни в Fc-ділянці, що призводять до зміненого (тобто, підвищеного або зниженого) зв'язування з C1q та/або зміненої залежної від комплементу цитотоксичності (CDC), наприклад, як описано в [патенті США № 6,194,551, WO 99/51642, і Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)].

Антитіла із збільшеним періодом напіввиведення та підсиленим зв'язуванням з неонатальним Fc-рецептором (FcRn), який відповідає за передачу материнських IgG до плоду [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) і Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)], описані в патентний публікації [США № US2005/0014934A1 (Hinton et al.)]. Ці антитіла включають ділянку Fc з однією або декількома замінами в ній, які підвищують зв'язування ділянки Fc з FcRn. Такі варіанти Fc включають варіанти із замінами на одному або декількох залишках ділянки Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434, наприклад, заміною залишку 434 ділянки Fc [патент США № 7,371,826].

Дивись також [Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5,648,260; патент США № 5,624,821 і WO 94/29351] стосовно інших прикладів варіантів Fc-ділянки.

В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність стосовно кожного людського рецептора Fc-гамма (Fc-гамма-R) Fc-ділянки антитіла (включаючи варіант Fc-ділянки (те саме застосовується далі)) може бути виміряна за методом захоплення ліганду, використовуючи, наприклад, BIACORE (зареєстрована торговельна марка) T200, що базується на методі поверхневого плазмонного резонансу як принципі вимірювання.

Деталі типового методу вимірювання зв'язувальної активності Fc-ділянки антитіла стосовно різних людських рецепторів Fc-гамма (Fc-гамма-R) описані нижче. В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність Fc-ділянки антитіла стосовно Fc-гамма-R оцінюється за допомогою BIACORE (зареєстрована торговельна марка) T200. У переважному варіанті здійснення це вимірювання проводять при 25 градусах C, використовуючи такий буфер для вимірювання: 50 мМ фосфату, 150 мМ NaCl, 0,05 мас./об. % -P20, pH 7,4. Зокрема, приблизно 1000 RU антитіла, що включає варіант Fc-ділянки, спочатку фіксується на сенсорному чипі за допомогою CaptureSelect (торговельна марка) біотинового кон'югату людського Fab-лямбда для вимірювання кінетики [(Human Fab-lambda Kinetics Biotin Conjugate) (ThermoFisher scientific)], іммобілізованого як молекула, що захоплює ліганд. Людські Fc-гамма-R розбавляються буфером для вимірювання до 8 нМ для Fc-гамма-RIa та до 1000 нМ для інших Fc-гамма-R, і їм дозволяється зв'язатися із захопленим антитілом. Зв'язувальна активність кожного антитіла стосовно кожного Fc-гамма R оцінюється шляхом розрахунку кількості зв'язаного Fc-гамма R на одиницю кількості антитіла (RU) за допомогою програмного статку Biacore T200 Evaluation Software 2.0. В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність Fc-ділянки антитіла стосовно різних людських рецепторів Fc-гамма (Fc-гамма-R) може бути виміряна за способом, описаним у прикладі 7-4.

В одному переважному варіанті здійснення Fc-гамма-R, що використовується для описаного вище метода вимірювання, може бути позаклітинним доменом Fc-гамма-R, приготовленим за описаним нижче методом. По-перше, здійснюється синтез гена позаклітинного домену Fc-гамма-R за способом, відомим фахівцям в даній галузі. Для цього синтезу готуються послідовності кожного Fc-гамма-R на основі інформації, зареєстрованої в NCBI. Конкретніше, послідовність для Fc-гамма-RI готується на основі послідовності за номером доступу в NCBI#NM_000566.3, послідовність для Fc-гамма-RIIa готується на основі послідовності за номером доступу в NCBI#NM_001136219.1, послідовність для Fc-гамма-RIIb готується на основі послідовності за номером доступу в NCBI#NM_004001.3, а послідовність для Fc-гамма-RIIIa готується на основі послідовності за номером доступу в NCBI#NM_001127593.1, та His-tag додається до C-кінця. Поліморфні ділянки для Fc-гамма-RIIa підготовлені з посиланням на [J. Exp. Med., 1990, 172], 19-25 та поліморфні ділянки для Fc-гамма-RIIIa підготовлені з посиланням на [J. Clin. Invest., 1997, 100, 1059-1070]. Отримані фрагменти генів вставляють у вектор експресії для клітин тварин для отримання векторів експресії. Підготовлені вектори експресії

транзієнтно вводять у клітини FreeStyle293 (Invitrogen), що походять від ембріональних клітин раку нирок людини, і дозволяють білку, що представляє інтерес, експресуватися. Надосадову культуральну рідину збирають і фільтрують через 0,22 мікронний фільтр, а потім очищають, в основному, за чотири етапи, описані далі. Як перший етап проводиться катіонообмінна колонкова хроматографія [SP Sepharose FF]; як другий етап проводиться афінна колонкова хроматографія стосовно міток His (HisTrap HP); як третій етап проводиться гель-фільтраційна колонкова хроматографія (Superdex200); і як четвертий етап проводиться асептична фільтрація. Зауважимо, що для Fc-гамма-RI як першу стадію проводять аніонообмінну колонкову хроматографію з використанням Q-сефарози FF. Концентрація очищеного білка розраховується на основі коефіцієнта поглинання, розрахованого з використанням вимірювання поглинання при 280 нм із застосуванням спектрофотометра та програмного забезпечення PACE або подібного методу для вимірюваних величин [Protein Science, 1995, 4, 2411-2423].

В одному варіанті здійснення зв'язувальну активність Fc-ділянки антитіла стосовно FcRn людини можна виміряти за методом захоплення ліганду, використовуючи, наприклад, BIACORE (зареєстрована торговельна марка) T200, який ґрунтується на методах аналізу поверхневого плазмонного резонансу як принципі вимірювання.

Деталі типового методу вимірювання зв'язувальної активності Fc-ділянки антитіла стосовно FcRn людини описані нижче. В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність Fc-ділянки антитіла стосовно FcRn людини оцінюється за допомогою BIACORE (зареєстрована торговельна марка) T200. У переважному варіанті здійснення це вимірювання проводять при 25 градусах C, використовуючи такий буфер для вимірювання: 50 мМ фосфату, 150 мМ NaCl, 0,05 мас./об. % -P20, pH 6,0. Зокрема, приблизно 400 RU антитіла, що включає ділянку Fc, спочатку захоплюється на сенсорний чип, на якому був іммобілізований біотинований кон'югат людського Fab-лямбда для вимірювання кінетики CaptureSelect (торговельна марка) [Human Fab-lambda Kinetics Biotin Conjugate] [ThermoFisher scientific] як молекула, що захоплює ліганд, а потім людському FcRn, розведеному за допомогою буфера для вимірювань, дозволяють зв'язатися з ним. Зв'язувальна активність кожного антитіла стосовно FcRn оцінюється шляхом розрахунку KD (M) з використанням моделі стаціонарного стану та програмного статку Biacore T200 Evaluation Software 2.0. В одному переважному варіанті здійснення людський білок FcRn, використаний у цьому вимірюванні, отримують згідно з методом, описаним у посилальному прикладі 2 міжнародної публікації WO2010107110. В одному варіанті здійснення зв'язувальна активність Fc-ділянки антитіла стосовно різних FcRn людини може бути виміряна за способом, описаним у прикладі 7-5.

d) Варіанти модифікованих цистеїном антитіл

У деяких варіантах здійснення може бути бажаним створити модифіковані цистеїном антитіла, наприклад, "tioMAb" ("thioMAb"), в яких один або декілька залишків антитіла замінені цистеїновими залишками. У конкретних варіантах здійснення заміну залишків здійснюють у доступних сайтах антитіла. Замінюючи ці залишки цистеїном, реакційноздатні тіолові групи таким чином розташовуються в доступних сайтах антитіла і можуть використовуватися для кон'югації антитіла з іншими складовими, такими як лікарські речовини або складові типу лінкер-ліки, для створення імунокон'югату, як описано далі. У певних варіантах здійснення будь-який один або декілька з наступних залишків можуть бути замінені цистеїном: V205 (за нумерацією Кебота) легкого ланцюга; A118 (Європейська номенклатура) важкого ланцюга та S400 (Європейська номенклатура) Fc-ділянки важкого ланцюга. Антитіла, модифіковані цистеїном, можуть генеруватися, як описано, наприклад, у [патенті США № 7,521,541].

e) Похідні антитіла

У деяких варіантах здійснення антитіло, запропоноване цим винаходом, може бути додатково модифіковано, щоб містити додаткові непротеїнові складові, які відомі в даній галузі техніки і є легко доступними. Складові, підхожі для деривативізації антитіла, включають, але не обмежуються ними, водорозчинні полімери. Необмежувальні приклади водорозчинних полімерів включають, але не обмежуються ними, поліетиленгліколь (ПЕГ), сополімери етиленгліколю/пропіленгліколю, карбоксиметилцелюлозу, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, полі-1,3-діоксолан, полі-1,3,6-триоксан, співполімер етилену/малеїнового ангідриду, поліамінокислоти (або гомополімери, або випадкові співполімери) і декстран або полі(н-вінілпіролідон)поліетиленгліколь, гомополімери поліпропіленгліколю, співполімери оксиду поліпропілену/оксиду етилену, поліоксиетиловані поліоли (наприклад, гліцерин), полівініловий спирт та їх суміші. Пропіональдегід поліетиленгліколю може мати переваги у виробництві завдяки своїй стійкості у воді. Полімер може мати будь-яку молекулярну масу і може бути розгалуженим або нерозгалуженим. Кількість полімерів, приєднаних до антитіла, може варіюватися, і якщо приєднано більше одного полімеру, вони можуть бути однаковими або

різними молекулами. Взагалі, кількість та/або тип полімерів, що використовуються для дериватизації, можна визначити, виходячи з міркувань, що включають, але не обмежуються ними, конкретні властивості або функції антитіла, які слід поліпшити, якщо похідне антитіла буде застосовуватися в терапії за визначених умов, тощо.

В іншому варіанті здійснення пропонуються кон'югати антитіла та небілкової складової, яка може бути селективно нагріта шляхом опромінювання. В одному варіанті здійснення небілкова складова являє собою вуглецеву нанотрубку [Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)]. Випромінювання може мати будь-яку довжину хвилі і включає, але не обмежується ними, довжини хвиль, які не завдають шкоди звичайним клітинам, але які нагрівають небілкову складову до температури, при якій клітини, близькі до небілкової складової антитіл, вбиваються.

B. Рекомбінантні методи та композиції

Антитіла можуть вироблятися за допомогою рекомбінантних методів та композицій, наприклад, як описано в [патенті США № 4,816,567]. В одному варіанті здійснення пропонується виділена нуклеїнова кислота, що кодує антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137, описані у цьому описі винаходу. Така нуклеїнова кислота може кодувати амінокислотну послідовність, що включає VL антитіла, та/або амінокислотну послідовність, що включає VH антитіла (наприклад, легкий та/або важкий ланцюги антитіла). У ще одному варіанті здійснення пропонується один або більше векторів (наприклад, векторів експресії), що включають таку нуклеїнову кислоту. У ще одному варіанті здійснення передбачена клітина-хазяїн, що містить таку нуклеїнову кислоту. В одному з таких варіантів здійснення клітина-хазяїн містить (наприклад, була трансформована за допомогою): (1) вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що включає VL антитіла, і амінокислотну послідовність, що включає VH антитіла, або (2) перший вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що включає VL антитіла, і другий вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що включає VH антитіла. В одному варіанті здійснення клітина-хазяїн є еукаріотичною, наприклад клітиною яєчника китайського хом'ячка (CHO) або лімфоїдної клітиною (наприклад, клітиною Y0, NS0, Sp2/0). В одному варіанті здійснення пропонується спосіб одержання антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, причому спосіб передбачає культивування клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло, як передбачено вище, в умовах, відповідних для експресії антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 і, при необхідності, відділення антитіла від клітини-хазяїна (або культурального середовища клітин-хазяїнів).

Для рекомбінантного одержання антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло, наприклад, як описано вище, виділяють і вставляють в один або декілька векторів для подальшого клонування та/або експресії в клітині-хазяїні. Такі нуклеїнові кислоти можна легко виділити та секвенувати за допомогою звичайних процедур (наприклад, за допомогою олігонуклеотидних зондів, здатних специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіла).

Відповідні клітини-хазяїни для клонування або експресії векторів, що кодують антитіла, включають прокаріотичні або еукаріотичні клітини, описані у цьому описі винаходу. Наприклад, антитіла можуть вироблятися в бактеріях, зокрема, коли глікозилювання та ефекторна функція Fc не потрібні. Для експресії фрагментів антитіл та поліпептидів у бактеріях, дивись, наприклад, патенти США №№ 5,648,237, 5,789,199 і 5,840,523. [Дивись також Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003], pp. 245-254, що описують експресію фрагментів антитіл у E. coli.) Після експресії антитіло може бути виділено з клітинної пасти бактерій у розчинній фракції і може бути додатково очищено.

На додаток до прокаріотів, такі еукаріотичні мікроби, як ниткоподібні гриби або дріжджі, є відповідними для клонування або експресії хазяїнами для векторів, що кодують антитіла, включаючи гриби та штами дріжджів, шляхи глікозилювання яких були "гуманізовані", що призводить до продукування антитіла з частковим або повністю людським профілем глікозилювання. Див. [Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), і Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)].

Придатні для експресії глікозилованих антитіл клітини-хазяїни також походять від багатоклітинних організмів (безхребетних та хребетних). Приклади клітин безхребетних включають клітини рослин і комах. Виявлено багато штамів бакуловірусу, які можуть бути використані разом із клітинами комах, особливо для трансфекції клітин Spodoptera frugiperda.

Культури рослинних клітин також можуть бути використані як хазяїни. Дивись, наприклад, [патенти США №№ 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 і 6,417,429 (описана технології

PLANTIBODIES™ для отримання антитіл в трансгенних рослинах)].

Клітини хребетних можуть також використовуватися як хазяїни. Наприклад, клітинні лінії ссавців, які пристосовані для росту в суспензії, можуть бути корисними. Іншими прикладами корисних клітинних ліній ссавців є лінія CV1 нирки мавпи, трансформована SV40 (COS-7); ембріональна лінія нирок людини (клітини 293 або 293, як описано, наприклад, у [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]; клітини нирок новонародженого хом'ячка (BHK); мишачі клітини Сертолі (клітини TM4, як описано, наприклад, в [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))]; клітини нирок мавпи (CV1); клітини нирок африканської зеленої мавпи (VERO-76); клітини карциноми шийки матки людини (HELA); клітини нирок собак (MDCK); клітини печінки щурів (BRL 3A); клітини легенів людини (W138); клітини печінки людини (Hep G2); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562); клітини TRI, як описано, наприклад, в [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]; клітин MRC 5 і клітини FS4. Інші корисні лінії клітин-хазяїнів від ссавців включають клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), включаючи клітини DHFR-CHO [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]; та клітинні лінії мієломи, такі як Y0, NS0 та Sp2/0. Для огляду певних ліній клітин-хазяїнів від ссавців, придатних для виробництва антитіл, дивись, наприклад, [Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)].

C. Аналізи

Антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, запропоновані цим винаходом, можуть бути ідентифіковані, перевірені або охарактеризовані за їх фізичними/хімічними властивостями та/або біологічною активністю за допомогою різних аналізів, відомих в даній галузі техніки.

1. Аналізи зв'язування та інші аналізи

В одному аспекті антигензв'язувальна молекула або антитіло цього винаходу тестуються на їх антигензв'язувальну активність, наприклад, за відомими методами, такими як ELISA, вестерн-блот аналіз тощо.

В іншому аспекті конкурентний аналіз у присутності низькомолекулярної сполуки може бути використаний для того, щоб ідентифікувати антигензв'язувальну молекулу або антитіло, які конкурують за зв'язування з CD137 з антигензв'язувальними молекулами проти CD137 або антитілами проти CD137, що включають A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 і/або A549/B167, наведені в таблиці 17, як комбінацію варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга у присутності низькомолекулярної сполуки (наприклад, за наявності 10 мкМ або більше, 50 мкМ або більше, 100 мкМ або більше, 150 мкМ або більше, 200 мкМ або більше або 250 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки). У певних варіантах здійснення такі конкуруючі антигензв'язувальні молекули або антитіла зв'язуються з тим же самим епітопом (наприклад, лінійним епітопом або конформаційним епітопом), з яким зв'язуються антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, що включають A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 і/або A549/B167, наведені в таблиці 17, як комбінацію варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга. Детальні типові методи картографування епітопу, з яким зв'язуються антигензв'язувальна молекула або антитіло, представлені в [Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols, " в Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]. В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 за цим винаходом, що мають зв'язувальну активність стосовно CD137, яка залежить від низькомолекулярної сполуки, розпізнають епітоп, утворений комплексом, утвореним з антигену (наприклад, CD137) та низькомолекулярної сполуки (наприклад, ATP).

У типовому конкурентному аналізі з використанням антитіла іммобілізований CD137 інкубують у присутності низькомолекулярної сполуки (наприклад, за наявності 10 мкМ або більше, 50 мкМ або більше, 100 мкМ або більше, 150 мкМ або більше, 200 мкМ або більше або 250 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки) у розчині, що містить перше мічене антитіло, що зв'язується з CD137 (наприклад, антитіло проти CD137, що включає A375/B167, A372/B040, A356/B040, A486/B167, A487/B167, A488/B226, A489/B223, A548/B376, A551/B256, A551/B379, A555/B379, A548/B256 і/або A549/B167, наведені в таблиці 17, як комбінацію варіабельної ділянки важкого ланцюга/варіабельної ділянки легкого ланцюга, та друге немічене антитіло, яке перевіряється на здатність конкурувати з першим антитілом за зв'язування з CD137. Друге антитіло може бути присутнім у надосадовій рідині від гібридоми. Для контролю іммобілізований CD137 інкубують у розчині, що містить перше мічене антитіло, але не містить друге немічене антитіло. Після інкубації в умовах, що дозволяють першому антитілу зв'язатися з CD137,

надлишок незв'язаного антитіла видаляють і вимірюють кількісний показник мітки, пов'язаної з іммобілізованим CD137. Якщо кількісний показник мітки, пов'язаної з іммобілізованим CD137, істотно менший в досліджуваному зразку відносно контрольного зразка, то це вказує на те, що друге антитіло конкурує з першим антитілом за зв'язування з CD137. Дивись Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Фахівці в даній галузі розуміють, що аналіз можна проводити подібно до аналізу антигензв'язувальних молекул, відмінних від антитіл.

2. Аналізи активності

В одному аспекті пропонуються аналізи для виявлення біологічної активності антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137, що мають біологічну активність. Біологічна активність може включати, наприклад, CD137-агоністичну активність; період напіввиведення в плазмі; протипухлинну активність і низьку або пригнічену системну реакцію в тканинах, відмінних від пухлин. Також пропонуються антигензв'язувальні молекули або антитіла, що мають таку біологічну активність in vivo та/або in vitro.

У певних варіантах здійснення антигензв'язувальна молекула (наприклад, антигензв'язувальна молекула проти CD137) або антитіло за цим винаходом тестуються на таку біологічну активність.

а) Аналіз агоністичної активності (PBMC)

В одному варіанті здійснення агоністичну активність стосовно CD137 вимірюють шляхом контактування експресуючих CD137 клітин з антигензв'язувальною молекулою проти CD137 або антитілом проти CD137 у розчині, до якого додана або не додана низькомолекулярна сполука. В одному варіанті здійснення агоністична активність стосовно CD137 у розчині, до якого додана низькомолекулярна сполука, та агоністична активність стосовно CD137 у розчині, до якого низькомолекулярна сполука не додана, оцінюються, відповідно, за кількісним параметром виробництва цитокінів (наприклад, за кількісним параметром виробництва IL-2, IFN-γ та/або IL-6), що вимірюються в межах 18 годин, 24 годин, 36 годин, 48 годин або 72 годин після контактування у розчині клітини, що експресує CD137, та CD137-антигензв'язувальної молекули або антитіла. В одному варіанті здійснення розчин, в який додана низькомолекулярна сполука, коригують таким чином, щоб концентрація низькомолекулярної сполуки після коригування становила 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ. У подальшому варіанті здійснення клітини, які експресують CD137 і які будуть використовуватися, є виділеними мононуклеарними клітинами периферичної крові людини (PBMC) або підданими розмноженню Т-клітинами з виділених PBMC людини.

В одному варіанті здійснення використовують PBMC людини, які відділяють від крові, зібраної у здорових людей, шляхом центрифугування при 400 x g протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Переважно використовують людські PBMC, виділені на наступних двох етапах. На першому етапі Leucosep (Greiner Bio-One), доповнений Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare), центрифугують при 1000 x g протягом 1 хвилини при кімнатній температурі, потім додають кров, розбавлену PBS, і центрифугують при 400 x g протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. На другому етапі після того, як пухкий шар забирають з пробірки після центрифугування, його промивають 60 мл PBS (Wako).

Деталі типового методу вимірювання агоністичної активності стосовно CD137 за допомогою людських PBMC описані нижче. Слід зазначити, що навіть незважаючи на те, що в наведеному нижче прикладі для ілюстрації використовується ATP як низькомолекулярну сполуку, це не виключає інших низькомолекулярних сполук. В одному варіанті здійснення виділені PBMC людини розбавляються до щільності 5 x 10^6 клітин/мл культуральним середовищем (5 % сироватки людини (SIGMA), 95 % AIM-V (Thermo Fischer Scientific)). Потім, виділені людські PBMC приводять у контакт з антитілом проти людського CD3ε та/або антитілом проти людського CD28, завдяки чому в людських PBMC індукується експресія CD137. Переважно, щоб виділити людські PBMC (100 мкл при щільності 5x10^6 клітин/мл), до виділеного культурального середовища додають 50 мкл 0,04 мкг/мл антитіла проти людського CD3ε (BD Co., клон SP34) та 20 мкг/мл антитіла проти людського CD28 (BD, клон: CD28.2), розбавлених культуральним середовищем.

Потім до людських PBMC, до яких додано антитіло проти людського CD3ε та/або антитіло проти людського CD28, додатково додають (i) культуральне середовище з ATP або без нього та (ii) антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137. Переважно додають 25 мкл культурального середовища з ATP або без нього. Переважно додають 25 мкл антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 при 40 мкг/мл. Більш переважно, зазначені вище (i) та (ii) додають приблизно через 6 годин після контакту PBMC людини з антитілом проти людського CD3ε та/або антитілом проти людського CD28. В одному

варіанті здійснення, переважно, кількісний параметр виробництва IL-2 вимірюється перед вимірюванням кількісного параметра виробництва IFN-γ. В одному з варіантів кількісний параметр виробництва IL-2 вимірюється в межах приблизно 24 годин після контакту PBMC людини з антитілом проти людського CD3ε та/або антитілом проти людського CD28. Переважно кількісний параметр виробництва IL-2 вимірюється приблизно через 24 години після контакту людських PBMC з антитілом проти людського CD3ε та/або антитілом проти людського CD28 та приблизно через 18 годин після додавання антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137.

В іншому варіанті здійснення кількісний параметр виробництва IFN-γ вимірюється в межах приблизно 48 годин після контакту PBMC людини з антитілом проти людського CD3ε та/або антитілом проти людського CD28. Переважно, кількісний параметр виробництва IFN-γ вимірюється приблизно через 48 годин після контакту PBMC людини з антитілом проти людського CD3ε та/або проти людського CD28 і приблизно через 42 години після додавання антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137. В одному варіанті здійснення кількісний параметр виробництва IL-2 та/або кількісний параметр виробництва IFN-γ визначається/визначаються шляхом вимірювання кількісного параметра виробництва IL-2 та/або кількісного параметра виробництва IFN-γ у зібраній надосадовій культуральній рідині. В одному варіанті здійснення людські PBMC, до яких додано антитіло проти людського CD3ε та/або антитіло проти людського CD28, залишаються стояти в інкубаторі з 5 % CO_2 при 37 °C доти, поки не будуть завершені всі вимірювання.

Деталі подальшого типового методу вимірювання агоністичної активності стосовно CD137 за допомогою людських PBMC описані нижче. Виділені PBMC людини розбавляються до щільності 5x10^6 клітин/мл культуральним середовищем (5 % сироватки людини (SIGMA), 95 % AIM-V [Thermo Fischer Scientific)]. Потім людські PBMC коригують до щільності 5x10^6 клітин/мл і по 100 мкл кожного з них висівають у багатолунковий планшет з 96-лунками (з пласким дном, з кришкою) (Corning). Після цього PBMC людини піддають операції індукції експресії CD137. Наприклад, експресія CD137 у PBMC людини індукується додаванням 50 мкл 0,04 мкг/мл антитіла проти людського CD3ε (BD Co., клон SP34) та 20 мкг/мл антитіла проти людського CD28 (BD, клон: CD28.2), розбавлених культуральним середовищем.

Після індукції експресії CD137 в PBMC людини планшет струшують і залишають стояти протягом 6 годин при 37 °C в інкубаторі з 5 % CO_2. Потім в кожну лунку додають 25 мкл 2 мМ ATP (SIGMA), розбавленого середовищем, або лише середовище без ATP, і 25 мкл кожного антитіла при 40 мкг/мл, і планшет струшують і залишають стояти 18 годин при 37 °C в інкубаторі з 5 % CO_2. Потім збирають частину надосадової культуральної рідини і, використовуючи її, вимірюють кількість IL-2, що міститься в надосадовій культуральній рідині, за допомогою набору Human IL-2 DuoSet ELISA (R&D systems) або набору Human IL-2 ELISA Set (BD Biosciences) для проведення аналізу IL-2 людини. Планшет після збору надосадової культуральної рідини знову залишають стояти протягом 24 годин при температурі 37 °C знов-таки в інкубаторі з 5 % CO_2. Потім збирають частину надосадової культуральної рідини і вимірюють кількість IFN-γ, що міститься в надосадовій культуральній рідині, використовуючи набір Human IFN-γ DuoSet ELISA kit (R&D systems) або набір Human IFN-γ ELISA Development Kit (PeproTech) для проведення аналізу IFN-γ людини. ELISA в основному проводиться відповідно до протоколу, що додається до набору. Для набору Human IL-2 DuoSet ELISA kit (R&D systems) і набору Human IFN-γ DuoSet ELISA kit (R&D systems) розвиток забарвлювання та його припинення здійснюють відповідно до протоколу із застосуванням розчину субстрату (R&D systems), що містить H_2O_2 і тетраметилбензидин, та 1N H_2SO_4 (Wako). Для людського набору Human IL-2 ELISA Set (BD Biosciences) припинення забарвлювання проводять за допомогою 1N H_2SO_4 (Wako).

Для набору IFN-γ ELISA Development Kit (PeproTech) розвиток забарвлювання та його припинення здійснюють за допомогою розчину хромогену TMB Chromogen Solution (Thermo Fischer Scientific) та 1N H_2SO_4 (Wako). Потім вимірювання поглинання проводять за допомогою приладу EnVision (PerkinElmer) і розраховують кількості (пг/мл) IL-2 та IFN-γ у надосадовій культуральній рідині за допомогою калібрувальної кривої, підготовленої згідно з протоколом. У цьому аналізі з використанням PBMC агоністична активність стосовно CD137 може бути виражена як кратність зміни кількості IL-2 та IFN-γ в надосадовій культуральній рідині, як порівняти з кількістю негативного контрольного антитіла (антитіла, яке не зв'язується з CD137). В одному варіанті здійснення агоністичну активність стосовно CD137 вимірюють згідно з методами, описаними в прикладах 5-5-1 і 5-5-2.

В одному варіанті здійснення, коли агоністичну активність стосовно CD137 оцінюють за кількісним параметром виробництва цитокінів (наприклад, кількісним параметром виробництва

IL-2, IFN-γ та/або IL-6) в аналізі PBMC людини, антигензвязувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 можуть бути оцінені як такі, що проявляють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки, якщо кількісний параметр виробництва цитокінів у присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки при додаванні антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 є вищим у 1,01 раза або більше, 1,02 раза або більше, 1,03 раза або більше, 1,05 раза або більше, 1,06 раза або більше, 1,07 раза або більше, 1,08 раза або більше, 1,09 раза або більше, 1,1 раза або більше, 1,11 раза або більше, 1,12 раза або більше, 1,13 раза або більше, 1,14 раза або більше або 1,15 раза або більше, 1,5 раза або більше, 2 рази або більше або 3 рази або більше, як порівняти з кількісним параметром виробництва цитокінів, коли додається антитіло негативного контролю.

В одному варіанті здійснення, коли агоністичну активність стосовно CD137 оцінюють за кількісним параметром виробництва IL-2 в аналізі PBMC людини, антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 можуть бути оцінені як такі, що проявляють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки, якщо кількісний параметр виробництва IL-2 у присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки при додаванні антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 є вищим у 1,01 раза або більше, 1,02 раза або більше, 1,03 раза або більше, або 1,05 раза або більше і є вищим у 1,05 раза або більше у переважному варіанті, як порівняти з кількісним параметром виробництва IL-2, коли додається антитіло негативного контролю.

В одному варіанті здійснення, коли агоністичну активність стосовно CD137 оцінюють за кількісним параметром виробництва IFN-γ в аналізі PBMC людини, антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 можуть бути оцінені як такі, що проявляють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки, якщо кількісний параметр виробництва IFN-γ у присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки при додаванні антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 є вищим у 1,1 раза або більше, 1,11 раза або більше, 1,12 раза або більше, 1,13 раза або більше, 1,14 раза або більше або 1,15 раза або більше і є вищим у 1,15 раза або більше у переважному варіанті, як порівняти з кількісним параметром виробництва IFN-γ при додаванні антитіла негативного контролю.

У ще одному варіанті здійснення, з-поміж антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137, які оцінені як такі, що виявляють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки, як це було визнано у вищезазначеному порівнянні з негативним контролем, далі визначають антитіла, які оцінюють як такі, що не виявляють агоністичну активність стосовно CD137 або мають меншу агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки (як порівняти з агоністичною активністю у присутності низькомолекулярної сполуки). Зокрема, коли наступне (ii) більше, ніж (i), тоді антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137 оцінюють як такі, що не проявляють агоністичної активності стосовно CD137 або мають меншу агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки:

(i) [кількісний параметр виробництва цитокінів за відсутності низькомолекулярної сполуки при додаванні антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137]/[кількісний параметр виробництва цитокінів за відсутності низькомолекулярної сполуки при додаванні антитіла негативного контролю],

(ii) [кількісний параметр виробництва цитокінів у присутності низькомолекулярної сполуки при додаванні антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137]/[кількісний параметр виробництва цитокінів у присутності низькомолекулярної сполуки при додаванні антитіла негативного контролю].

В іншому варіанті здійснення, коли агоністичну активність стосовно CD137 першої антигензв'язувальної молекули проти CD137 або першого антитіла проти CD137 та другої антигензв'язувальної молекули проти CD137 або другого антитіла проти CD137 порівнюють, використовуючи кількісний параметр виробництва цитокінів (наприклад, кількісний параметр виробництва IL-2, IFN-γ та/або IL-6) в аналізі PBMC людини, перша антигензв'язувальна молекула проти CD137 або перше антитіло проти CD137 можуть бути оцінені як такі, що мають вищу агоністичну активність, ніж друга антигензв'язувальна молекула проти CD137 або друге антитіло проти CD137, якщо (i) кількісний параметр виробництва цитокінів при додаванні першої антигензв'язувальної молекули проти CD137 або першого антитіла проти CD137 в присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки є вищим у 1,01 раза або більше, 1,02 раза або більше, 1,03 раза або більше, 1,04 раза або більше, 1,05

раза або більше, 1,06 раза або більше, 1,07 раза або більше, 1,08 раза або більше, 1,09 раза або більше, 1,1 раза або більше, 1,11 раза або більше, 1,12 раза або більше, 1,13 раза або більше, 1,14 раза або більше, або 1,15 раза або більше, 1,5 раза або більше, у 2 рази або більше або в 3 рази або більше, як порівняти з (ii) кількісним параметром виробництва цитокінів, коли другу антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або друге антитіло проти CD137 додають за тих же самих умов.

В одному варіанті здійснення, коли агоністичну активність стосовно CD137 оцінюють за кількісним параметром виробництва IL-2 в аналізі PBMC людини, перша антигензв'язувальна молекула проти CD137 або перше антитіло проти CD137 можуть бути оцінені як такі, що мають більш високу агоністичну активність, ніж друга антигензв'язувальна молекула проти CD137 або друге антитіло проти CD137, якщо (i) кількісний параметр виробництва цитокінів при додаванні першої антигензв'язувальної молекули проти CD137 або першого антитіла проти CD137 у присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки є вищим у 1,01 раза або більше, 1,02 раза або більше, 1,03 раза або більше або 1,04 раза або більше або є вищим у 1,04 раза або більше у переважному варіанті, як порівняти з (ii) кількісним параметром виробництва IL-2, коли другу антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або друге антитіло проти CD137 додають за тих же самих умов.

В одному варіанті здійснення, коли агоністичну активність стосовно CD137 оцінюють за кількісним параметром виробництва IFN-γ в аналізі PBMC людини, перша антигензв'язувальна молекула проти CD137 або перше антитіло проти CD137 можуть бути оцінені як такі, що мають більш високу агоністичну активність, ніж друга антигензв'язувальна молекула проти CD137 або друге антитіло проти CD137, якщо (i) кількісний параметр виробництва цитокінів при додаванні першої антигензв'язувальної молекули проти CD137 або першого антитіла проти CD137 у присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки є вищим у 1,05 раза або більше, 1,06 раза або більше, 1,07 раза або більше, 1,08 раза або більше, 1,09 раза або більше або 1,1 раза або більше, або є вищим у1,1 раза або більше у переважному варіанті, як порівняти з (ii), коли другу антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або друге антитіло проти CD137 додають за тих же самих умов. В одному варіанті здійснення перша антигензв'язувальна молекула антитіла проти CD137 або перше антитіло проти CD137 являють собою антигензв'язувальну молекулу або антитіло, що включають батьківську ділянку Fc, а друга антигензв'язувальна молекула проти CD137 являє собою антигензв'язувальну молекулу або антитіло, що включають варіант ділянки Fc.

В одному варіанті здійснення метод, описаний у прикладах 5-5-1 і 5-5-2, може бути використаний для вимірювання агоністичної активності стосовно CD137 з використанням людських PBMC, а метод, описаний у прикладі 2-6, може бути використаний для вимірювання агоністичної активності стосовно CD137 з використанням підданих розмноженню Т-клітин з виділених PBMC людини.

В одному варіанті здійснення агоністичну активність стосовно CD137 можна виміряти шляхом контактування CD8-позитивних або CD4-позитивних Т-клітин, виділених з PBMC людини, з антигензв'язувальною молекулою проти CD137 або антитілом проти CD137 у розчині, до якого додана або не додана низькомолекулярна сполука. Одночасно можна ще додати до розчину клітини, що експресують FcγRIIb. Альтернативно, агоністичну активність стосовно CD137 можна виміряти шляхом контактування В-клітин (які можуть бути виділені з людських PBMC, або може бути використана відома лінія В-клітин) з антигензв'язувальною молекулою проти CD137 або антитілом проти CD137. В одному варіанті здійснення агоністичну активність стосовно CD137 можна оцінити за кількісним параметром виробництва цитокінів (наприклад, кількістю IL-2, IFN-γ та/або кількісним параметром виробництва IL-6), який вимірюють після контактування в розчині CD8-позитивних Т-клітин, CD4-позитивних Т-клітин або В-клітин з антигензв'язувальною молекулою проти CD137 або антитілом проти CD137.

В одному варіанті здійснення аналізи агоністичної активності з використанням мононуклеарних клітин периферичної крові людини (PBMC), яких відділяють від крові, зібраної у здорових людей. Таким чином, у будь-якому з вищевказаних варіантів здійснення, фахівцям в даній галузі зрозуміло, що результати аналізів з використанням цих аналізів можуть відрізнятися залежно від зразка крові кожного донора. Беручи до уваги цей момент, антитіла, агоністична активність яких стосовно CD137 не виявляється для частини або більшості людських PBMC, узятих від декількох донорів, не можуть вважатись такими, що проявляють агоністичну активність стосовно CD137, навіть незважаючи на те, що критерії агоністичної активності виконуються при використанні іншої частини людських PBMC. Крім того, коли аналіз згідно з описаним вище методом проводиться на людських PBMC, узятих від численних донорів, і критерії агоністичної активності стосовно CD137 виконуються у більшості донорів,

можна дати оцінку, що проявляється агоністична активність стосовно CD137. Альтернативно, коли аналіз згідно з вищеописаним методом виконується на людських PBMC, узятих від численних донорів, середнє значення або медіана отриманих в аналізі значень (наприклад, кількісний параметр виробництва IL-2, IFN-γ та/або IL-6) можуть бути використані для визначення наявності або відсутності агоністичної активності стосовно CD137. В одному варіанті здійснення, коли аналіз проводять згідно з вищезазначеним методом на людських PBMC, узятих від численних донорів, кількість донорів становить, наприклад, 2 або більше, 3 або більше, 4 або більше, 5 або більше, 10 або більше, 15 або більше або 20 або більше.

b) Аналіз агоністичної активності (аналіз з використанням репортерного гена)

В одному варіанті здійснення агоністичну активність стосовно CD137 оцінюють за допомогою аналізу з використанням репортерного гена у розчині, в який додають або не додають низькомолекулярну сполуку. В одному варіанті здійснення агоністичну активність стосовно CD137 у розчині, до якого додана низькомолекулярна сполука, та агоністичну активність стосовно CD137 у розчині, до якого низькомолекулярна сполука не додана, оцінюють відповідним чином за люмінесцентним сигналом люциферази, виміряним після контактування Т-клітин, що експресують репортерну конструкцію NF-каппаВ-люцифераза та CD137, з антигензв'язувальною молекулою проти CD137, і залишають стояти певний час у відповідному розчині. В одному варіанті здійснення розчин, в який додана низькомолекулярна сполука, коригують таким чином, щоб концентрація низькомолекулярної сполуки після коригування становила 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ. Т-клітини, що експресують репортерну конструкцію NF-каппаВ-люцифераза та CD137, переважно є клітинною лінією GloResponse™ NF-kappaB-Luc2/4-1BB Jurkat [Promega, CS196004].

Деталі типового методу вимірювання агоністичної активності стосовно CD137 за допомогою аналізу з використанням репортерного гена описані нижче. У наступних прикладах ATP використовується як приклад низькомолекулярної сполуки, але не виключаються інші низькомолекулярні сполуки. В одному варіанті здійснення спочатку клітини, що експресують FcγRIIB, доводять до щільності $5x10^4$ клітин/мл з використанням середовища (культуральне середовище CHO (90 % Ham's F12, 10 % FBS)) і залишають стояти на ніч при 37 °C у інкубаторі з 5 % CO_2. В одному варіанті здійснення як клітини, що експресують FcgRIIB, можуть використовуватися не тільки клітини, які примушені експресувати FcgRIIB, але також й клітинні лінії, які ендогенно експресують FcgRIIB, такі як лінії В-клітин, В-клітини, виділені з живого організму, тощо. У переважному варіанті здійснення клітини, що експресують FcγRIIB, є клітинами FcγRIIB CHO-K1 (Promega). Далі, після видалення середовища шляхом аспірації, клітинна лінія GloResponse™ NF-kappaB-Luc2/4-1BB Jurkat (далі "4-1BB Jurkat") коригується до $2x10^6$ клітин/мл за допомогою додавання іншого середовища (99 % RPMI, 1 % FBS). У переважному варіанті здійснення на 200 мкл клітин, що експресують FcγRIIB, скоригованих за допомогою середовища, додається 25 мкл клітин клітинної лінії GloResponse™ NF-kappaB-Luc2/4-1BB Jurkat, скоригованих за допомогою середовища. Потім додають по 25 мкл кожної антигензв'язувальної молекули проти CD137, розбавленої вищезазначеним середовищем (99 % RPMI, 1 % FBS) для досягнення бажаної концентрації (наприклад, кінцева концентрація становить 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 мкг/мл), і далі додають 25 мкл розчину ATP, розбавленого вищезгаданим середовищем (99 % RPMI, 1 % FBS) для досягнення бажаної концентрації (наприклад, кінцева концентрація становить 0, 10, 50, 100, 150, 200, 250 мкМ). В одному варіанті здійснення люмінесцентний сигнал люциферази вимірюється після настоювання протягом 2 годин або менше, 4 годин або менше, 6 годин або менше, 24 годин або менш, після додавання антигензв'язувальної молекули проти CD137 до 4-1BB Jurkat. У переважному варіанті здійснення 4-1BB Jurkat залишають стояти при 37 °C протягом 6 годин у інкубаторі з 5 % CO_2. Після стояння додають 75 мкл реагенту Bio-Glo і вимірюють люмінесценцію за допомогою планшет-ридера. В одному переважному варіанті здійснення реагентом Bio-Glo є система Bio-Glo Luciferase Assay System (буфер і субстрат). В одному варіанті здійснення для того, щоб підтримувати температуру постійною під час реакції, 4-1BB Jurkat можна залишити стояти при кімнатній температурі протягом 5 хвилин, 10 хвилин, 15 хвилин або 20 хвилин після вилучення з інкубатора. У переважному варіанті здійснення 4-1BB Jurkat залишають стояти при кімнатній температурі протягом 15 хвилин після вилучення з інкубатора. В одному варіанті здійснення значення люмінесценції 4-1BB Jurkat з доданою антигензв'язувальною молекулою проти CD137 ділиться на значення люмінесценції 4-1BB Jurkat без антигензв'язувальної молекули проти CD137, і ця величина приймається за кратність індукції (відносну світлову одиницю) і використовується як показник оцінки агоністичної активності стосовно CD137 кожної антигензв'язувальної молекули.

Наступний типовий метод вимірювання агоністичної активності стосовно CD137 за

допомогою аналізу з використанням репортерного гена описаний нижче. Кожні 200 мкл клітин FcγRIIB CHO-K1 (Promega), доведених до щільності $5x10^4$ клітин/мл за допомогою середовища, додають до кожної лунки 96-лункового планшета і залишають стояти при 37 °C протягом ночі у інкубаторі з 5 % CO_2. Як культуральне середовище використовують культуральне середовище CHO (90 % Ham's F12 (середовище Хема), 10 % FBS). Далі, після повного видалення середовища шляхом аспірації до кожної лунки додають 25 мкл клітинної лінії GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat, доведеної до 2 x 10^6 клітин/мл за допомогою середовища для аналізу (99 % RPMI, 1 % FBS). Потім додають 25 мкл кожного з кожного розчину антигену, розбавленого середовищем для аналізу до кінцевої концентрації 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 мкг/мл, і, нарешті, додають 25 мкл розчину ATP, розбавленого середовищем для аналізу до 0 або 250 мкМ. Після того, як планшет залишили стояти протягом 6 годин при 37 °C у інкубаторі з 5 % CO_2, його залишили стояти при кімнатній температурі протягом 15 хвилин і до кожної лунки додали 75 мкл реагенту Bio-Glo. Як реагент Bio-Glo може бути використана, наприклад, система аналізу з люциферазою Bio-Glo Luciferase Assay System (буфер і субстрат). Після цього вимірюють люмінесценцію кожної лунки за допомогою планшет-ридера. Величина, одержана діленням значення люмінесценції кожної лунки на значення люмінесценції лунки, до якої не було додане антитіло, визначається за кратність індукції. У аналізі з використанням репортерного гена агоністичну активність стосовно CD137 можна оцінити як кратність зміни (відносна світлова одиниця) люмінесценції лунок, до яких було додане кожне антитіло, проти значення люмінесценції лунок, до яких не було додане антитіло.

Наступний типовий метод вимірювання агоністичної активності стосовно CD137 за допомогою аналізу з використанням репортерного гена описаний нижче. До кожної лунки 384-лункового планшета додають 10 мкл клітин FcγRIIB CHO-K1 (Promega), доведених до щільності $2x10^6$ клітин/мл з використанням середовища для аналізу (99 % RPMI, 1 % FBS). Потім до кожної лунки додають 10 мкл або розчину антитіла, що містить ADP, або розчину антитіла, що містить ATP, або розчину антитіла, що не містить ATP або ADP. Потім до кожної лунки додають 10 мкл клітинної лінії GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat, скоригованої до $2x10^6$ клітин/мл за допомогою середовища для аналізу (99 % RPMI, 1 % FBS). Кінцева концентрація ADP становить 50 мкМ, і кінцева концентрація ATP становить 50 мкМ. Після того, як планшет залишили стояти при температурі 37 °C протягом 6 годин у інкубаторі з 5 % CO_2, його залишили стояти при кімнатній температурі протягом 15 хвилин і до кожної лунки додали 30 мкл реагенту Bio-Glo. Як реагент Bio-Glo використовували систему аналізу з люциферазою Bio-Glo Luciferase Assay System (буфер і субстрат). Після цього вимірюють люмінесценцію кожної лунки за допомогою планшет-ридера. Агоністичну активність стосовно CD137 можна оцінити за відносною світловою одиницею (також називається кратністю люмінесценції або кратністю зміни) люмінесценції лунок, до яких було додане антитіло, проти люмінесценції лунок, до яких не було додане антитіло.

Наступний типовий метод вимірювання агоністичної активності стосовно CD137 за допомогою аналізу з використанням репортерного гена описаний нижче. До кожної лунки 384-лункового планшета додають 10 мкл клітин FcγRIIB CHO-K1 (Promega), доведених до щільності $4x10^5$ клітин/мл з використанням середовища для аналізу (99 % RPMI, 1 % FBS). Потім до кожної лунки додають 10 мкл або розчину антитіла, що містить ADP, або розчину антитіла, що містить ATP, або розчину антитіла, що не містить ATP або ADP. Потім до кожної лунки додають 10 мкл клітинної лінії GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat, скоригованої до $2x10^6$ клітин/мл за допомогою середовища для аналізу (99 % RPMI, 1 % FBS). Кінцева концентрація ADP становить 10 мкМ, і кінцева концентрація ATP становить 10 мкМ. Після того, як планшет залишили стояти при температурі 37 °C протягом 6 годин у інкубаторі з 5 % CO_2, його залишили стояти при кімнатній температурі протягом 15 хвилин і до кожної лунки додали 30 мкл реагенту Bio-Glo. Як реагент Bio-Glo використовували систему аналізу з люциферазою Bio-Glo Luciferase Assay System (буфер і субстрат). Після цього вимірюють люмінесценцію кожної лунки за допомогою планшет-ридера. Агоністичну активність стосовно CD137 можна оцінити за відносною світловою одиницею (також називається кратністю люмінесценції або кратністю зміни) люмінесценції лунок, до яких було додане антитіло, проти люмінесценції лунок, до яких не було додане антитіло.

В одному варіанті здійснення, коли агоністичну активність стосовно CD137 вимірюють за допомогою аналізу з використанням репортерного гена, антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 можуть бути оцінені як такі, що проявляють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності низькомолекулярної сполуки, якщо (i) агоністична активність стосовно CD137 (відносна світлова одиниця) у присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки є вищою у 1,1 раза або більше, 1,2

раза або більше, 1,3 раза або більше, 1,5 раза або більше, 2 рази або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 60 разів або більше, 70 разів або більше, 80 разів або більше або 90 разів або більше, як порівняти з (ii) агоністичною активністю стосовно CD137 (відносна світлова одиниця) за відсутності низькомолекулярної сполуки. В одному варіанті здійснення кінцева концентрація антитіла у вищевказаних (i) та (ii) становить 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 або 10 мкг/мл, а в переважному варіанті вона становить 0,1 мкг/мл або 1 мкг/мл.

У подальшому варіанті здійснення, коли антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 додаються при специфічній концентрації (наприклад, при кінцевій концентрації у 0,001, 0,01, 0,1, 1 або 10 мкг/мл, або у переважному варіанті здійснення 0,1 мкг/мл або 1 мкг/мл), антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 оцінюються як такі, що практично не виявляють агоністичної активності стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки, якщо кратність індукції (відносна світлова одиниця) за відсутності низькомолекулярної сполуки становить 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, або у переважному варіанті здійснення становить 5 або менше, і у більш переважному варіанті здійснення - по суті 1. В одному варіанті здійснення "кратність індукції (відносна світлова одиниця) за відсутності низькомолекулярної сполуки становить по суті 1" означає випадки, коли кратність індукції (відносна світлова одиниця) за відсутності низькомолекулярної сполуки є меншою ніж 2, меншою ніж 1,9, меншою ніж 1,8, меншою ніж 1,7, меншою ніж 1,6, меншою ніж 1,5, меншою ніж 1,4, меншою ніж 1,3, менше 1,2 або меншою ніж 1,1.

c) Концентрація в плазмі

В одному варіанті здійснення кінетичні характеристики у крові антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 за цим винаходом вимірюють та/або порівнюють із використанням мишей з нокіном людського CD137. Миша з нокіном людського CD137 готується, наприклад, шляхом заміни гена CD137 миші геном CD137 людини шляхом введення вектора заміщення гена CD137 людини в ембріональні стовбурові клітини миші (клітини ES). В одному варіанті здійснення антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137 за цим винаходом одноразово вводять внутрішньовенно мишам з нокіном людського CD137, а кров беруть багаторазово протягом періоду часу від безпосередньо після введення до приблизно 5 днів, 10 днів, 15 днів, 20 днів, 25 днів або 30 днів після введення. У переважному варіанті здійснення антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137 за цим винаходом одноразово вводять внутрішньовенно мишам з нокіном людського CD137, а кров беруть багаторазово протягом періоду часу від 5 хвилин до 28 днів після введення. Плазму швидко відділяють від зібраної крові і концентрацію антитіл у плазмі вимірюють за електрохемілюмінесценцією (ECL). В одному варіанті здійснення концентрацію антитіла в плазмі можна виміряти за методом, описаним у прикладі 6-3-2.

При вимірюванні періоду напіввиведення у плазмі з використанням миші з нокіном людського CD137, якщо антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 зникають з плазми повільніше, ніж контрольна молекула, то антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 вважаються такими, що мають більш поліпшену кінетику в крові, ніж контрольна молекула. Крім того, якщо антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, які мають зв'язувальну активність, залежну від низькомолекулярної сполуки (свіч-молекула або свіч-антитіло), зникають з плазми повільніше, ніж антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137, що не мають залежної від низькомолекулярної сполуки активності (нон-свіч-молекула або нон-свіч-антитіло), можна зробити висновок, що свіч-молекула (або свіч-антитіло) не зв'язується з CD137, експресованим у непухлинній тканині, як порівняти з нон-свіч-молекулою (нон-свіч-антитілом).

d) Протипухлинна активність

В одному аспекті антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137 за цим винаходом випробовують на їхню здатність пригнічувати ріст або проліферацію клітин in vivo. У деяких варіантах здійснення антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137 за цим винаходом випробовують на їхню здатність пригнічувати ріст пухлини in vivo. Для таких випробувань можуть використовуватися моделі in vivo, такі як алотрансплантаційні моделі або ксенотрансплантаційні моделі. У типовій системі ксенотрансплантації клітини пухлини людини вводяться у відповідну імунодефіцитну тварину, що не є людиною, наприклад, безтимусну "голу" мишу. Антитіло за цим винаходом вводять цій тварині. Вимірюють здатність антитіла пригнічувати або зменшувати ріст пухлини. У певних варіантах здійснення вищезазначеної системи ксенотрансплантації клітини пухлини людини є клітинами пухлини від пацієнта-людини. Такі моделі ксенотрансплантації комерційно доступні від компанії Oncotest GmbH (Фрайбург, Німеччина). У певних варіантах здійснення клітини

пухлини людини вводять у відповідну імунодефіцитну тварину, яка не є людиною, підшкірною ін'єкцією або шляхом трансплантації в підхоже місце, таке як жирова подушечка молочної залози.

В одному варіанті здійснення протипухлинну активність антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137 за цим винаходом можна виміряти та/або порівняти, використовуючи модель трансплантації сингенної пухлинної клітини на основі описаних вище мишей з нокіном CD137 людини. Клітинна лінія раку для використання в цьому тесті може бути вибрана відповідним чином, але переважно це клітинна лінія раку товстої кишки миші - клітинна лінія MC38. В одному варіанті здійснення клітинна лінія MC38 трансплантується під шкіру в черевній ділянці миші, і вважається, що модель встановлена, коли об'єм пухлини досягає приблизно 50-300 мм^3. Після встановлення моделі, мишей з трансплантованими клітинами MC38 групують і їм роблять введення кожної антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137. В одному варіанті здійснення вимірювання об'єму пухлини проводиться з періодичністю від одного до двох разів на тиждень для оцінювання протипухлинної активності. Об'єм пухлини розраховується за наступним рівнянням: об'єм пухлини = (велика вісь x мала вісь x мала вісь)/2. В одному варіанті здійснення протипухлинна активність антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137 може бути протестована та оцінена за методом, описаним у прикладі 6-4.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 визнаються такими, що виявляють протипухлинну активність, коли об'єм пухлини в групі, якій вводили антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137, менший, ніж у групі, якій вводили носій, або коли збільшення об'єму пухлини в групі, якій вводили антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137, менше, ніж у групі, якій вводили носій.

е) Системна реакція

В одному варіанті здійснення системну реакцію на антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 згідно з цим винаходом вимірюють та/або порівнюють, використовуючи модель трансплантації сингенної пухлинної клітини на основі описаних вище мишей з нокіном CD137 людини. Органи для вимірювання системної реакції можуть бути вибрані відповідним чином, але переважно це печінка, селезінка та/або лімфатичні вузли. В одному варіанті здійснення системна реакція оцінюється шляхом вилучення печінки, селезінки та/або лімфатичних вузлів з мишей з нокіном CD137 людини у відповідний час після введення антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137. Коли органом для вилучення є селезінка та/або лімфатичні вузли, орган зважують та/або підраховують клітини у фракції лімфоцитів. При підрахунку, переважно, для селезінки використовують фракцію лімфоцитів після гемолізу, а для лімфатичних вузлів використовують фракцію лімфоцитів, отриману гомогенізацією. Коли органом для вилучення є печінка, підраховують клітини у фракції лімфоцитів, отриманій за допомогою набору для дисоціації печінки миші (Liver dissociation kit, mouse) (Milteny Biotec). Крім того, аналіз Т-клітин може проводитись за допомогою проточної цитометрії (FCM) на фракції лімфоцитів від кожного органу (печінки, селезінки та/або лімфатичних вузлів). В аналізі FCM, наприклад, використовується експресія Grazyme B, або експресія PD-1, або експресія ICOS у CD8-альфа-позитивних Т-клітинах, або використовується відношення CD8-альфа-позитивних Т-клітин до CD45-позитивних клітин. В одному варіанті здійснення системна реакція на антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 може бути протестована та оцінена за методом, описаним у прикладі 6-4.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 визнаються такими, що викликають пригнічену системну реакцію та/або пригнічену активацію імунних клітин у непухлинних тканинах (наприклад, печінки, селезінки та/або лімфатичних вузлів), як порівняти з контрольною молекулою, коли група, якій вводили антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137, демонструє нижчі значення при оцінюванні вищеописаних різних показників, ніж група, якій вводили таку ж кількість контрольної молекули. Крім того, коли група, якій вводили антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137, що мають зв'язувальну активність, залежну від низькомолекулярної сполуки (свіч-молекули або свіч-антитіла), демонструє нижчі значення при оцінюванні вищеописаних різних показників, ніж група, якій вводили таку ж кількість антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, які не мають залежної від низькомолекулярної сполуки зв'язувальної активності (нон-свіч-молекула або нон-свіч-антитіло), тоді свіч-молекула (або свіч-антитіло) визнається як таке, що викликає пригнічення системної реакції та/або пригнічення активації імунних клітин у непухлинних тканинах (наприклад, печінки, селезінки та/або лімфатичних вузлів), як порівняти з нон-свіч-молекулою

(або нон-свіч-антитілом).

Слід розуміти, що будь-який із описаних вище методів вимірювання може бути здійснений з використанням імунокон'югатів цього винаходу замість або на додаток до антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137.

D. Імунокон'югати

Цим винаходом також пропонуються імунокон'югати, що включають антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137 кон'юговані з одним або декількома цитотоксичними агентами, такими як хіміотерапевтичні агенти або лікарські засоби, засоби, що пригнічують ріст, токсини (наприклад, білкові токсини, ферментативно активні токсини бактеріального, грибкового, рослинного або тваринного походження або їх фрагменти) або радіоактивні ізотопи.

В одному варіанті здійснення імунокон'югат являє собою кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC), в якому антитіло кон'юговане з одним або декількома лікарськими засобами, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, майтанзиноїд [дивись патенти США №№ 5,208,020, 5,416,064 та європейський патент ЄР 0 425 235 В1]; ауристатин, такий як монометилауристатинові препарати DE і DF (MMAE і MMAF) [дивись патенти США №№ 5,635,483 і 5,780,588 і 7,498,298]; доластатин; каліхеаміцин або його похідне [дивись патенти США №№ 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 і 5,877,296; Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); і Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)]; антрациклін, такий як дауноміцин або доксорубіцин [дивись Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002); і патент США № 6,630,579]; метотрексат; віндезин; таксан, такий як доцетаксел, паклітаксел, ларотаксел, тезетаксел та ортатаксел; трихотецен і CC1065.

В іншому варіанті здійснення імунокон'югат містить антитіло, як описано в цьому описі винаходу, кон'юговане з ферментативно активним токсином або його фрагментом, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, ланцюг А токсину дифтерії, незв'язувальні активні фрагменти токсину дифтерії, ланцюг А екзотоксину (від Pseudomonas aeruginosa), ланцюг А рицину, ланцюг А абрину, ланцюг А модецину, альфа-сарцин, білки Aleurites fordii, діантінові білки, білки Photolacca americana (PAPI, PAPII та PAP-S), інгібітор гіркого огірка (Momordica charantia), курцин, кротин, інгібітор мильнянки лікарської (Saponaria officinalis), гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин та трикотецени.

В іншому варіанті здійснення імунокон'югат містить антитіло, як описано в цьому описі винаходу, кон'юговане з радіоактивним атомом з утворенням радіокон'югату. Для виробництва радіокон'югатів доступні різноманітні радіоактивні ізотопи. Приклади включають ^{211}At, ^{131}I, ^{125}I, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{212}Bi, ^{32}P, ^{212}Pb і радіоактивні ізотопи Lu. Коли радіокон'югат використовується для виявлення, він може містити радіоактивний атом для сцинтиграфічних досліджень, наприклад, Tc-99m або ^{123}I, або спінову мітку для магнітно-резонансної візуалізації (ЯМР) (також відома як магнітно-резонансна томографія, МРТ), таку як йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

Кон'югати антитіла та цитотоксичного агента можуть бути отримані з використанням різних біфункціональних білок-зв'язувальних агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеімідометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні імідоестерів (наприклад, диметиладипімідат HCl), активні естери (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидосполуки (такі як біс(п-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(п-діазонійбензоїл)-етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) та біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, рициновий імунотоксин може бути отриманий, як описано в Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Мічений вуглецем-14 1-ізотіоціанатобензил-3-метилдіетилен триамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) є типовим хелатуючим агентом для кон'югації радіонукліду з антитілом. Див. WO94/11026. Лінкер може бути "лінкером, що розщеплюється", що сприяє вивільненню цитотоксичного лікарського засобу в клітині. Наприклад, може бути використаний кислото-нестійкий лінкер, чутливий до пептидази лінкер, лінкер, що руйнується світлом, диметиловий лінкер або дисульфідвмісний лінкер [Chari et al., Cancer Res. 52: 127-131 (1992); патент США № 5,208,020].

Імунокон'югати або ADC у цьому описі винаходу чітко передбачають, але не обмежуючись такими кон'югатами, приготованими за допомогою крос-лінкерних реагентів, що включають, але не обмежуються ними, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB,

сульфо-SMCC, і сульфо-SMPB, і SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон)бензоат), які є комерційно доступними [наприклад, від Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., США].

E. Методи та склади для діагностики та виявлення

У певних варіантах здійснення будь-яка з антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137, передбачених у цьому винаходу, корисна для виявлення присутності CD137-антигензв'язувальної молекули в біологічному зразку. Термін "виявлення", як використовується в даному описі, охоплює кількісне або якісне виявлення. У деяких варіантах здійснення біологічний зразок включає клітину або тканину.

В одному варіанті здійснення пропонуються антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 для використання в способі діагностики або виявлення. У наступному аспекті пропонується спосіб виявлення присутності CD137 у біологічному зразку. У деяких варіантах здійснення спосіб передбачає контакт біологічного зразка з антигензв'язувальною молекулою проти CD137 або антитілом проти CD137, як описано у цьому описі винаходу, в умовах, що дозволяють зв'язатися антигензв'язувальній молекулі проти CD137 або антитілу проти CD137 з CD137, і виявлення, чи утворюється комплекс між антигензв'язувальною молекулою проти CD137 або антитілом проти CD137 і CD137. Такий спосіб може бути способом in vitro або in vivo. В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула проти CD137 або антитіло проти CD137 використовуються для відбору суб'єктів, придатних для терапії антигензв'язувальною молекулою проти CD137 або антитілом проти CD137, наприклад, коли CD137 є біомаркером для відбору пацієнтів.

Типові розлади, які можуть бути діагностовані за допомогою антитіла за цим винаходом, включають рак.

У деяких варіантах здійснення пропонуються мічені антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137. Мітки включають, але не обмежуючись ними, мітки або складові, які виявляються безпосередньо (такі як флуоресцентні, хромофорні, електронно-щільні, хемілюмінесцентні та радіоактивні мітки), а також такі складові, як ферменти або ліганди, які виявляються опосередковано, наприклад, за допомогою ферментативної реакції або молекулярної взаємодії. Приклади мітки включають, але не обмежуються ними, радіоізотопи ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H та ^{131}I, флуорофори, такі як рідкісноземельні хелати або флуоресцеїн та його похідні, родамін та його похідні, дансил, умбеліферон, люцериферази, наприклад, люцифераза світлячка і бактеріальна люцифераза [патент США № 4737456], люциферин, 2,3-дигідрофталазиндіони, пероксидаза хрону (HRP), лужна фосфатаза, бета-галактозидаза, глюкоамілаза, лізоцим, сахаридні оксидази, наприклад, глюкозооксидаза, глюкоза-6-фосфатдегідрогеназа, гетероциклічні оксидази, такі як уриказа та ксантиноксидаза, які поєднані з ферментом, який використовує пероксид водню для окиснення попередника барвника, такого як HRP, лактопероксидаза або мікропероксидаза, біотин/авідин, спінові мітки, мітки-бактеріофаги, стабільні вільні радикали і т. п.

F. Фармацевтичні композиції

Фармацевтичні композиції антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, як описано в цьому описі винаходу, готують шляхом змішування такого антитіла, що має бажаний ступінь чистоти, з одним або декількома необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)] у формі ліофілізованих препаратів або водних розчинів. Фармацевтично прийнятні носії, як правило, нетоксичні для реципієнтів у використовуваних дозах та концентраціях і включають, але не обмежуються тільки ними: буфери, такі як фосфат, цитрат та інші органічні кислоти; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту та метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензиламонію хлорид; гексаметонію хлорид; бензалконію хлорид; бензетонію хлорид; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол та м-крезол); низькомолекулярні поліпептиди (менше приблизно 10 залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатоутворюючі агенти, такі як EDTA; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; солеутворюючі протиіони, такі як натрій; металеві комплекси (наприклад, Zn-білкові комплекси) та/або неіонні поверхнево-активні речовини, такі як поліетиленгліколь (PEG). Типові фармацевтично прийнятні носії в цьому описі винаходу також включають агенти диспергування лікарських засобів в інтерстиціальному просторі, такі як розчинні нейтрально-активні глікопротеїни гіалуронідази (sHASEGP), наприклад, розчинні глікопротеїни гіалуронідази PH-20 людини, такі як rHuPH20 (HYLENEX (зареєстрована торговельна марка) [Baxter International, Inc.]. Деякі типові sHASEGP і способи використання,

включаючи rHuPH20, описані в патентних публікаціях [США № 2005/0260186 та 2006/0104968]. В одному аспекті sHASEGP поєднані з однією або декількома додатковими глікозаміногліканазами, такими як хондроїтинази.

Типові ліофілізовані композиції антитіл описані в [патенті США №6,267,958]. Водні композиції антитіл включають препарати, описані в [патенті США № 6,171,586 та WO2006/044908], останні композиції містять гістидин-ацетатний буфер.

Активні інгредієнти можуть поміщатися в мікрокапсули, приготовані, наприклад, за технологією коацервації або міжфазною полімеризацією, наприклад, мікрокапсули з гідроксиметилцелюлози або желатинові мікрокапсули та мікрокапсули з поліметилметакрилату, відповідно, в колоїдні системі доставки лікарських засобів (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки та нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методи розкриті в [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)].

Можуть бути приготовані препарати з уповільненим вивільненням. Підхожі приклади препаратів з уповільненим вивільненням включають напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло, ці матриці мають вигляд сформованих виробів, наприклад плівок або мікрокапсул.

Композиції, що використовуються для введення in vivo, як правило, стерильні. Стерильності можна легко досягнути, наприклад, фільтруванням через стерилізувальні фільтрувальні мембрани.

G. Терапевтичні способи та терапевтичні композиції

Будь-яка з антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137, запропонованих цим винаходом, може бути використана в терапевтичних способах.

В одному аспекті в цьому винаході пропонуються антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 для використання як лікарського засобу. У цьому описі винаходу приклади лікарського засобу специфічно включають препарати для індукування протипухлинної дії, наприклад, пригнічування утворення нових судин в пухлинах, пригнічування проліферації пухлинних клітин, виснаження пухлино-стимулюючих В-клітин тощо, шляхом активації клітин внаслідок зв'язування антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137 з CD137, експресованих на імунних клітинах, таких як Т-клітини. У подальших аспектах в цьому винаході пропонуються антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 для використання при лікуванні пухлини. У певних варіантах здійснення пропонуються антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 для використання в способі лікування. У деяких варіантах здійснення даним винаходом пропонуються антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 для використання в способі лікування індивідуума, що має пухлину, який передбачає введення індивідууму ефективної кількості антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137. У подальших варіантах здійснення в цьому описі винаходу приклади пухлин включають тверду пухлину, інфільтровану В-клітинами, дендритними клітинами, клітинами-кілерами, макрофагами, CD8-позитивними Т-клітинами та/або регуляторними Т-клітинами (клітинами Treg).

У подальших аспектах цим винаходом пропонується антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 для використання в способі активації імунних клітин у індивідуума, при цьому спосіб передбачає введення індивідууму ефективної кількості антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 для активації імунних клітин, таких як В-клітини, дендритні клітини, клітини-кілери, макрофаги та/або CD8-позитивні Т-клітини (конкретніше, ці імунні клітини інфільтрували пухлинні тканини).

У подальших аспектах цим винаходом пропонується антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 для використання в способі пошкодження клітин (наприклад, пухлинних клітин) у індивідуума, причому спосіб передбачає введення індивідууму ефективної кількості антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137. У деяких варіантах здійснення приклади пухлини включають тверду пухлину, інфільтровану В-клітинами, дендритними клітинами, клітинами-кілерами, макрофагами, CD8-позитивними Т-клітинами та/або регуляторними Т-клітинами (клітинами Treg). "Індивідуум" згідно з будь-яким із вищенаведених варіантів здійснення переважно є людиною.

У подальших аспектах цим винаходом пропонується використання антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137 у виготовленні або приготуванні лікарського засобу. В одному варіанті здійснення лікарський засіб призначений для лікування пухлини (залежно від контексту, може бути доречнішим називати це "рак" (те ж саме застосовується й далі)). У подальших варіантах здійснення лікарський засіб призначений для використання в способі лікування пухлини (або раку, залежно від контексту), при цьому спосіб передбачає

введення індивідууму, який має пухлину (або рак, залежно від контексту), ефективної кількості лікарського засобу. У подальших варіантах здійснення лікарський засіб призначений для індукування протипухлинної дії, наприклад, пригнічення утворення нових судин в пухлинах, пригнічення проліферації пухлинних клітин, виснаження пухлино-стимулюючих В-клітин тощо, шляхом активації клітин внаслідок зв'язування антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 з CD137, експресованим на імунних клітинах, таких як Т-клітини. У подальших варіантах здійснення лікарський засіб призначений для використання в способі, наприклад, пригнічення утворення нових судин в пухлинах, пригнічення проліферації пухлинних клітин, виснаження пухлино-стимулюючих В-клітин тощо, шляхом активації клітин внаслідок зв'язування антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137 з CD137, експресованим на імунних клітинах, таких як Т-клітини, у індивідуума, причому спосіб для цього передбачає введення індивідууму ефективної кількості цього медикаменту. "Індивідуум" згідно з будь-яким із вищевказаних варіантів здійснення може бути людиною.

У подальших аспектах цим винаходом пропонуються способи лікування пухлини. В одному варіанті здійснення способи передбачають введення індивідууму, що має таку пухлину, ефективної кількості антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137. У подальших варіантах здійснення цього винаходу приклади пухлини включають тверду пухлину, інфільтровану В-клітинами, дендритними клітинами, клітинами-кілерами, макрофагами, CD8-позитивними Т-клітинами та/або регуляторними Т-клітинами (клітинами Treg).

У подальших аспектах цим винаходом пропонуються способи активації імунної клітини у індивідуума. В одному варіанті здійснення спосіб передбачає введення індивідууму ефективної кількості антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137. У подальших варіантах здійснення цього винаходу імунна клітина включає імунні клітини, такі як В-клітини, дендритні клітини, клітини-кілери, макрофаги та/або CD8-позитивні Т-клітини (конкретніше, ці імунні клітини інфільтрували пухлинні тканини).

У подальших аспектах цим винаходом пропонуються способи пошкодження клітин (конкретно, пухлинних клітин) у індивідуума. В одному варіанті здійснення способи включають такі способи, які передбачають введення індивідууму ефективної кількості антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137. У певних варіантах здійснення приклади пухлини включають тверду пухлину, інфільтровану В-клітинами, дендритними клітинами, клітинами-кілерами, макрофагами, CD8-позитивними Т-клітинами та/або регуляторними Т-клітинами (клітинами Treg). "Індивідуум" згідно з будь-яким із вищевказаних варіантів здійснення може бути людиною.

У подальших аспектах цього винаходу фармацевтичні препарати, що включають антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137, для використання для описаних вище способів лікування, для використання при лікуванні та для лікарських засобів можуть містити ефективну кількість антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, які мають нижчий рівень імунологічної активації в непухлинній тканині, як порівняти з антигензв'язувальною молекулою проти CD137, яка не володіє залежною від низькомолекулярної сполуки зв'язувальною активністю стосовно CD137.

В одному варіанті здійснення непухлинні тканини включають лімфатичні вузли, селезінку та/або печінку.

У подальших варіантах здійснення фармацевтичні препарати, що включають антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137, для використання для описаних вище способів лікування, для використання при лікуванні та для лікарських засобів можуть містити ефективну кількість антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, які по суті не зв'язуються з CD137, експресованим в непухлинній тканині.

У подальших варіантах здійснення фармацевтичні препарати, що включають антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137, для використання для описаних вище способів лікування для використання при лікуванні та для лікарських засобів можуть містити ефективну кількість антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, які мають пролонгований період напіввиведення в крові, як порівняти з антигензв'язувальною молекулою проти CD137, яка не має залежної від низькомолекулярної сполуки зв'язувальної активності стосовно CD137.

У подальших варіантах здійснення фармацевтичні препарати, що включають антигензв'язувальну молекулу проти CD137 або антитіло проти CD137, для використання для описаних вище способів лікування, для використання при лікуванні та для лікарських засобів можуть містити ефективну кількість антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137, що мають низький рівень побічних ефектів, як порівняти з антигензв'язувальною молекулою проти CD137, яка не володіє залежною від низькомолекулярної сполуки

зв'язувальною активністю стосовно CD137.

У подальших варіантах здійснення побічні ефекти включають підвищений рівень AST, підвищений рівень ALT, лихоманку, нудоту, гострий гепатит, ураження печінки, спленомегалію, ентерит, гнійне запалення шкіри, нейтропенію, лімфопенію, тромбопенію, експресію трансаміназ та/або гіпербілірубінемію.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули проти CD137 за цим винаходом мають низькі побічні ефекти, і, отже, дозування можна збільшити без побоювань щодо побічних ефектів, і як результат, вони можуть виявляти сильнішу ефективність препарату (цитотоксичну активність або протипухлинну активність).

У ще одному аспекті цим винаходом пропонуються фармацевтичні композиції, що містять будь-яку з антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137, запропонованих цим винаходом, наприклад, для використання в будь-якому з вищезазначених терапевтичних способів. В одному варіанті здійснення фармацевтична композиція містить будь-яку з антигензв'язувальних молекул проти CD137 або антитіл проти CD137, запропонованих цим винаходом, та фармацевтично прийнятний носій.

Антигензв'язувальну молекулу або антитіло за цим винаходом можна вводити за будь-якими відповідними методами введення, включаючи парентеральне, внутрішньолегеневе та інтраназальне введення, і, якщо це бажано для місцевого лікування, введення усередину ураженої тканини. Парентеральні інфузії включають внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревне або підшкірне введення. Введення дози може здійснюватися будь-яким підхожим шляхом, наприклад, шляхом ін'єкцій, таких як внутрішньовенні або підшкірні ін'єкції, частково залежно від того, чи є введення короткочасним або постійним. У цьому описі винаходу розглядаються різні схеми введення доз, включаючи, але не обмежуючись ними, одноразові або багаторазові введення в різні точки часу, болюсне введення та імпульсну інфузію.

Антитіла згідно з цим винаходом повинні уводитися до складу композицій, дозуватися та вводитись відповідно до належної медичної практики. Фактори, які слід врахувати в цьому контексті, включають конкретний розлад, що лікується, конкретного ссавця, який лікується, клінічний стан конкретного пацієнта, причину розладу, частину тіла, у яку треба доставити лікарський засіб, спосіб введення, графік введення та інші фактори, відомі лікарям. Антитіло не потрібує цього, але воно необов'язково змішується з одним або декількома лікарськими засобами, що використовуються в даний час для профілактики або лікування актуального розладу. Ефективна кількість таких інших лікарських засобів залежить від кількості антитіла, присутнього у рецептурі, типу розладу або лікування та інших факторів, обговорених вище. Вони, як правило, використовуються в одних і тих же самих дозах та за методами введення, як описано в цьому описі винаходу, або приблизно дозі, що складає від 1 до 99 % від доз, описаних у цьому описі винаходу, або в будь-яких дозах та будь-яким шляхом, який емпірично/клінічно визначено відповідним.

Для профілактики або лікування хвороби відповідна доза антитіла згідно з цим винаходом буде залежати від типу захворювання, що підлягає лікуванню, типу антитіла, тяжкості та перебігу захворювання, від того, чи вводиться антитіло для профілактики, чи у терапевтичних цілях, попередньої терапії, клінічного анамнезу пацієнта та реакції на антитіла та розсуду лікуючого лікаря. Антитіло належним чином вводять пацієнту одночасно або протягом курсу лікування. Залежно від типу та тяжкості захворювання приблизно від 1 мкг/кг до 15 мг/кг (наприклад, 0,1-10 мг/кг) антитіла може бути початковою дозою-кандидатом для введення пацієнту або, наприклад, одним або кількома окремими введеннями, або безперервною інфузією. Одна типова добова доза може коливатися приблизно від 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більше, залежно від факторів, згаданих вище. При повторному введенні протягом декількох днів або довшого періоду, залежно від стану, лікування, як правило, триває доти, поки не настане бажане пригнічення симптомів захворювання. Одне типове дозування антитіла передбачається в діапазоні від приблизно 0,05 мг/кг до приблизно 10 мг/кг. Таким чином, пацієнту можуть вводити одну або декілька доз у приблизно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг або 10 мг/кг (або будь-яку їх комбінацію). Такі дози можна вводити з перервами, наприклад щотижня або кожні три тижні (наприклад, так, що пацієнт отримує від двох до приблизно двадцяти, або, наприклад, приблизно шість доз антитіла). Може бути призначена початкова вища навантажувальна доза, за якою слідує одна або декілька менших доз. Розвиток цієї терапії легко контролюється за звичайними методами та аналізами.

Зрозуміло, що будь-яка з вищезазначених композицій або будь-який з вищезазначених терапевтичних способів можуть бути здійснені з використанням розкритого в цьому розділі опису винаходу імунокон'югату антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти

CD137 або з використанням вказаного імунокон'югату на додаток до антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137.

H. Промислові вироби

В іншому аспекті цього винаходу пропонуються промислові вироби, що містять матеріали, корисні для лікування, профілактики та/або діагностики розладів, описаних вище. Промисловий виріб включає контейнер та етикетку або інструкцію застосування, пов'язану з контейнером. Відповідні контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони, шприци, пакети для розчину для внутрішньовенної інфузії. Контейнери можуть бути виготовлені з різноманітних матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнер вміщує композицію як таку і може мати стерильний отвір для доступу (наприклад, контейнер може бути пакетом для внутрішньовенного введення розчину або флаконом, який має пробку, крізь яку може проникати голка для підшкірної ін'єкції). Щонайменше один активний інгредієнт у композиції є антитілом за цим винаходом. Етикетка або інструкція про застосування вказує на те, що композиція використовується для лікування стану за вибором. Промисловий виріб у цьому варіанті здійснення цього винаходу може додатково містити інструкцію про застосування із зазначенням того, що композиції можуть бути використані для лікування певного стану. Альтернативно або додатково промисловий виріб може додатково містити другий (або третій) контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWFI), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера та розчин декстрози. Крім того, він може включати інші матеріали, бажані з точки зору комерції та користувача, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки та шприци.

Термін "інструкція про застосування" використовується для посилання на інструкції, які зазвичай входять до комерційних упаковок терапевтичних продуктів, які включають інформацію про показання, застосування, дозування, введення, комбіновану терапію, протипоказання та/або попередження щодо використання таких терапевтичних продуктів.

Зрозуміло, що будь-який з вищезазначених промислових виробів може включати імунокон'югат цього винаходу замість або на додаток до антигензв'язувальної молекули проти CD137 або антитіла проти CD137.

III. Композиції та методи (агоністичні антигензв'язувальні молекули та цитотоксичні антигензв'язувальні молекули, що включають варіант Fc-ділянки з підвищеною ізоелектричною точкою (pI))

В одному аспекті цим винаходом пропонуються агоністичні антигензв'язувальні молекули або антитіла, що включають варіант Fc-ділянки з підвищеною ізоелектричною точкою (pI), і способи їх використання. В деяких варіантах здійснення поліпептиди, що включають варіант Fc-ділянки з підвищеною ізоелектричною точкою (pI), мають щонайменше одну амінокислотну зміну у батьківській Fc-ділянці. У подальших варіантах здійснення кожна така амінокислотна зміна спричиняє підвищену ізоелектричну точку (pI) варіанта Fc-ділянки, як порівняти з батьківською Fc-ділянкою. Не обмежуючись певною теорією, вважають, що pH біологічних рідин (наприклад, плазми) знаходиться в нейтральному діапазоні pH. У біологічних рідинах сумарний позитивний заряд антигензв'язувальної молекули або антитіла з підвищеною pI збільшується завдяки підвищеній pI, і в результаті антигензв'язувальна молекула або антитіло сильніше притягуються фізико-хімічною кулонівською взаємодією до поверхні ендотеліальної клітини, яка має сумарний негативний заряд, як порівняти з антигензв'язувальною молекулою або антитілом, що не мають підвищеної pI. Таким чином, агоністичні антигензв'язувальні молекули (або антитіла) або зв'язані з антигеном агоністичні антигензв'язувальні молекули (або антитіла) можуть щільніше наблизитися до поверхні клітин, які експресують рецептор Fc-гамма, що призводить до посиленого зв'язування антигензв'язувальної молекули або антитіла з клітинами, що експресують рецептор Fc-гамма. Щодо тих агоністичних антигензв'язувальних молекул або антитіл, які проявляють агоністичну активність на основі внеску зв'язувальної активності стосовно рецептора Fc-гамма, то агоністичні антигензв'язувальні молекули або антитіла, що мають підвищене зв'язування з клітинами, які експресують рецептор Fc-гамма, зумовлене амінокислотними замінами, що підвищують pI, здатні виявляти сильнішу агоністичну активність, як порівняти з агоністичними антигензв'язувальними молекулами або антитілами, що не мають амінокислотних змін, які підвищують pI. В одному варіанті здійснення агоністичні антигензв'язувальні молекули є антигензв'язувальними молекулами проти CD137 або антигензв'язувальними молекулами проти CD3. У подальшому варіанті здійснення агоністичні антигензв'язувальні молекули є антитілами проти CD137 або антитілами проти CD3.

В іншому аспекті цим винаходом пропонуються цитотоксичні антигензв'язувальні молекули або антитіла, що включають варіант Fc-ділянки з підвищеною ізоелектричною точкою (pI), та способи їх використання. У біологічних рідинах сумарний позитивний заряд

антигензв'язувальної молекули або антитіла з підвищеною pI збільшується завдяки підвищеній pI, і в результаті антигензв'язувальна молекула або антитіло сильніше притягуються фізико-хімічною кулонівською взаємодією до поверхні ендотеліальної клітини, яка має сумарний негативний заряд, як порівняти з антигензв'язувальною молекулою або антитілом, що не мають підвищеної pI. Таким чином, цитотоксичні антигензв'язувальні молекули (або антитіла) або зв'язані з антигеном цитотоксичні антигензв'язувальні молекули (або антитіла) можуть щільніше наблизитися до поверхні клітин, які експресують рецептор Fc-гамма, що призводить до посиленого зв'язування антигензв'язувальної молекули або антитіла з клітинами, що експресують рецептор Fc-гамма. Щодо тих цитотоксичних антигензв'язувальних молекул або антитіл, які виявляють цитотоксичну активність на основі внеску зв'язувальної активності стосовно рецептора Fc-гамма, то цитотоксичні антигензв'язувальні молекули або антитіла, що мають підвищене зв'язування з клітинами, що експресують рецептор Fc-гамма, зумовлене амінокислотними змінами, що підвищують pI, здатні виявляти сильнішу агоністичну активність, як порівняти з цитотоксичними антигензв'язувальними молекулами або антитілами, що не мають амінокислотних змін, що підвищують pI.

В одному варіанті здійснення цитотоксичність, якою володіють цитотоксичні антигензв'язувальні молекули, включає, наприклад, антитілозалежну клітинну цитотоксичність (ADCC) та антитілозалежний клітинний фагоцитоз (ADCP), спричинені ефекторними клітинами.

У цьому винаході pI може бути або теоретичним, або експериментально визначеним pI. Значення pI можна визначити, наприклад, шляхом ізоелектричного фокусування, відомого фахівцям в даній галузі. Значення теоретичного pI можна розрахувати, наприклад, використовуючи програмне забезпечення для аналізу послідовностей генів та амінокислот (Genetyx та інші). При розрахунку властивості антитіла можуть бути відображені у формулі розрахунку. Наприклад, (i) як правило, Cys, що зберігається в антитілі, утворює дисульфідний зв'язок і не несе електричного заряду бічного ланцюга; отже, такий Cys може бути виключений із розрахунку, і лише Cys вільної форми, який не утворює дисульфідного зв'язку, може бути включений до розрахунку. Альтернативно, (ii) стан заряду або ізоелектрична точка антитіл можуть змінюватися завдяки посттрансляційним модифікаціям; отже, формула розрахунку може бути змінена наступним чином, враховуючи такі посттрансляційні модифікації: (a) коли N-кінець важкого ланцюга являє собою Q (глутамін), тоді N-кінцеву аміногрупу виключають з розрахунку, припускаючи, що відбувається піроглутамілування, (b) коли C-кінець важкого ланцюга являє собою K (лізин), тоді K (лише один залишок) виключають з розрахунку, припускаючи, що відбувається усічення; і (c) бічні ланцюги всіх C (цистеїнів), присутніх у в цілому збережених позиціях, виключають з розрахунку, припускаючи, що всі ці C утворюють дисульфідні зв'язки всередині молекули. В одному переважному варіанті здійснення, як описані вище (i), так і (ii) можуть бути відображені у формулі розрахунку.

В одному варіанті здійснення значення pI може бути підвищено, наприклад, принаймні на 0,01, 0,03, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 або більше, принаймні на 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 або більше, принаймні на 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 або більше, або принаймні на 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 3,0 або більше, як порівняти зі станом до модифікацій.

У деяких варіантах здійснення амінокислота для підвищеної pI може піддаватися впливу на поверхні варіанта Fc-ділянки. У цьому описі винаходу амінокислота, яка може піддаватися впливу на поверхні, як правило, відноситься до амінокислотного залишку, розташованого на поверхні поліпептиду, що являє собою варіант Fc-ділянки. Амінокислотний залишок, розташований на поверхні поліпептиду, відноситься до амінокислотного залишку, бічний ланцюг якого може контактувати з молекулами розчинника (а це, в основному, молекули води). Однак бічний ланцюг необов'язково повинен повністю контактувати з молекулами розчинника, і коли навіть частина бічного ланцюга контактує з молекулами розчинника, тоді амінокислота визначається як "амінокислотний залишок, розташований на поверхні". Амінокислотні залишки, розташовані на поверхні поліпептиду, також включають амінокислотні залишки, розташовані близько до поверхні, і тим самим можуть піддаватися впливу електричного заряду від іншого амінокислотного залишку, бічний ланцюг якого навіть частково контактує з молекулами розчинника. Фахівці в даній галузі можуть підготувати модель гомології поліпептиду, наприклад, використовуючи комерційні програмні засоби. Альтернативно можна використовувати методи, відомі фахівцям в даній галузі, такі як рентгенівська кристалографія. Амінокислотні залишки, які можуть піддаватися впливу завдяки їх розташуванню на поверхні, визначаються, наприклад, за допомогою координат тривимірної моделі з використанням комп'ютерної програми, такої як програма InsightII (Accelrys). Сайти, що піддаються впливу завдяки їх розташуванню на поверхні, можуть бути визначені за допомогою алгоритмів, відомих у цій галузі техніки [наприклад, Lee and Richards (J. Mol. Biol. 55:379-400 (1971)); Connolly (J. Appl. Cryst. 16:548-558

(1983)]. Сайти, що піддаються впливу завдяки їх розташуванню на поверхні, можна визначити за допомогою програмного забезпечення, придатного для моделювання білка, та інформації про тривимірну структуру. До програмного забезпечення, що доступне для таких цілей, належить, наприклад, програмне забезпечення SYBYL Biopolymer Module (Tripos Associates). Коли алгоритм вимагає від користувача ввести параметр розміру, тоді "розмір" зонда, який використовується при розрахунку, може бути встановлений приблизно в 1,4 ангстрема (Å) або менше в радіусі. Крім того, методи визначення ділянок, що піддаються впливу завдяки їх розташуванню на поверхні, за допомогою програмного забезпечення для персональних комп'ютерів були описані Паціосом (Pacios) [Comput. Chem. 18 (4): 377-386 (1994); J. Mol. Model. 1: 46-53 (1995)]. На основі такої інформації, яку описано вище, можуть бути вибрані відповідні амінокислотні залишки, розташовані на поверхні поліпептиду, який являє собою варіант Fc-ділянки.

Методи підвищення pI шляхом внесення однієї амінокислотної заміни в константну ділянку антитіла особливо не обмежуються, і, наприклад, їх можна здійснювати на основі методів, описаних у [WO 2014/145159]. Як амінокислоти-замінники для введення в константну ділянку, переважно, вводити амінокислоти-замінники для зменшення кількості амінокислот, що мають негативний заряд (наприклад, аспарагінову кислоту або глутамінову кислоту), одночасно збільшуючи кількість амінокислот, що мають позитивний заряд (наприклад, аргінін або лізин), як у випадку варіабельної ділянки.

Хоча це особливо не обмежується, як сайти для внесення амінокислотних замін у межах константної ділянки кращими є такі сайти, у яких бічні ланцюги амінокислот можуть бути розташовані на поверхні молекули антитіла. Кращі приклади включають методи внесення численних амінокислотних замін в комбінації в такі сайти, які можуть бути піддані впливу на поверхні молекули антитіла. Альтернативно, бажано, щоб численні амінокислотні заміни, що вносяться, знаходились в сайтах, розташованих близько один до одного в тривимірній структурі. Внесені численні амінокислотні заміни переважно являють собою заміни на позитивно заряджені амінокислоти, що в деяких випадках можуть призвести до стану, коли численні позитивні заряди знаходяться в близьких один до одного сайтах тривимірної структури, хоча вони особливо не обмежуються цим. Визначення "близькі один до одного сайти у тривимірній структурі" в цьому описі винаходу особливо не обмежене, але, наприклад, воно може означати стан, коли заміна однієї амінокислоти або багатократні заміни амінокислот роблять одну від одної в 45 ангстремах або менше, в 40 ангстремах або менше, в 30 ангстремах або менше, в 20 ангстремах або менше, переважно в 15 ангстремах або менше або більш переважно а 10 ангстремах або менше. Чи є амінокислотні заміни, що представляють інтерес, в сайтах, що піддаються впливу на поверхні молекули антитіла, або чи розташовані численні сайти, в яких зроблені заміни амінокислот, в безпосередній близькості один до одного, можна визначити за допомогою відомих методів, таких як рентгенівська кристалографія.

В одному варіанті здійснення варіанти Fc-ділянок з підвищеною pI включають щонайменше одну амінокислотну зміну в щонайменше одній позиції, вибраній з групи, що складається з позицій 285, 311, 312, 315, 318, 333, 335, 337, 341, 342, 343, 384, 385, 388, 390, 399, 400, 401, 402, 413, 420, 422 і 431, згідно з Європейською номенклатурою. У подальших варіантах здійснення варіанти Fc із підвищеною pI включають Arg або Lys у кожній вибраній позиції.

У подальших варіантах здійснення варіанти Fc-ділянок з підвищеною pI включають щонайменше одну амінокислотну зміну в щонайменше одній позиції, вибраній з групи, що складається з позицій 311, 343 і 413, згідно з Європейською номенклатурою. У подальших варіантах здійснення варіанти Fc-ділянок з підвищеною pI включають амінокислотну зміну в позиціях 311, 343 або 413, згідно з Європейською номенклатурою. У подальших варіантах здійснення варіанти Fc-ділянок з підвищеною pI включають Arg або Lys у кожній вибраній позиції.

В іншому аспекті цим винаходом пропонуються поліпептиди, що включають варіант Fc-ділянки з підвищеною pI, який включає амінокислотні зміни за будь-яким з наступних пунктів (1)-(3): (1) у позиціях 311 і 343; (2) у позиціях 311 та 413 та (3) у позиціях 343 та 413, згідно з Європейською номенклатурою. У подальших варіантах здійснення варіанти Fc-ділянок з підвищеною pI включають Arg або Lys у кожній вибраній позиції.

Метод підвищення pI білка полягає, наприклад, у зменшенні кількості амінокислот з негативно зарядженим бічним ланцюгом (наприклад, аспарагінової кислоти та глутамінової кислоти) та/або в збільшенні кількості амінокислот з позитивно зарядженим бічним ланцюгом (наприклад, аргініну, лізину та гістидину) при нейтральних умовах pH. Амінокислоти з негативно зарядженим бічним ланцюгом мають негативний заряд, представлений як -1 при pH, який є достатньо вищим, ніж значення pKa її бічного ланцюга, що є теоретичним положенням, добре

відомим фахівцям в даній галузі. Наприклад, теоретичний pKa для бічного ланцюга аспарагінової кислоти дорівнює 3,9, і цей бічний ланцюг має негативний заряд, представлений як -1 при нейтральному pH (наприклад, у розчині з pH 7,0). І навпаки, амінокислоти з позитивно зарядженим бічним ланцюгом мають позитивний заряд, представлений як +1 при pH, який є достатньо нижчим, ніж значення pKa їх бічного ланцюга. Наприклад, теоретичний pKa для бічного ланцюга аргініну становить 12,5, і цей бічний ланцюг має позитивний заряд, представлений як +1 при нейтральному pH (наприклад, у розчині з pH 7,0). Між тим відомо, що амінокислоти, бічний ланцюг яких не має заряду при нейтральному pH (наприклад, у розчині з pH 7,0), включають 15 типів природних амінокислот, тобто аланін, цистеїн, фенілаланін, гліцин, ізолейцин, лейцин, метіонін, аспарагін, пролін, глутамін, серин, треонін, валін, триптофан та тирозин. Звичайно зрозуміло, що амінокислоти для підвищення pI можуть бути неприродними амінокислотами.

Таким чином, метод підвищення pI білка при нейтральних pH (наприклад, у розчині з pH 7,0) може забезпечити зміну заряду на +1 білка, що представляє інтерес, наприклад, шляхом заміни в амінокислотній послідовності білка амінокислотами з незарядженими бічними ланцюгами аспарагінової кислоти або глутамінової кислоти (бічний ланцюг яких має негативний заряд -1). Крім того, зміну заряду на +1 можна надати білку, наприклад, шляхом заміни аргініном або лізином (бічний ланцюг яких має позитивний заряд +1) амінокислот, бічний ланцюг яких не має заряду. Більше того, зміну заряду на +2 можна надати білку за один крок, замінюючи аргініном або лізином (бічний ланцюг яких має позитивний заряд +1) аспарагінової кислоти або глутамінової кислоти (бічний ланцюг яких має негативний заряд -1). Альтернативно, щоб підвищити pI білка, амінокислоти з бічним ланцюгом, що не має заряду, та/або переважно амінокислоти, що мають позитивно заряджений бічний ланцюг, можуть бути додані або вставлені в амінокислотну послідовність білка, або амінокислоти з бічним ланцюгом, що не має заряду, та/або переважно амінокислоти з негативно зарядженим бічним ланцюгом, присутні в амінокислотній послідовності білка, можуть бути видалені. Зрозуміло, що, наприклад, N-кінцеві та C-кінцеві амінокислотні залишки білка мають заряд, що походить від основного ланцюга (NH_3^+ аміногрупи на N-кінці та COO^- карбонільної групи на C-кінці), додатково до їх зарядів, що походять від бічного ланцюга. Таким чином, pI білка також можна підвищити, виконуючи для функціональних груп, що походять від основного ланцюга, певне додавання, делецію, заміщення або вставку.

Заміна амінокислоти для підвищення pI включає, наприклад, заміну в амінокислотній послідовності батьківської Fc-ділянки амінокислотою, бічний ланцюг якої не має заряду, амінокислоти, що має негативно заряджений бічний ланцюг, заміна амінокислотою, що має позитивно заряджений бічний ланцюг, амінокислоти, бічний ланцюг якої не має заряду, і заміна амінокислотою, що має позитивно заряджений бічний ланцюг, амінокислоти, яка має негативно заряджений бічний ланцюг, які виконуються окремо або у відповідних комбінаціях.

Вставка або додавання амінокислоти для підвищення pI включає, наприклад, вставку або додавання амінокислоти, бічний ланцюг якої не має заряду, та/або вставку або додавання амінокислоти, що має позитивно заряджений бічний ланцюг, в амінокислотній послідовності батьківської Fc-ділянки, які проводяться окремо або у відповідних комбінаціях.

Делеція амінокислоти для підвищення pI включає, наприклад, делецію амінокислоти, бічний ланцюг якої не має заряду, та/або делецію амінокислоти, що має негативно заряджений бічний ланцюг, у амінокислотній послідовності батьківської Fc-ділянки, які виконуються окремо або у відповідних комбінаціях.

В одному варіанті здійснення природні амінокислоти, що використовуються для підвищення pI, можна класифікувати наступним чином: (a) амінокислотою з негативно зарядженим бічним ланцюгом може бути Glu (E) або Asp (D); (b) амінокислотою, бічний ланцюг якої не має заряду, може бути Ala (A), Asn (N), Cys (C), Gln (Q), Gly (G), His (H), Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Pro (P), Ser (S), Thr (T), Trp (W), Tyr (Y) або Val (V); і (c) амінокислотою з позитивно зарядженим бічним ланцюгом може бути His (H), Lys (K) або Arg (R). В одному варіанті здійснення вставка або заміна амінокислоти після модифікації являє собою Lys (K) або Arg (R).

В іншому аспекті винаходом пропонуються виділені агоністичні антигензв'язувальні молекули або антитіла, що включають варіанти Fc-ділянок із підвищеною зв'язувальною активністю стосовно рецептора Fc-гамма (переважно, зв'язувальною активністю стосовно Fc-гамма-RIIb) та підвищеною pI. У деяких варіантах здійснення варіант Fc-ділянки, описаний у цьому описі винаходу, включає щонайменше дві амінокислотні зміни в батьківській Fc-ділянці. Як описано вище, антигензв'язувальна молекула або антитіло, що мають підвищену pI, сильніше притягується фізико-хімічною кулонівською взаємодією до поверхні ендотеліальної клітини, яка має сумарний негативний заряд, як порівняти з антигензв'язувальною молекулою

або антитілом, що не мають підвищеної pI. Отже, для агоністичних антигензв'язувальних молекул або антитіл, які проявляють агоністичну активність на основі внеску за рахунок зв'язувальної активності стосовно рецептора Fc-гамма (переважно стосовно Fc-гамма-RIIb), можна збільшити агоністичну активність антигензв'язувальних молекул або антитіл шляхом комбінування амінокислотної(их) зміни(змін) для підвищення зв'язувальної активності стосовно рецептора Fc-гамма (переважно Fc-гамма-RIIb) та амінокислотних змін для підвищення pI. Термін "рецептор Fc-гамма" застосовується аналогічним чином - пояснення, надане в розділі "II. Композиції та методи (агоністичні антигензв'язувальні молекули проти CD137)".

В одному варіанті здійснення, в одному аспекті, цим винаходом пропонуються поліпептиди, що включають варіанти Fc-ділянок із підвищеною зв'язувальною активністю стосовно FcγRIIb і підвищеною pI, що мають щонайменше три амінокислотні зміни, що включають: (a) щонайменше одну амінокислотну зміну в щонайменше одній позиції, вибраній з групи, що складається з: 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 264, 266, 267, 268, 271, 295, 298, 325, 326, 327, 328, 330, 331, 332, 334 та 396, згідно з Європейською номенклатурою, та (b) щонайменше дві амінокислотні зміни в щонайменше двох позиціях, вибраних із групи, що складається з: 285, 311, 312, 315, 318, 333, 335, 337, 341, 342, 343, 384, 385, 388, 390, 399, 400, 401, 402, 413, 420, 422 та 431, згідно з Європейською номенклатурою.

В одному аспекті цим винаходом пропонується поліпептид, що включає варіант Fc-ділянки, що призводить до підвищеної зв'язувальної активності стосовно FcγRIIb та підвищення pI, причому цей поліпептид містить щонайменше три амінокислотні зміни, що включають (a) щонайменше одну амінокислотну зміну в щонайменше одній позиції, вибраній з групи, що складається з: 234, 235, 236, 237, 238, 264, 268, 295, 326 та 330, згідно з Європейською номенклатурою, та (b) щонайменше дві амінокислотні зміни в щонайменше двох позиціях, вибраних з групи, що складається з позицій 311, 343 та 413, згідно з Європейською номенклатурою.

В іншому аспекті цим винаходом пропонується поліпептид, що включає варіант Fc-ділянки, що призводить до підвищеної зв'язувальної активності стосовно FcγRIIb та підвищеної pI, що включає щонайменше одну амінокислотну зміну за будь-яким наведеним нижче варіантом від (1) до (26) (згідно з Європейською номенклатурою):

(1) позиції 235, 236, 268, 295, 326, 330, 343 і 413;
(2) позиції 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330, 343 і 413;
(3) позиції 234, 238, 250, 264, 307, 330, 343 і 413;
(4) позиції 234, 238, 264, 330, 343 і 413;
(5) позиції 234, 237, 238, 250, 307, 330, 343 і 413;
(6) позиції 234, 237, 238, 330, 343 і 413;
(7) позиції 235, 236,268, 295, 326, 330, 311 і 343;
(8) позиції 234, 238, 250, 264, 307, 330, 311 і 343;
(9) позиції 234, 238, 264, 330, 311 і 343;
(10) позиції 234, 237, 238, 250, 307, 330, 311 і 343;
(11) позиції 234, 237, 238, 330, 311 і 343;
(12) позиції 235, 236, 268, 295, 326, 330 і 343;
(13) позиції 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330 і 343;
(14) позиції 235, 236, 268, 295, 326, 330 і 413;
(15) позиції 214, 236, 268, 330 і 343;
(16) позиції 214, 235, 236, 268, 330 і 343;
(17) позиції 214, 236, 268, 330 і 413;
(18) позиції 214, 236, 268, 330, 343 і 413;
(19) позиції 214, 235, 236, 268, 330, 343 і 413;
(20) позиції 214, 236, 268, 330 і 311;
(21) position 214, 235, 236, 268, 330 і 311;
(22) позиції 214, 236, 268, 330, 311 і 343;
(23) позиції 214, 235, 236, 268, 330, 311 і 343;
(24) позиції 214, 236, 268, 330, 311 і 413;
(25) позиції 214, 235, 236, 268, 330, 311 і 413; і
(26) позиції 214, 235, 236, 268, 295, 326, 330 і 311.

В одному варіанті здійснення варіант Fc-ділянки цього винаходу включає амінокислотні зміни, наведені нижче в таблиці 6.

Таблиця 6

Амінокислотні зміни, які підвищують pI ділянки Fc

№	Амінокислотні заміни (Європейська номенклатура)
1	P343R/D413K
2	Q311R/P343R
3	P343R
4	D413K
5	Q311R
6	Q311R/D413K

В одному варіанті здійснення крім амінокислотних змін, наведених у таблиці 6 (амінокислотні зміни, що підвищують pI ділянки Fc), варіант Fc-ділянки цього винаходу включає амінокислотні зміни, наведені в таблиці 7 нижче.

Таблиця 7

Амінокислотні зміни, які підвищують зв'язувальну активність ділянки Fc стосовно FcγRIIb

№	Амінокислотні заміни (Європейська номенклатура)
1	L234Y/P238D/V264I/A330K
2	L234Y/P238D/A330K
3	L234Y/G237D/P238D/A330K
4	G236N/H268D/A330K
5	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K

В одному варіанті здійснення варіант Fc-ділянки цього винаходу включає амінокислотні зміни, наведені в таблиці 8 нижче. У переважному варіанті здійснення варіант Fc-ділянки цього винаходу включає делецію амінокислот у позиції 447 згідно з Європейською номенклатурою, на додаток до амінокислотних змін, наведених нижче у таблиці 8. У ще одному переважному варіанті здійснення варіант Fc-ділянки цього винаходу включає делеції амінокислот у позиціях 446 та 447 згідно з Європейською номенклатурою, на додаток до амінокислотних змін, наведених нижче у таблиці 8.

Таблиця 8

№	Амінокислотні заміни (Європейська номенклатура)
1	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K
2	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K
3	L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/P343R/D413K
4	L234Y/P238D/V264I/A330K/P343R/D413K
5	L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/P343R/D413K
6	L234Y/G237D/P238D/A330K/P343R/D413K
7	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R/P343R
8	L234Y/P238D/T250V/V2641/T307P/A330K/Q311R/P343R
9	L234Y/P238D/V264I/A330K/Q311R/P343R
10	L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/Q311R/P343R
11	L234Y/G237D/P238D/A330K/Q311R/P343R
12	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R
13	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R
14	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/D413K
15	K214R/G236N/H268D/A330K/P343R

Продовження таблиці 8

16	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R
17	K214R/G236N/H268D/A330K/D413K
18	K214R/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K
19	K214R/L235W/G236N/H268DA330K/P343R/D413K
20	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R
21	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R
22	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R
23	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R
24	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K
25	K214R/L235W /G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K
26	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R

Фахівці в даній галузі зрозуміють, що, окрім зазначених вище змін, можуть застосовуватися щонайменше одна амінокислотна зміна, яка підвищує зв'язувальну активність стосовно FcγR, включаючи FcγRIIb, як порівняти з батьківською Fc-ділянкою, наприклад, як описано або запропоновано в [WO 2013/047752, WO 2013/125667, WO 2014/030728, WO 2014/163101 або WO 2017104783], і щонайменше одна амінокислотна зміна, яка підвищує pI, як порівняти з батьківською Fc-ділянкою, наприклад, як описано або запропоновано в [WO 2017/104783 або WO 2017/046994], та їх комбінації.

В одному варіанті здійснення агоністична антигензв'язувальна молекула або антитіло включають як варіант Fc-ділянки, так і антигензв'язувальний домен. У подальшому варіанті здійснення антиген являє собою мембранний антиген. У подальшому варіанті здійснення антиген є рецептором, експресованим на клітинній поверхні. В деяких варіантах здійснення батьківська Fc-ділянка походить від IgG1 людини. У подальшому варіанті здійснення поліпептид є антитілом. У наступному варіанті здійснення поліпептид являє собою злитий Fc-білок.

В одному аспекті цим винаходом пропонується спосіб отримання агоністичної антигензв'язувальної молекули, яка включає описаний вище варіант Fc-ділянки (варіант Fc-ділянки з підвищеною ізоелектричною точкою (pI)).

В одному варіанті здійснення спосіб цього винаходу має такі ознаки: внесення в батьківську Fc-ділянку щонайменше однієї амінокислотної зміни (як описано вище), що призводить до підвищення ізоелектричної точки (pI), як порівняти з ізоелектричною точкою батьківської агоністичної антигензв'язувальної молекули, що включає батьківську Fc-ділянку; і ідентифікація та виділення агоністичної антигензв'язувальної молекули, де агоністична активність агоністичної антигензв'язувальної молекули, що включає варіант Fc-ділянки, отриманий в результаті вищевказаного внесення зміни, є підвищеною, як порівняти з батьківською агоністичною антигензв'язувальною молекулою.

В одному варіанті здійснення спосіб цього винаходу має ознаки: отримання вектора експресії, який включає відповідний промотор, функціонально зв'язаний з геном, що кодує вищезгадану агоністичну антигензв'язувальну молекулу, ідентифіковану та виділену, як зазначено вище; введення вектора у клітину-хазяїна; культивування клітини-хазяїна для отримання агоністичної антигензв'язувальної молекули та одержання згаданої агоністичної антигензв'язувальної молекули з культури клітин-хазяїнів.

В одному варіанті здійснення за способом цього винаходу можна отримати агоністичну антигензв'язувальну молекулу, агоністична активність якої стосовно антигену в присутності 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки є вищою у 2 рази або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 60 разів або більше, 70 разів або більше, 80 разів або більше або 90 разів або більше, як порівняти з агоністичною активністю стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

В одному варіанті здійснення за способом цього винаходу можна отримати агоністичну антигензв'язувальну молекулу, агоністична активність якої стосовно антигену в присутності 10 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки є вищою у 2 рази або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 60 разів або більше, 70 разів або більше, 80 разів більше або 90 разів або більше, як порівняти з агоністичною активністю стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

В одному варіанті здійснення за способом цього винаходу можна отримати агоністичну антигензв'язувальну молекулу, агоністична активність якої стосовно антигену в присутності 50

мкМ або більше низькомолекулярної сполуки є вищою у 2 рази або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 60 разів або більше, 70 разів або більше, 80 разів або більше або 90 разів або більше, як порівняти з агоністичною активністю стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

В одному варіанті здійснення за способом цього винаходу можна отримати агоністичну антигензв'язувальну молекулу, агоністична активність якої стосовно антигену в присутності 250 мкМ або більше низькомолекулярної сполуки є вищою у 2 рази або більше, 3 рази або більше, 5 разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 60 разів або більше, 70 разів або більше, 80 разів або більше або 90 разів або більше, як порівняти з агоністичною активністю стосовно антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки.

В одному варіанті здійснення в такому способі агоністичну активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену можна оцінити за кількістю IL-2 та/або IFN-γ, що продукуються антиген-експресуючими клітинами.

В одному варіанті здійснення в такому способі агоністичну активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену можна оцінити за кількістю IL-2 та/або IFN-γ, що продукуються виділеними мононуклеарними клітинами периферичної крові людини (PBMC) або Т-клітинами, що походять від мононуклеарних клітин периферичної крові людини (PBMC).

В одному варіанті здійснення в такому способі агоністичну активність агоністичної антигензв'язувальної молекули стосовно антигену можна оцінити за допомогою аналізу з використанням репортерного гена.

IV. Композиції та методи (антигензв'язувальні молекули, зв'язувальна активність яких стосовно антигенів змінюється залежно від концентрації низькомолекулярної сполуки)

A. Антигензв'язувальні молекули, зв'язувальна активність яких стосовно антигенів змінюється залежно від концентрації низькомолекулярної сполуки

В одному аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальні молекули, антигензв'язувальна активність яких змінюється залежно від концентрації низькомолекулярної сполуки. Молекули також можна називати залежними від низькомолекулярної сполуки антигензв'язувальними молекулами (що мають антигензв'язувальну активність, яка залежить від концентрації низькомолекулярної сполуки). У певному аспекті антигензв'язувальні молекули є антитілами. В певних варіантах здійснення антигензв'язувальні молекули цього винаходу мають антигензв'язувальну активність, яка зростає з підвищенням концентрації низькомолекулярної сполуки. В певних варіантах здійснення антигензв'язувальні молекули цього винаходу мають антигензв'язувальну активність, яка зменшується з підвищенням концентрації низькомолекулярної сполуки. В одному варіанті здійснення, коли зв'язувальну активність антигензв'язувальної молекули у присутності низькомолекулярної сполуки порівнюють із зв'язувальною активністю антигензв'язувальної молекули за відсутності низькомолекулярної сполуки, одне значення з вищим, ніж інше значення. В іншому варіанті здійснення, коли зв'язувальна активність антигензв'язувальної молекули за наявності високої концентрації низькомолекулярної сполуки порівнюється зі зв'язувальною активністю антигензв'язувальної молекули за наявності низької концентрації низькомолекулярної сполуки, одне значення з вищим, ніж інше значення. У певних варіантах здійснення низькомолекулярна сполука у цьому винаході є сполукою, специфічною для тканини-мішені. У подальших варіантах здійснення низькомолекулярна сполука у цьому винаході є сполукою, специфічною для тканини пухлини.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальні молекули, що мають високі властивості утримуватися в плазмі. У подальшому аспекті антигензв'язувальні молекули мають антигензв'язувальну активність, яка зростає з підвищенням концентрації низькомолекулярної сполуки. У певних варіантах здійснення низькомолекулярна сполука є сполукою, специфічною для тканини-мішені. У подальших варіантах здійснення антигензв'язувальні молекули мають вищу антигензв'язувальну активність у тканині-мішені, як порівняти з антигензв'язувальною активністю у тканині, яка не є мішенню. У певному аспекті антигензв'язувальні молекули є антитілами. Не обмежуючись конкретною теорією, описану вище зміну кінетики в плазмі можна пояснити наступним чином. Коли антигензв'язувальна активність антигензв'язувальної молекули є високо залежною від концентрації сполуки, специфічної для тканини-мішені, антигензв'язувальна активність цієї антигензв'язувальної молекули в тканинах, відмінних від тканини-мішені, буде нижчою. Як наслідок, антигензалежне виведення (кліренс) цієї антигензв'язувальної молекули в тканинах, відмінних від тканини-мішені, також стане нижчим. Нижча антигензалежна елімінація (кліренс) у більшості тканин

живого організму (тобто тканин, відмінних від тканини-мішені) в цілому призводить до вищих властивостей антигензв'язувальної молекули утримуватися в плазмі. Визначення того, чи має антигензв'язувальна молекула у цьому винаході високі властивості утримуватися в плазмі, може бути зроблено шляхом порівняння з контрольною антигензв'язувальною молекулою. У певних варіантах здійснення ті антигензв'язувальні молекули, які мають підвищену антигензв'язувальну активність, коли концентрація сполуки, специфічної для тканини-мішені, стає вищою, мають вищі властивості утримуватися в плазмі, як порівняти з контрольною антигензв'язувальною молекулою. В одному варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула не має антигензв'язувальної активності, що залежить від концентрації низькомолекулярної сполуки. У певних варіантах здійснення антигензв'язувальна молекула, яка не має антигензв'язувальної активності, що залежить від концентрації низькомолекулярної сполуки, означає антигензв'язувальну молекулу, для якої різниця в антигензв'язувальній активності в присутності низькомолекулярної сполуки та за відсутності низькомолекулярної сполуки є нижчою, наприклад, у 2 рази або менше, 1,8 раза або менше, 1,5 раза або менше, 1,3 раза або менше, 1,2 раза або менше або 1,1 раза або менше. З точки зору порівняння, переважно, щоб антигензв'язувальна активність антигензв'язувальних молекул за цим винаходом та антигензв'язувальна активність контрольних антигензв'язувальних молекул у присутності достатньої кількості низькомолекулярної сполуки були по суті однакові між собою.

У цьому описі винаходу вважається, що величина антигензалежної елімінації антигензв'язувальної молекули, виявлена in vivo, змінюється залежно від кількісного балансу антигенів та антигензв'язувальних молекул, присутніх у плазмі. Як правило вважається, що чим більше антигенів є присутніми/чим менше антигензв'язувальних молекул є присутніми у плазмі, тим більше виявляється антигензалежне виведення антигензв'язувальної молекули. І навпаки, вважається, що чим менше антигенів є присутніми/чим більше антигензв'язувальних молекул є присутніми у плазмі, тим менше виявляється антигензалежне виведення антигензв'язувальної молекули. Антигензв'язувальні молекули цього винаходу не повинні демонструвати високу властивість утримуватися у плазмі за будь-яких умов, але достатньо, щоб антигензв'язувальні молекули виявляли високі властивості утримуватися у плазмі за відповідної умови, при якій виявлено достатнє антигензалежне виведення. Якщо кількість антигену в плазмі занадто мала, властивість утримуватися в плазмі може бути оцінена після збільшення кількості антигену за допомогою будь-яких штучних засобів.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються антигензв'язувальні молекули, що мають низьку здатність накопичувати антиген в плазмі. У подальшому аспекті антигензв'язувальні молекули мають антигензв'язувальну активність, яка зростає з підвищенням концентрації низькомолекулярної сполуки. У певних варіантах здійснення низькомолекулярна сполука є сполукою, специфічною для тканини-мішені. У подальших варіантах здійснення антигензв'язувальні молекули мають вищу антигензв'язувальну активність у тканині-мішені, як порівняти з антигензв'язувальною активністю в тканині, яка не є мішенню. У певному аспекті антигензв'язувальні молекули є антитілами. Не обмежуючись конкретною теорією, описану вище зміну кінетики в плазмі можна пояснити наступним чином. Коли антигензв'язувальна активність антигензв'язувальної молекули є високо залежною від концентрації сполуки, специфічної для тканини-мішені, антигензв'язувальна активність цієї антигензв'язувальної молекули в тканинах, відмінних від тканини-мішені, буде нижчою. Як наслідок, ця антигензв'язувальна молекула має нижчу здатність утворювати комплекс антиген-антитіло в тканинах, відмінних від тканини-мішені. Як правило відомо, що коли антиген зв'язаний антигензв'язувальною молекулою, такою як антитіло, кліренс антигену стає нижчим, а концентрація антигену в плазмі підвищується (антиген накопичується). Менша здатність утворювати комплекс антиген-антитіло в більшості тканин живого організму (тобто тканин, відмінних від тканини-мішені) в цілому призводить до зниження накопичення антигену (іншими словами, здатність антигензв'язувальної молекули накопичувати антиген є нижчою). Визначення того, чи має антигензв'язувальна молекула цього винаходу низьку здатність накопичувати антиген в плазмі, можна зробити шляхом порівняння з контрольною антигензв'язувальною молекулою. У певних варіантах здійснення ті антигензв'язувальні молекули, які мають підвищену антигензв'язувальну активність, коли концентрація сполуки, специфічної для тканини-мішені, стає вищою, мають нижчу здатність накопичувати антиген в плазмі, як порівняти з контрольною антигензв'язувальною молекулою. В одному варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула не має антигензв'язувальної активності, що залежить від концентрації низькомолекулярної сполуки. У певних варіантах здійснення антигензв'язувальна молекула, яка не має антигензв'язувальної активності, що залежить від концентрації низькомолекулярної сполуки, означає антигензв'язувальну молекулу, для якої

різниця в антигензв'язувальній активності в присутності низькомолекулярної сполуки та за відсутності низькомолекулярної сполуки є меншою, наприклад, у 2 рази або менше, 1,8 раза або менше, 1,5 раза або менше, 1,3 раза або менше, 1,2 раза або менше або 1,1 раза або менше. З точки зору порівняння, переважно, щоб антигензв'язувальна активність антигензв'язувальних молекул за цим винаходом та антигензв'язувальна активність контрольних антигензв'язувальних молекул в присутності достатньої кількості сполуки були по суті однакові між собою.

У цьому описі винаходу вважається, що кількість комплексів антиген-антитіло, що утворюються in vivo, залежить від кількості антигену та антигензв'язувальної молекули, присутніх у плазмі. Як правило вважається, що чим більше антигенів/антитіл є присутніми у плазмі, тим більше утворюється комплексів антиген-антитіло. І навпаки, вважається, що чим менше антигенів/антитіл є присутніми у плазмі, тим менше утворюється комплексів антиген-антитіло. Антигензв'язувальні молекули цього винаходу не повинні демонструвати низьку здатність накопичувати антиген в плазмі за будь-яких умов, але достатньо, щоб антигензв'язувальні молекули демонстрували низьку здатність накопичувати антиген в плазмі за відповідної умови, при якій утворюється достатня кількість комплексів антиген-антитіло. Якщо кількість антигену в плазмі занадто мала, здатність накопичувати антиген в плазмі може бути оцінена після збільшення кількості антигену за допомогою будь-яких штучних засобів.

В певних варіантах здійснення різниця в антигензв'язувальній активності, що залежить від концентрації низькомолекулярної сполуки антигензв'язувальних молекул за цим винаходом, є вищою, наприклад, вдвічі або більше, у три рази або більше, п'ять разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 100 разів або більше, 200 разів або більше, 300 разів або більше, 500 разів або більше, $1x10^3$ разів або більше, $2x10^3$ разів або більше, $3x10^3$ разів або більше, $5x10^3$ разів або більше, $1x10^4$ разів або більше, $2x10^4$ разів або більше, $3x10^4$ разів або більше, $5x10^4$ разів або більше або $1x10^5$ разів або більше.

В певних варіантах здійснення зв'язувальна активність антигензв'язувальних молекул може бути виражена значенням KD (константа дисоціації). У подальших варіантах здійснення, коли значення KD для антигензв'язувальної молекули у присутності низькомолекулярної сполуки та значення KD антигензв'язувальної молекули за відсутності низькомолекулярної сполуки порівнюються, то одне значення є меншим, ніж інше значення. Альтернативно, в іншому варіанті здійснення, коли значення KD антигензв'язувальної молекули за наявності високої концентрації низькомолекулярної сполуки порівнюється зі значенням KD антигензв'язувальної молекули за наявності низької концентрації низькомолекулярної сполуки, одне значення є меншим, ніж інше значення. У подальших варіантах здійснення різниця в значеннях KD антигензв'язувальних молекул є вищою, наприклад, вдвічі або більше, у три рази або більше, п'ять разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 100 разів або більше, 200 разів або більше, 300 разів або більше, 500 разів або більше, $1x10^3$ разів або більше, $2x10^3$ разів або більше, $3x10^3$ разів або більше, $5 x 10^3$ разів або більше, $1x10^4$ разів або більше, $2x10^4$ разів або більше, $3x10^4$ разів або більше, $5 x 10^4$ разів або більше або $1x10^5$ разів або більше. Значення KD меншого може бути, наприклад, $9x10^{-7}$ М або менше, $8x10^{-7}$ М або менше, $7x10^{-7}$ М або менше, $6x10^{-7}$ М або менше, $5x10^{-7}$ М або менше, $4x10^{-7}$ М або менше, $3x10^{-7}$ М або менше, $2x10^{-7}$ М або менше, $1x10^{-7}$ М або менше, $9x10^{-8}$ М або менше, $8x10^{-8}$ М або менше, $7x10^{-8}$ М або менше, $6x10^{-8}$ М або менше, $5x10^{-8}$ М або менше, $4x10^{-8}$ М або менше, $3x10^{-8}$ М або менше, $2x10^{-8}$ М або менше, $1x10^{-8}$ М або менше, $9x10^{-9}$ М або менше, $8x10^{-9}$ М або менше, $7x10^{-9}$ М або менше, $6x10^{-9}$ М або менше, $5x10^{-9}$ М або менше, $4x10^{-9}$ М або менше, $3x10^{-9}$ М або менше, $2x10^{-9}$ М або менше, $1x10^{-9}$ М або менше, $9x10^{-10}$ М або менше, $8x10^{-10}$ М або менше, $7x10^{-10}$ М або менше, $6x10^{-10}$ М або менше, $5x10^{-10}$ М або менше, $4x10^{-10}$ М або менше, $3x10^{-10}$ М або менше, $2x10^{-10}$ М або менше, $1x10^{-10}$ М або менше. Наприклад, значення KD більшого може бути таким: $1x10^{-8}$ М або більше, $2x10^{-8}$ М або більше, $3x10^{-8}$ М або більше, $4x10^{-8}$ М або більше, $5x10^{-8}$ М або більше, $6x10^{-8}$ М або більше, $7x10^{-8}$ М або більше, $8x10^{-8}$ М або більше, $9x10^{-8}$ М або більше, $1x10^{-7}$ М або більше, $2x10^{-7}$ М або більше, $3x10^{-7}$ М або більше, $4x10^{-7}$ М або більше, $5x10^{-7}$ М або більше, $6x10^{-7}$ М або більше, $7x10^{-7}$ М або більше, $8x10^{-7}$ М або більше, $9x10^{-7}$ М або більше, $1x10^{-6}$ М або більше, $2x10^{-6}$ М або більше, $3x10^{-6}$ М або більше, $4x10^{-6}$ М або більше, $5x10^{-6}$ М або більше, $6x10^{-6}$ М або більше, $7x10^{-6}$ М або більше, $8x10^{-6}$ М або більше, $9x10^{-6}$ М або більше.

В іншому варіанті здійснення зв'язувальна активність антигензв'язувальних молекул може бути виражена значенням kd (константа швидкості дисоціації) замість значення KD.

В іншому варіанті здійснення зв'язувальна активність антигензв'язувальних молекул може бути виражена кількістю антигену, який зв'язується з антигензв'язувальною молекулою. Наприклад, в аналізах поверхневого плазмонного резонансу зв'язувальна кількість

антигензв'язувальних молекул, іммобілізованих на сенсорному чипі, і зв'язувальна кількість антигену, який потім зв'язався з ними, вимірюються як одиниця резонансу (RU). Антигензв'язувальна активність може бути виражена з використанням зв'язувальної кількості антигену, отриманої звідти, як показника, або, альтернативно, може бути виражена за допомогою величини, отриманої діленням кількості зв'язаного антигену на кількість зв'язаної антигензв'язувальної молекули (тобто кількості зв'язаного антигену на одиницю кількості антигензв'язувальної молекули), як показника. Конкретні методи вимірювання та розрахунку зв'язувальної кількості будуть описані нижче в прикладах. В певних варіантах здійснення, коли кількість зв'язаного антигену у присутності низькомолекулярної сполуки порівнюється з кількістю зв'язаного антигену за відсутності низькомолекулярної сполуки, одне значення більше, ніж інше значення. В іншому варіанті здійснення, коли кількість зв'язаного антигену за наявності високої концентрації низькомолекулярної сполуки порівнюється з кількістю зв'язаного антигену за наявності низької концентрації низькомолекулярної сполуки, одне значення більше, ніж інше значення. У подальших варіантах здійснення різниця в зв'язувальній кількості антигену є вищою, наприклад, вдвічі або більше, в три рази або більше, п'ять разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 100 разів або більше, 200 разів або більше, 300 разів або більше, 500 разів або більше, $1x10^3$ разів або більше, $2x10^3$ разів або більше, $3x10^3$ разів або більше, $5x10^3$ разів або більше, $1x10^4$ разів або більше, $2x10^4$ разів або більше, $3x10^4$ разів або більше, $5x10^4$ разів або більше або $1x10^5$ разів або більше. Зв'язувальна кількість антигену більшого значення може становити, наприклад, 0,01 або більше, 0,02 або більше, 0,03 або більше, 0,04 або більше, 0,05 або більше, 0,06 або більше, 0,07 або більше, 0,08 або більше, 0,09 або більше, 0,1 або більше, 0,2 або більше, 0,3 або більше, 0,4 або більше, 0,5 або більше, 0,6 або більше, 0,7 або більше, 0,8 або більше, 0,9 або більше, 1 або більше. Зв'язувальна кількість антигену меншого значення може становити, наприклад, 0,5 або менше, 0,4 або менше, 0,3 або менше, 0,2 або менше, 0,1 або менше, 0,09 або менше, 0,08 або менше, 0,07 або менше, 0,06 або менше, 0,05 або менше, 0,04 або менше, 0,03 або менше, 0,02 або менше, 0,01 або менше, 0,009 або менше, 0,008 або менше, 0,007 або менше, 0,006 або менше, 0,005 або менше, 0,004 або менше, 0,003 або менше, 0,002 або менше, 0,001 або менше.

У певних варіантах здійснення значення KD, значення kd або значення зв'язувальної кількості, виражені в цьому описі винаходу, вимірюються або розраховуються шляхом проведення аналізу поверхневого плазмонного резонансу при 25 °C або 37 °C (наприклад, див. приклади у цьому описі винаходу).

Концентрацію низькомолекулярної сполуки можна вільно вибирати, доки можна виявити різницю в зв'язувальній активності для антигензв'язувальної молекули. У певних варіантах здійснення висока концентрація включає, наприклад, 1 нМ або вищу концентрацію, 3 нМ або вищу концентрацію, 10 нМ або вищу концентрацію, 30 нМ або вищу концентрацію, 100 нМ або вищу концентрацію, 300 нМ або вищу концентрацію, 1 мкМ або вищу концентрацію, 3 мкМ або вищу концентрацію, 10 мкМ або вищу концентрацію, 30 мкМ або вищу концентрацію, 100 мкМ або вищу концентрацію, 300 мкМ або вищу концентрацію, 1 мМ або вищу концентрацію, 3 мМ або вищу концентрацію, 10 мМ або вищу концентрацію, 30 мМ або вищу концентрацію, 100 мМ або вищу концентрацію, 300 мМ або вищу концентрацію, 1 мМ або вищу концентрацію. Альтернативно, висока концентрація в цьому описі винаходу може бути такою концентрацією, що забезпечує достатню кількість, щоб кожна антигензв'язувальна молекула демонструвала максимальну зв'язувальну активність. В одному варіанті здійснення може бути вибрана як висока концентрація 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ або значення, достатнє для того, щоб кожна антигензв'язувальна молекула демонструвала максимальну зв'язувальну активність у цьому винаході. У певних варіантах здійснення низька концентрація включає, наприклад, 1 мМ або нижчу концентрацію, 300 мкМ або нижчу концентрацію, 100 мкМ або нижчу концентрацію, 30 мкМ або нижчу концентрацію, 10 мкМ або нижчу концентрацію, 3 мкМ або нижчу концентрацію, 1 мкМ або нижчу концентрацію, 300 нМ або нижчу концентрацію, 100 нМ або нижчу концентрацію, 30 нМ або нижчу концентрацію, 10 нМ або нижчу концентрацію, 3 нМ або нижчу концентрацію, 1 нМ або нижчу концентрацію, 300 пМ або нижчу концентрацію, 100 пМ або нижчу концентрацію, 30 пМ або нижчу концентрацію, 10 пМ або нижчу концентрацію, 3 пМ або нижчу концентрацію, 1 пМ або нижчу концентрацію і т. п. Альтернативно, низькою концентрацією у цьому винаході може бути така концентрація, при якій кожна антигензв'язувальна молекула проявляє мінімальну зв'язувальну активність. Випадок по суті "нульової" концентрації (тобто відсутність низькомолекулярної сполуки) може бути вибраний як один із варіантів низької концентрації. В одному варіанті здійснення в цьому винаході може бути вибрана як низька концентрація 1 мМ, 100 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ, концентрація, при якій кожна

антигензв'язувальна молекула проявляє мінімальну зв'язувальну активність, або відсутність низькомолекулярної сполуки. В іншому варіанті здійснення, як відношення високої концентрації до низької концентрації може бути вибрано, наприклад, значення 3 рази або більше, 10 разів або більше, 30 разів або більше, 100 разів або більше, 300 разів або більше, $1x10^3$ разів або більше, $3x10^3$ разів або більше, $1x10^4$ разів або більше, $3x10^4$ разів або більше, $1x10^5$ разів або більше, $3x10^5$ разів або більше, $1x10^6$ разів або більше, $3x10^6$ разів або більше, $1x10^7$ разів або більше, $3x10^7$ разів або більше, $1x10^8$ разів або більше, $3x10^8$ разів або більше, $1x10^9$ разів або більше, 3×10^9 разів або більше, $1x10^{10}$ разів або більше, $3x10^{10}$ разів або більше, $1x10^{11}$ разів або більше, $3x10^{11}$ разів або більше, $1x10^{12}$ разів або більше.

В іншому варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули цього винаходу демонструють цитотоксичність стосовно клітин, що експресують свої антигени. Коли клітина-мішень експресує антиген на своїй поверхні, а антигензв'язувальна молекула цього винаходу зв'язується з нею, ця клітина може бути пошкоджена. Типи пошкодження клітин можуть бути такими типами пошкодження, що спричинені ефекторними клітинами, як, наприклад, антитілозалежна клітинна цитотоксичність (ADCC) та антитілозалежний клітинний фагоцитоз (ADCP), і можуть бути такими типами пошкодження, що спричинені комплементом, як, наприклад, комплементозалежна цитотоксичність (CDC). Альтернативно, типи пошкодження можуть бути такими типами пошкодження, що спричинені цитотоксичним агентом (наприклад, радіоізотопами або хіміотерапевтичними агентами), як у імунокон'югатів. Цитотоксичність у цьому описі винаходу може включати дії, що викликають загибель клітин, дії на пригнічення клітинної проліферації, дії на порушення клітинних функцій тощо. За наявності достатньої кількості антигензв'язувальної молекули за цим винаходом пошкодження можуть бути заподіяні, наприклад, 10 % або більше, 15 %, більше, 20 % або більше, 25 % або більше, 30 % або більше, 35 % або більше, 40 % або більше, 45 % або більше, 50 %, більше, 55 % або більше, 60 % або більше, 65 % або більше, 70 % або більше, 75 % або більше, 80 % або більше, 85 % або більше, 90 % або більше або 95 % або більше клітинам, що експресують антиген. Вимірювання такої цитотоксичної активності може проводитися як порівняння з вимірюванням за відсутності антигензв'язувальної молекули цього винаходу або в присутності негативної контрольної антигензв'язувальної молекули. Типові аналізи цитотоксичності наведені у цьому описі винаходу.

В іншому варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули цього винаходу проявляють нейтралізуючу активність стосовно своїх антигенів. Нейтралізуюча активність означає дію з нейтралізації (або пригнічування, блокування) біологічної активності, пов'язаної з антигенами. В одному варіанті здійснення біологічна активність обумовлена зв'язуванням між лігандом і рецептором. У певних варіантах здійснення антигензв'язувальні молекули цього винаходу пригнічують таке зв'язування між лігандом і рецептором. За наявності достатньої кількості антигензв'язувальної молекули за цим винаходом біологічна активність може пригнічуватися, наприклад, на 10 % або більше, 15 % або більше, 20 % або більше, 25 % або більше, 30 % або більше, 35 % або більше, 40 %, більше, 45 % або більше, 50 % або більше, 55 % або більше, 60 % або більше, 65 % або більше, 70 % або більше, 75 % або більше, 80 % або більше, 85 % або більше, 90 % або більше або 95 % або більше. Вимірювання такої пригнічувальної активності може проводитись як порівняння з вимірюванням за відсутності антигензв'язувальної молекули цього винаходу або в присутності негативної контрольної антигензв'язувальної молекули. Конкретні методи вимірювання нейтралізуючої активності наведені у цьому описі винаходу.

В іншому варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули цього винаходу включають ділянку Fc. У подальших варіантах здійснення антигензв'язувальні молекули цього винаходу включають константну ділянку. Константна ділянка може бути константною ділянкою важкого ланцюга (що включає ділянку Fc), константною ділянкою легкого ланцюга або і тим, і іншим. У певних варіантах здійснення Fc-ділянка є ділянкою з нативною послідовністю. Приклади константної ділянки важкого ланцюга, що походить від антитіл з нативною послідовністю, включають, наприклад, константні ділянки важкого ланцюга IgG1 людини (SEQ ID NO: 219), IgG2 людини (SEQ ID NO: 220), IgG3 людини (SEQ ID NO: 221), IgG4 людини (SEQ ID NO: 222) та ін. Інші приклади константної ділянки важкого ланцюга включають константні ділянки важкого ланцюга, такі як SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 217. Приклади константної ділянки легкого ланцюга, що походить від антитіл з нативною послідовністю, включають, наприклад, константні ділянки легкого ланцюга каппа-ланцюга людини (SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 218), лямбда-ланцюга людини (SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 216) тощо.

В іншому варіанті здійснення Fc-ділянка може бути варіантом Fc-ділянки, отриманого внесенням амінокислотної(их) зміни(змін) у нативну послідовність Fc-ділянки. У певних

варіантах здійснення варіант Fc-ділянки має підвищену зв'язувальну активність стосовно щонайменше одного рецептора Fc-гамма, вибраного із групи, що складається з Fc-гамма-RIa, Fc-гамма-RIIa, Fc-гамма-RIIb та Fc-гамма-RIIIa, як порівняти з нативною послідовністю Fc-ділянки.

У подальших варіантах здійснення антигензв'язувальні молекули цього винаходу є антитілами. У певних варіантах здійснення антитіла є моноклональними антитілами, включаючи химерні антитіла, гуманізовані антитіла або антитіла людини. В одному варіанті здійснення антитіла являють собою фрагменти антитіл, наприклад, фрагменти Fv, Fab, Fab', scFv, діатіла або $F(ab')_2$ тощо. В іншому варіанті здійснення антитіла являють собою повнорозмірні антитіла, наприклад, інтактні антитіла IgG1, інтактні антитіла IgG4 або інший клас антитіл або ізотип, як визначено у цьому описі винаходу.

В іншому варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули цього винаходу утворюють потрійний комплекс разом з невеликою молекулярною сполукою та антигеном. У певних варіантах здійснення антигензв'язувальні молекули є антитілами. В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули цього винаходу зв'язуються з низькомолекулярною сполукою за допомогою CDR1, CDR2, CDR3 важкого ланцюга. В одному варіанті здійснення антигензв'язувальні молекули за цим винаходом мають мотив зв'язування з низькомолекулярною сполукою. Мотив зв'язування з низькомолекулярною сполукою виконаний, наприклад, щонайменше з однієї амінокислоти, присутньої в позиції 33, позиції 52, позиції 52a, позиції 53, позиції 55, позиції 56, позиції 58, позиції 95, позиції 96, позиції 98, позиції 100a, позиції 100b, позиції 100c, згідно з нумерацією Кебота. У подальших варіантах здійснення антигензв'язувальні молекули цього винаходу зв'язуються з низькомолекулярною сполукою за допомогою щонайменше однієї амінокислоти, вибраної із групи, що складається з позиції 33, позиції 52, позиції 52a, позиції 53, позиції 55, позиції 56, позиції 58, позиції 95, позиції 96, позиції 98, позиції 100a, позиції 100b, позиції 100c, згідно з нумерацією Кебота. Далі антиген може зв'язуватися з комплексом, утвореним внаслідок зв'язування антигензв'язувальної молекули цього винаходу з низькомолекулярною сполукою. Крім того, низькомолекулярна сполука може бути присутня на границі взаємодії між антигензв'язувальною молекулою та антигеном і може зв'язуватися з ними обома. Утворення потрійного комплексу антигензв'язувальною молекулою за цим винаходом разом із низькомолекулярною сполукою та антигеном може бути підтверджено, наприклад, кристалографією, як описано нижче, або подібними методами. У певних варіантах здійснення низькомолекулярна сполука є аденозинвмісною сполукою.

В одному варіанті здійснення низькомолекулярна сполука цього винаходу являє собою "сполуку, специфічну для тканини-мішені". У подальших варіантах здійснення "сполука, специфічна для тканини-мішені" є сполукою, специфічною для тканини пухлини. Приклади сполук, специфічних для тканини-мішені, та сполук, специфічних для тканини пухлини, розкриті в цьому описі винаходу (наприклад, у розділах "II. Композиції та методи (агоністичні антигензв'язувальні молекули проти CD137)", "A. Типові антигензв'язувальні молекули проти CD137 або антитіла проти CD137", "Зв'язувальна активність, що залежить від низькомолекулярної сполуки").

B. Антиген

У цьому описі винаходу "антигени" особливо не обмежені за своєю структурою, поки вони включають епітопи, з якими зв'язуються антигензв'язувальні молекули цього винаходу. Антигенами можуть бути неорганічні або органічні речовини. У певних варіантах здійснення приклади антигенів включають: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-кето-PGF1a, 8-ізо-PGF2a, 8-оксо-dG, рецептор аденозину A1, A33, ACE, ACE-2, активін, активін A, активін AB, активін B, активін C, активін RIA, активін RIA ALK-2, активін RIB ALK-4, активін RIIA, активін RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, адресин, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, альфа-1-антитрипсин, антагоніст альфа-V/бета-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, артемін, anti-Id, ASPARTIC, передсердний натрійуретичний пептид, інтегрин av/b3, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, B-лімфоцитостимулюючий фактор (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3 Остеогенін, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMP, b-NGF, BOK, бомбезин, нейротрофічний фактор, що походить від кісток, BPDE, BPDE-ДНК, BTC, фактор комплементу 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, кальцитонін, cAMP, карциноембріональний антиген (CEA), асоційований з раком антиген, катепсин A, катепсин B, катепсин C/DPPI, катепсин D, катепсин E, катепсин H, катепсин L, катепсин O, катепсин S, катепсин V, катепсин X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15,

CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (білок p67), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, ботулотоксин, токсин ентеричної клостродії (Clostridium perfringens), CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, PD1, PDL1, LAG3, TIM3, галектин-9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, асоційований з пухлиною антиген-цитокератин, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, регуляторний фактор комплементу (фактор, що прискорює розпад), des (1-3) -IGF-I (IGF-1 мозку), Dhh, дигоксин, DNAM-1, дезоксирибонуклеаза Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, рецептор ендотеліну, енкефаліназа, eNOS, Eot, еотаксин 1, EpCAM, ефрін B2/EphB4, EPO, ERCC, E-селектин, ET-1, фактор IIa, фактор VII, фактор VIIIc, фактор IX, білок активації фібробластів (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, феритин, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF-3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, фібрин, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, фолікулостимулюючий гормон, фракталкін, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (міостатин), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-alpha1, GFR-alpha2, GFR-alpha3, GITR, глюкагон, Glut4, глікопротеїн IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, гормон, що вивільняє гормон росту, гаптен (NP-cap або NIP-cap), HB-EGF, HCC, глікопротеїн gB оболонки HCMV, глікопротеїн gH оболонки HCMV, HCMV UL, гемопоетичний фактор росту (HGF), Hep B gp120, гепараназа, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), глікопротеїн gB оболонки вірусу простого герпесу (HSV), глікопротеїн gD оболонки вірусу простого герпесу (HSV), HGFA, високомолекулярний антиген, асоційований з меланомою (HMW-MAA), петля V3 глікопротеїну 120 штаму IIIB ВІЛ, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, серцевий міозин людини, цитомегаловірус людини (HCMV), гормон росту людини (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, рецептор IgA, IgE, IGF, білок, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту (IGF), IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-21, IL-23, IL-27, інтерферон (INF)-альфа, INF-бета, INF-гамма, інгібін, індуцибельна синтаза оксиду азоту (iNOS), ланцюг A інсуліну, ланцюг B інсуліну, інсуліноподібний фактор росту 1, інтегрин альфа2, інтегрин альфа3, інтегрин альфа4, інтегрин альфа4/бета1, інтегрин альфа4/бета7, інтегрин альфа5 (alpha V), інтегрин альфа5/бета1, інтегрин альфа5/бета3, інтегрин альфа6, інтегрин бета1, інтегрин бета2, інтерферон гамма, IP-10, I-TAC, JE, калікреїн 2, калікреїн 5, калікреїн 6, калікреїн 11, калікреїн 12, калікреїн 14, калікреїн 15, калікреїн L1, калікреїн L2, калікреїн L3, калікреїн L4, KC, KDR, кератиноцитарний фактор росту (KGF), ламінін 5, LAMP, LAP, LAP (TGF-1), латентний трансформувальний фактор росту-1 (latent TGF-1), білок 1, що зв'язує латентний трансформувальний фактор росту-1 (latent TGF-1 bp1), LBP, LDGF, LECT2, lefty, антиген Ley, антиген, асоційований з Ley, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, ліпопротеїн, LIX, LKN, Lptn, L-селектин, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, легенева поверхня, лютеїнізуючий гормон, бета-рецептор лімфотоксину, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, металопротеази, рецептор фактора росту і розвитку мегакаріоцитів (MGDF), MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-alpha, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, муцин (Muc1), MUC18, інгібувальний фактор Мюллера, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-кадгерин, NCA 90, NCAM, NCAM, неприлізин, нейротрофін-3, -4 або -6, нейротурин, фактор росту нервів (NGF), NGFR, NGF-бета, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, паратиреоїдний гормон, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-кадгерин, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, плацентарна лужна фосфатаза (PLAP), PlGF, PLP, PP14, проінсулин, прорелаксин, протеїн C, PS, PSA, PSCA, простатичний специфічний мембранний антиген (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, ланцюг A релаксину, ланцюг B релаксину, ренін, глікопротеїн F респіраторно-синцитіального вірусу (RSV), глікопротеїн F RSV, Ret, ревматоїдний фактор, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, серин, сироватковий альбумін, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH,

SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (асоційований з пухлиною глікопротеїн-72), TARC, TCA-3, Т-клітинний рецептор (напригlад, Т-клітинний рецептор альфа/бета), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, подібна до плацентарної лужної фосфатази лужна фосфатаза яєчка, TfR, TGF, TGF-альфа, TGF-бета, TGF-бета Pan Specific, TGF-бетаRI (ALK-5), TGF-бетаRII, TGF-бетаRIIb, TGF-бетаRIII, TGF-бета1, TGF-бета2, TGF-бета3, TGF-бета4, TGF-бета5, тромбін, тимусний цитокін-1, тиреостимулюючий гормон, Tie, TIMP, TIQ, фактор згортання крові III, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-альфа, TNF-альфабета, TNF-бета2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (пов'язаний з фактором некрозу пухлини ліганд, що індукує апоптоз (ліганд Apo-2), TL2), TNFSF11 (TRANCE/RANK-ліганд ODF, ліганд OPG), TNFSF12 (TWEAK ліганд Apo-3, ліганд DR3), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (ліганд LIGHT HVEM, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (ліганд GITR ліганд AITR, TL6), TNFSF1A (конектин TNF-a, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (ліганд OX40 (gp34), TXGP1), TNFSF5 (ліганд CD40 (CD154), gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (ліганд Fas ліганд Apo-1, ліганд APT1), TNFSF7 (ліганд CD27 (CD70)), TNFSF8 (ліганд CD30 (CD153)), TNFSF9 (ліганд 4-1BB ліганд CD137), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, рецептор трансферину, TRF, Trk, TROP-2, TLR1 (Толл-подібний рецептор 1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TSG, TSLP, пухлино-асоційований антиген CA125, пухлино-асоційований антиген, що експресує вуглеводи, асоційовані з Ley, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, урокіназа, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-кадгерин, VE-кадгерин-2, VEFGR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, антиген вірусу, VLA, VLA-1, VLA-4, інтегрин рецептора вітронектину (VNR), фактор фон Віллебранда, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, HMGB1, IgA, A бета, CD81, CD97, CD98, DDR1, DKK1, EREG, Hsp90, IL-17/IL-17R, IL-20/IL-20R, окислений LDL, PCSK9, прекалікреїн, RON, TMEM16F, SOD1, хромогранін A, хромогранін B, тау, VAP1, високомолекулярний кініноген, IL-31, IL-31R, Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9, EPCR, C1, C1q, C1r, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9, фактор B, фактор D, фактор H, пропердин, склеростин, фібриноген, фібрин, протромбін, тромбін, тканинний фактор, фактор V, фактор Va, фактор VII, фактор VIIa, фактор VIII, фактор VIIIa, фактор IX, фактор IXa, фактор X, фактор Xa, фактор XI, фактор XIa, фактор XII, фактор XIIa, фактор XIII, фактор XIIIa, TFPI, антитромбін III, EPCR, тромбомодулін, TAPI, tPA, плазміноген, плазмін, PAI-1, PAI-2, GPC3, синдекан-1, синдекан-2, синдекан-3, синдекан-4, LPA та S1P. У певних варіантах здійснення приклади антигенів включають рецептори гормону та фактори росту. У певних варіантах здійснення антигени - це антигени, які експресуються в присутніх в тканинах пухлини клітинах (наприклад, пухлинних клітинах, імунних клітинах, стромальних клітинах тощо) або секретуються ними.

C. Види активності, композиції та способи

В одному варіанті здійснення цитотоксична активність у цьому винаході включає, наприклад, антитілозалежну клітинноопосередковану цитотоксичну (ADCC) активність, активність антитілозалежного клітинного фагоцитозу (ADCP), комплементзалежну цитотоксичну (CDC) активність та цитотоксичну активність Т клітин. CDC-активність відноситься до цитотоксичної активності системи комплементу. З іншого боку, ADCC-активність відноситься до активності пошкодження клітин-мішеней за допомогою ефекторних клітин, яка виникає, коли антигензв'язувальні молекули зв'язуються з антигенами, присутніми на клітинній поверхні клітин-мішеней, а ефекторні клітини потім зв'язуються з антигензв'язувальними молекулами. За допомогою відомих методів (наприклад, Current Protocols in Immunology, Chapter 7. Immunologic studies in humans, Editor, Coligan et al., (1993)) можна визначити, чи володіє антигензв'язувальна молекула, що представляє інтерес, ADCC-активністю або CDC-активністю.

В одному варіанті здійснення "нейтралізуюча активність" у цьому винаході відноситься до активності антигензв'язувальної молекули пригнічувати біологічну активність шляхом її зв'язування з молекулою, яка бере участь у цій біологічній активності. У певних варіантах здійснення біологічна активність обумовлена зв'язуванням між лігандом і рецептором. У певних варіантах здійснення антигензв'язувальна молекула зв'язується з лігандом або рецептором, тим самим пригнічуючи зв'язування між лігандом і рецептором. Коли антигензв'язувальна молекула є антитілом, антигензв'язувальна молекула, що має таку нейтралізуючу активність, називається нейтралізуючим антитілом. Нейтралізуючу активність досліджуваної речовини можна оцінити, порівнюючи біологічну активність у присутності ліганду в умовах, коли досліджувана речовина присутня або відсутня.

В одному аспекті даним винаходом пропонуються способи отримання антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої змінюється залежно від концентрації сполуки. Коли сполука є сполукою, специфічною для тканини-мішені, даним винаходом пропонуються способи отримання антигензв'язувальної молекули, яка здійснює свою дію специфічно в тканині-мішені. У певних варіантах здійснення тканиною-мішенню є тканина пухлини. Коли сполука являє собою сполуку, специфічну для тканини пухлини, даним винаходом пропонуються способи отримання антигензв'язувальної молекули для використання при лікуванні пухлини. У деякому аспекті ці способи отримання передбачають етап вибору антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої в присутності сполуки відрізняється від її антигензв'язувальної активності за відсутності сполуки. У певному аспекті ці способи отримання передбачають етап вибору антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої за наявності високої концентрації сполуки відрізняється від її антигензв'язувальної активності за наявності низької концентрації сполуки. В певних варіантах здійснення ці способи отримання передбачають етапи: (a) отримання значення антигензв'язувальної активності антигензв'язувальної молекули в присутності сполуки, (b) отримання значення антигензв'язувальної активності антигензв'язувальної молекули за відсутності сполуки та (c) вибір антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої в присутності сполуки відрізняється від її антигензв'язувальної активності за відсутності сполуки. В певних варіантах здійснення ці способи отримання передбачають етапи: (a) отримання значення антигензв'язувальної активності антигензв'язувальної молекули за наявності високої концентрації сполуки, (b) отримання значення антигензв'язувальної активності антигензв'язувальної молекули за наявності низької концентрації сполуки та (c) вибір антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої за наявності високої концентрації сполуки відрізняється від її антигензв'язувальної активності за наявності низької концентрації сполуки.

У подальшому аспекті даним винаходом пропонуються способи отримання антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої зростає з підвищенням концентрації сполуки. Альтернативно в іншому аспекті даним винаходом пропонуються способи отримання антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої знижується з підвищенням концентрації сполуки. Способи отримання передбачають етап вибору антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої в присутності сполуки є вищою, ніж її антигензв'язувальна активність за відсутності сполуки. В іншому варіанті здійснення способи отримання передбачають етап вибору антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої за відсутності сполуки є нижчою, ніж її антигензв'язувальна активність у присутності сполуки. В іншому аспекті способи отримання передбачають етап вибору антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої за відсутності сполуки є вищою, ніж її антигензв'язувальна активність у присутності сполуки. В іншому варіанті здійснення способи отримання передбачають етап вибору антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої в присутності сполуки є нижчою, ніж її антигензв'язувальна активність за відсутності сполуки. У подальшому аспекті способи отримання передбачають етап вибору антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої за наявності високої концентрації сполуки є вищою, ніж її антигензв'язувальна активність за наявності низької концентрації сполуки. В іншому варіанті здійснення способи отримання передбачають етап вибору антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої за наявності низької концентрації сполуки є нижчою, ніж її антигензв'язувальна активність за наявності високої концентрації сполуки. В іншому аспекті способи отримання передбачають етап вибору антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої за наявності низької концентрації сполуки є вищою, ніж її антигензв'язувальна активність за наявності високої концентрації сполуки. В іншому варіанті здійснення способи отримання передбачають етап вибору антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої за наявності високої

концентрації сполуки є нижчою, ніж її антигензв'язувальна активність за наявності низької концентрації сполуки.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються способи отримання антигензв'язувальної молекули, що має високі властивості утримуватися в плазмі. В певних варіантах здійснення способи отримання передбачають етап отримання антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої зростає з підвищенням концентрації сполуки. У подальших варіантах здійснення способи отримання передбачають етапи: (a) отримання антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої зростає з підвищенням концентрації сполуки; і (b) вимірювання властивості антигензв'язувальної молекули, отриманої в (a), утримуватися в плазмі. У певних варіантах здійснення сполука є сполукою, специфічною для тканини-мішені. У подальших варіантах сполука є сполукою, специфічною для тканини пухлини. Визначення того, чи має антигензв'язувальна молекула у цьому винаході високі властивості утримуватися в плазмі, може бути здійснено шляхом порівняння відносно контрольної антигензв'язувальної молекули. У певних варіантах здійснення ті антигензв'язувальні молекули, антигензв'язувальна активність яких зростає із підвищенням концентрації сполуки, специфічної для тканини-мішені, мають вищі властивості утримуватися в плазмі, як порівняти з контрольною антигензв'язувальною молекулою. В одному варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула не має антигензв'язувальної активності, що залежить від концентрації сполуки. У певних варіантах здійснення антигензв'язувальна молекула, яка не має антигензв'язувальної активності, що залежить від концентрації сполуки, означає антигензв'язувальну молекулу, для якої різниця в антигензв'язувальній активності в присутності сполуки та за відсутності сполуки становить, наприклад, 2 рази або менше, 1,8 раза або менше, 1,5 раза або менше, 1,3 раза або менше, 1,2 раза або менше або 1,1 раза або менше. З точки зору порівняння, переважно, щоб антигензв'язувальна активність антигензв'язувальних молекул за цим винаходом та антигензв'язувальна активність контрольних антигензв'язувальних молекул в присутності достатньої кількості сполуки були по суті однакові між собою.

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються способи отримання антигензв'язувальної молекули, що має низьку здатність накопичувати антиген в плазмі. В певних варіантах здійснення способи отримання передбачають етап отримання антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої зростає з підвищенням концентрації сполуки. У подальших варіантах здійснення способи отримання передбачають етапи: (a) отримання антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої зростає з підвищенням концентрації сполуки; і (b) вимірювання для антигензв'язувальної молекули, отриманої в (a), здатності накопичувати антиген в плазмі. У певних варіантах здійснення сполука є сполукою, специфічною для тканини-мішені. У подальших варіантах здійснення сполука є сполукою, специфічною для тканини пухлини. Визначення того, чи має антигензв'язувальна молекула у цьому винаході низьку здатність накопичувати антиген в плазмі, можна зробити шляхом порівняння відносно контрольної антигензв'язувальної молекули. В певних варіантах здійснення ті антигензв'язувальні молекули, антигензв'язувальна активність яких зростає з підвищенням концентрації сполуки, специфічної для тканини, мають нижчу здатність накопичувати антиген в плазмі, як порівняти з контрольною антигензв'язувальною молекулою. В одному варіанті здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула не має антигензв'язувальної активності, що залежить від концентрації сполуки. У певних варіантах здійснення антигензв'язувальна молекула, яка не має антигензв'язувальної активності, що залежить від концентрації сполуки, означає антигензв'язувальну молекулу, для якої різниця в антигензв'язувальній активності в присутності сполуки та за відсутності сполуки становить, наприклад, 2 рази або менше, 1,8 раза або менше, 1,5 раза або менше, 1,3 раза або менше, 1,2 раза або менше або 1,1 раза або менше. З точки зору порівняння, переважно, щоб антигензв'язувальна активність антигензв'язувальних молекул за цим винаходом та антигензв'язувальна активність контрольних антигензв'язувальних молекул в присутності достатньої кількості сполуки були по суті однакові між собою.

В певних варіантах здійснення для антигензв'язувальних молекул, отриманих за способами цього винаходу, різниця в антигензв'язувальній активності, що залежить від концентрації сполуки, є вищою у, наприклад, двічі або більше, три рази або більше, п'ять разів або більше, 10 разів або більше, 20 разів або більше, 30 разів або більше, 50 разів або більше, 100 разів або більше, 200 разів або більше, 300 разів або більше, 500 разів або більше, $1x10^3$ разів або більше, $2x10^3$ разів або більше, $3x10^3$ разів або більше, $5x10^3$ разів або більше, $1x10^4$ разів або більше, $2x10^4$ разів або більше, $3x10^4$ разів або більше, $5x10^4$ разів або більше або $1x10^5$ разів або більше.

У певних варіантах здійснення антигензв'язувальна активність може бути виражена значенням KD (константа дисоціації) або значенням kd (константа швидкості дисоціації). Як варіант, її можна виразити, використовуючи кількість антигену, який зв'язався з антигензв'язувальною молекулою, як описано вище. Альтернативно в іншому варіанті здійснення цитотоксична або нейтралізуюча активності антигензв'язувальної молекули можуть бути використані як альтернативні показники антигензв'язувальної активності.

У певних варіантах здійснення вища з антигензв'язувальних активностей включає, наприклад, значення KD у $9x10^{-7}$ М або менше, $8x10^{-7}$ М або менше, $7x10^{-7}$ М або менше, $6x10^{-7}$ М або менше, $5x10^{-7}$ М або менше, $4x10^{-7}$ М або менше, $3x10^{-7}$ М або менше, $2x10^{-7}$ М або менше, $1x10^{-7}$ М або менше, $9x10^{-8}$ М або менше, $8x10^{-8}$ М або менше, $7x10^{-8}$ М або менше, $6x10^{-8}$ М або менше, $5x10^{-8}$ М або менше, $4x10^{-8}$ М або менше, $3x10^{-8}$ М або менше, $2x10^{-8}$ М або менше, $1x10^{-8}$ М або менше, $9x10^{-9}$ М або менше, $8x10^{-9}$ М або менше, $7x10^{-9}$ М або менше, $6x10^{-9}$ М або менше, $5x10^{-9}$ М або менше, $4x10^{-9}$ М або менше, $3x10^{-9}$ М або менше, $2x10^{-9}$ М або менше, $1x10^{-9}$ М або менше або, наприклад, кількість зв'язаного антигену у 0,01 або більше, 0,02 або більше, 0,03 або більше, 0,04 або більше, 0,05 або більше, 0,06 або більше, 0,07 або більше, 0,08 або більше, 0,09 або більше, 0,1 або більше, 0,2 або більше, 0,3 або більше, 0,4 або більше, 0,5 або більше, 0,6 або більше, 0,7 або більше, 0,8 або більше, 0,9 або більше, 1 або більше.

У певних варіантах здійснення нижча з антигензв'язувальних активностей включає, наприклад, значення KD у $1x10^{-8}$ М або більше, $2x10^{-8}$ М або більше, $3x10^{-8}$ М або більше, $4x10^{-8}$ М або більше, $5x10^{-8}$ М або більше, $6x10^{-8}$ М або більше, $7x10^{-8}$ М або більше, $8x10^{-8}$ М або більше, $9x10^{-8}$ М або більше, $1x10^{-7}$ М або більше, $2x10^{-7}$ М або більше, $3x10^{-7}$ М або більше, $4x10^{-7}$ М або більше, $5x10^{-7}$ М або більше, $6x10^{-7}$ М або більше, $7x10^{-7}$ М або більше, $8x10^{-7}$ М або більше, $9x10^{-7}$ М або більше, $1x10^{-6}$ М або більше, $2x10^{-6}$ М або більше, $3x10^{-6}$ М або більше, $4x10^{-6}$ М або більше, $5x10^{-6}$ М або більше, $6x10^{-6}$ М або більше, $7x10^{-6}$ М або більше, $8x10^{-6}$ М або більше, $9x10^{-6}$ М або більше або, наприклад, кількість зв'язаного антигену у 0,5 або менше, 0,4 або менше, 0,3 або менше, 0,2 або менше, 0,1 або менше, 0,09 або менше, 0,08 або менше, 0,07 або менше, 0,06 або менше, 0,05 або менше, 0,04 або менше, 0,03 або менше, 0,02 або менше, 0,01 або менше, 0,009 або менше, 0,008 або менше, 0,007 або менше, 0,006 або менше, 0,005 або менше, 0,004 або менше, 0,003 або менше, 0,002 або менше, 0,001 або менше.

Концентрацію сполуки можна вибирати вільно, доки можна виявити різницю в зв'язувальній активності антигензв'язувальної молекули. Приклади концентрації (високої та низької концентрацій) наведені в цьому описі винаходу. У певних варіантах здійснення приклади високої концентрації включають, наприклад, 1 мкМ або вищу концентрацію, 3 мкМ або вищу концентрацію, 10 мкМ або вищу концентрацію, 30 мкМ або вищу концентрацію, 100 мкМ або вищу концентрацію, 300 мкМ або вищу концентрацію, 1 мМ або вищу концентрацію. Альтернативно, висока концентрація в цьому винаході може бути такою концентрацією, що забезпечує кількість, достатню, щоб кожна антигензв'язувальна молекула демонструвала максимальну зв'язувальну активність. У певних варіантах здійснення приклади низької концентрації включають, наприклад, 1 мМ або нижчу концентрацію, 300 мкМ або нижчу концентрацію, 100 мкМ або нижчу концентрацію, 30 мкМ або нижчу концентрацію, 10 мкМ або нижчу концентрацію, 3 мкМ або нижчу концентрацію, 1 мкМ або нижчу концентрацію. Альтернативно, низька концентрація в цьому винаході може бути такою концентрацією, при якій кожна антигензв'язувальна молекула проявляє мінімальну зв'язувальну активність. Випадок по суті "нульової" концентрації (тобто відсутність сполуки) може бути одним із варіантів низької концентрації.

У подальшому аспекті ці способи отримання передбачають етап вибору антигензв'язувальної молекули, антигензв'язувальна активність якої в присутності сполуки відрізняється від її антигензв'язувальної активності за відсутності сполуки, з бібліотеки антигензв'язувальних молекул. Бібліотека антигензв'язувальних молекул може бути з об'єктивним репертуаром антигензв'язувальних молекул (наївна бібліотека) або може мати тенденційний репертуар антигензв'язувальних молекул. Приклади останнього типу бібліотек включають бібліотеку антигензв'язувальних молекул, яким заздалегідь надається зв'язувальна активність стосовно визначеної сполуки. У певних варіантах здійснення бібліотека антигензв'язувальних молекул - це бібліотека антигензв'язувальних молекул, до яких заздалегідь вноситься(яться) амінокислотна(і) зміна(и) для надання зв'язувальної активності стосовно визначеної сполуки. Приклади такого типу бібліотек включають бібліотеки, описані, наприклад, у міжнародній публікації [WO 2015/083764].

У певних варіантах здійснення способи отримання додатково передбачають етапи: (d) отримання нуклеїнової кислоти, яка кодує антигензв'язувальну молекулу, вибрану в (c), (e)

введення нуклеїнової кислоти за (d) в клітину-хазяїна та (f) культивування клітини-хазяїна за (e) так, щоб антигензв'язувальна молекула експресувалася. Нуклеїнова кислота за (d) може бути однією або декількома нуклеїновими кислотами і може бути включена в один або декілька векторів (наприклад, вектор експресії). У певних варіантах здійснення способи отримання додатково передбачають етап (g) одержання антигензв'язувальної молекули з культури клітин за (f).

Антигензв'язувальні молекули, одержані за способами отримання цього винаходу, також включені в даний винахід.

У подальшому аспекті даним винаходом пропонуються фармацевтичні препарати, що містять антигензв'язувальну молекулу, запропоновану цим винаходом. В одному з варіантів здійснення вищезазначені фармацевтичні препарати додатково містять фармацевтично прийнятний носій. У подальших варіантах здійснення даним винаходом пропонуються фармацевтичні препарати для використання при лікуванні пухлини.

У подальшому аспекті даним винаходом пропонуються способи приготування фармацевтичного препарату, що передбачають змішування антигензв'язувальної молекули, запропонованої цим винаходом, з фармацевтично прийнятним носієм. У подальших варіантах здійснення даним винаходом пропонуються способи приготування фармацевтичного препарату для використання при лікуванні пухлини.

В одному варіанті здійснення антигензв'язувальна молекула, запропонована цим винаходом, при введенні в живий організм виявляє сильнішу антигензв'язувальну активність в тканині пухлини, ніж в непухлинній тканині. Така різниця у відповіді не повинна спостерігатися для кожної дози антигензв'язувальної молекули, а достатньо, щоб різниця спостерігалася для певного діапазону доз. В іншому варіанті здійснення клітини-мішені (клітини, що експресують антиген) сильніше пошкоджуються в тканині пухлини, ніж в непухлинній тканині. В іншому варіанті здійснення клітини-мішені пошкоджуються при меншій дозі в тканині пухлини, ніж у непухлинній тканині. Альтернативно, в іншому варіанті здійснення терапевтичний ефект спостерігається при меншій дозі, ніж доза, при якій спостерігається побічний ефект. Терапевтичний ефект у цьому винаході полягає у розвитку протипухлинного ефекту (наприклад, регресія пухлини, індукція загибелі клітин для клітин пухлини або пригнічення проліферації пухлинних клітин тощо), а побічним ефектом є поява несприятливої події в нормальних тканинах (наприклад, пошкодження нормальних тканин).

В одному варіанті здійснення ступінь ефективності лікарського засобу, що забезпечується антигензв'язувальною молекулою, запропонованою цим винаходом, відрізняється залежно від того, чи має антигензв'язувальна молекула антигензв'язувальну активність, залежну від концентрації сполуки (тобто змінюється залежно від концентрації сполуки). В певних варіантах здійснення антигензв'язувальні молекули цього винаходу являють собою антигензв'язувальну молекулу, антигензв'язувальна активність якої зростає з підвищенням концентрації сполуки. В певних варіантах здійснення контрольна антигензв'язувальна молекула являє собою антигензв'язувальну молекулу, яка не має залежної від концентрації сполуки антигензв'язувальної активності. У певних варіантах здійснення сполука є сполукою, специфічною для тканини пухлини. У певних варіантах здійснення антигензв'язувальна молекула, яка не має антигензв'язувальної активності, що залежить від концентрації сполуки, означає антигензв'язувальну молекулу, для якої різниця в антигензв'язувальній активності в присутності сполуки та за відсутності сполуки становить, наприклад, 2 рази або менше, 1,8 раза або менше, 1,5 раза або менше, 1,3 раза або менше, 1,2 раза або менше або 1,1 раза або менше. Переважно, щоб антигензв'язувальна активність антигензв'язувальних молекул за цим винаходом та антигензв'язувальна активність контрольних антигензв'язувальних молекул в присутності достатньої кількості сполуки були по суті однакові між собою.

В одному варіанті здійснення ефекти, спричинені антигензв'язувальною молекулою цього винаходу та контрольною антигензв'язувальною молекулою як лікарськими засобами, є різними. У певному варіанті здійснення ефекти, спричинені ними як лікарськими засобами, є різними в тканині, де концентрація сполуки є низькою. Приклади тканини з низькою концентрацією сполуки включають непухлинні тканини, такі як здорові тканини. Антигензв'язувальна молекула може бути надана у вигляді фармацевтичного препарату, що містить антигензв'язувальну молекулу. В певних варіантах здійснення в тканині з низькою концентрацією сполуки антигензв'язувальна молекула цього винаходу має меншу активність пошкоджувати клітину-мішень (клітину, що експресує антиген), як порівняти з контрольною антигензв'язувальною молекулою. У певних варіантах здійснення потрібна більша доза антигензв'язувальної молекули цього винаходу для пошкодження клітини в тканині з низькою концентрацією сполуки, як порівняти з контрольною антигензв'язувальною молекулою. В певних варіантах здійснення в

тканині з низькою концентрацією сполуки антигензв'язувальна молекула цього винаходу демонструє нижчий рівень побічного ефекту, як порівняти з контрольною антигензв'язувальною молекулою. В певних варіантах здійснення в тканині з низькою концентрацією сполуки доза, при якій спостерігається побічний ефект, є вищою для антигензв'язувальної молекули цього винаходу, як порівняти з контрольною антигензв'язувальною молекулою. Не потрібно, щоб ці відмінності у відповіді спостерігалися для кожної тканини (наприклад, для всіх тканин, що демонструють низьку концентрацію сполуки), а достатньо, щоб ці відмінності спостерігалися для певних тканин. У певних варіантах здійснення побічний ефект є несприятливою подією в здорових тканинах (наприклад, пошкодження здорових тканин).

В одному варіанті здійснення ефекти, спричинені антигензв'язувальною молекулою цього винаходу та контрольною антигензв'язувальною молекулою як лікарськими засобами, є по суті однаковими. У певних варіантах здійснення ефекти, спричинені ними як лікарськими засобами, є по суті однаковими в тканині, де концентрація сполуки є високою. Приклади тканини з високою концентрацією сполуки включають тканину пухлини. Антигензв'язувальна молекула може бути надана у вигляді фармацевтичного препарату, що містить антигензв'язувальну молекулу. В певних варіантах здійснення в тканині з високою концентрацією сполуки активність пошкоджувати клітину-мішень (клітину, що експресує антиген) є по суті однаковою для антигензв'язувальної молекули цього винаходу та для контрольної антигензв'язувальної молекули. В певних варіантах здійснення доза, необхідна для пошкодження клітини в тканині з високою концентрацією сполуки, є по суті однаковою для антигензв'язувальної молекули цього винаходу та для контрольної антигензв'язувальної молекули. В певних варіантах здійснення в тканині з високою концентрацією сполуки рівень терапевтичного ефекту є по суті однаковим для антигензв'язувальної молекули цього винаходу та контрольної антигензв'язувальної молекули. В певних варіантах здійснення доза, при якій спостерігається терапевтичний ефект в тканині з високою концентрацією сполуки, є по суті однаковою для антигензв'язувальної молекули цього винаходу та для контрольної антигензв'язувальної молекули. У певних варіантах здійснення терапевтичний ефект є протипухлинним ефектом (наприклад, регресія пухлини, індукція загибелі клітин для клітин пухлини або пригнічення проліферації пухлинних клітин тощо).

У подальшому аспекті пропонується антигензв'язувальна молекула для використання як лікарського засобу. У подальшому аспекті пропонується антигензв'язувальна молекула для використання при лікуванні пухлини. У подальшому аспекті пропонується використання антигензв'язувальної молекули у виробництві лікарського засобу. У подальшому аспекті пропонується використання антигензв'язувальної молекули для лікування пухлини. У подальшому аспекті пропонується спосіб лікування пухлини, який передбачає введення ефективної кількості антигензв'язувальної молекули індивідууму, що має пухлину. "Індивідуум" у будь-якому з вищеописаних варіантів здійснення переважно є людиною.

Методи вимірювання концентрації ATP

В іншому аспекті даним винаходом пропонуються методи вимірювання концентрації ATP у розчині. В певних варіантах здійснення вищезазначені методи передбачають етапи: (a) контактування клітини Luc/HEK293 з розщепленою люциферазою, яка експресує рецептор P2Y, з розчином, та (b) вимірювання активності люциферази в клітині. Рецептор P2Y - це рецептор клітинної поверхні, а також зв'язаний з білками G семиспіральний трансмембранний рецептор (GPCR), ендогенний ліганд якого - це позаклітинні пуринові нуклеотиди (ATP, ADP), піримідинові нуклеотиди (UTP, UDP), цукрові нуклеотиди тощо. У подальших варіантах здійснення рецептором P2Y є P2Y1 (номер доступу U42029), P2Y2 (номер доступу U07225), P2Y4 (номер доступу X91852), P2Y6 (номер доступу X97058), P2Y11 (номер доступу AF030335), P2Y12 (номер доступу AJ320495), P2Y13 (номер доступу AF295368) або P2Y14 (номер доступу D13626). У певних варіантах здійснення рецептором P2Y є P2Y11 (номер доступу AF030335). Клітини Luc/HEK293 з розщепленою люциферазою - це рекомбінантні клітини, одержані з використанням технології розщепленої люциферази, що належить ProbeX (Misawa et al., Anal. Chem. (2010) 82, 2552-2560), і вони експресують наступні два білки: (i) злитий білок, у якому C-кінцевий фрагмент з двох фрагментів молекули люциферази, розщепленої на два фрагменти, приєднаний до C-кінця рецептора P2Y, і (ii) злитий білок, у якому N-кінцевий фрагмент з двох фрагментів молекули люциферази, розщепленої на два фрагменти, приєднаний до N-кінця бета-арестину (номер доступу NM_004313).

Коли ATP додають до клітин Luc/HEK293 з розщепленою люциферазою, які експресують рецептор P2Y, відбувається взаємодія між рецептором P2Y та бета-арестином в безпосередній близькості від клітинної мембрани, і в результаті розщеплені фрагменти люциферази поєднуються з відновленням активної молекули люциферази всередині клітини. Активність люциферази можна виміряти, використовуючи субстрат люциферази, такий як, наприклад,

люциферин. В певних варіантах здійснення вищеописані методи також передбачають етап контактування клітини з розчином, що містить субстрат люциферази. Розчину, що містить субстрат люциферази, можна дозволити контактувати з клітиною перед етапом (a) або після етапу (a).

У певних варіантах здійснення розчин, у якому вимірюється концентрація ATP, може бути розчином in vitro або рідиною організму в тканині in vivo. У подальших варіантах здійснення рідина організму може бути вибрана із групи, що складається з крові, лімфатичної рідини, тканинної рідини (міжтканинної рідини, міжклітинної рідини, інтерстиціальної рідини), рідини порожнини тіла (серозної рідини порожнини тіла, плевральної рідини, асцитної рідини, перикардіальної рідини), спинномозкової рідини (ліквору), суглобової рідини (синовіальної рідини) та внутрішньоочної рідини (водянистої вологи). У певних варіантах здійснення рідина організму є міжклітинною рідиною. В іншому варіанті здійснення тканина може бути здоровою тканиною/нормальною тканиною, а може бути хворою тканиною (наприклад, тканиною пухлини). В одному варіанті здійснення, коли за описаними вище методами вимірюють концентрацію ATP у рідині організму в тканині in vivo, етап (i) може бути етапом трансплантації клітини Luc/HEK293 з розщепленою люцеферазою, що експресує рецептор P2Y, у тканину in vivo.

В певних варіантах здійснення активність люциферази можна виміряти, детектуючи світло, що випромінюється, коли люцифераза реагує з її субстратом, таким як люциферин. У випадку, коли розчин є розчином in vitro, така люмінесценція може бути виміряна за допомогою пристрою для виявлення люмінесценції, такого як планшет-ридер. У тому випадку, коли розчин являє собою рідину організму в тканині in vivo, люмінесценція може бути виміряна за допомогою приладу для візуалізації люмінесценції in vivo тощо. Кількісна оцінка на основі вимірювань може бути проведена за методами, відомими в даній галузі техніки, наприклад, шляхом вимірювання розчинів, що мають відому концентрацію ATP, та підготовки калібрувальної кривої, яка показує кореляцію між концентрацією ATP та інтенсивністю люмінесценції.

V. Способи скринінгу

(1) Спосіб скринінгу на антигензв'язувальний домен або антигензв'язувальну молекулу, що володіють антигензв'язувальною активністю, залежною від молекулярної сполуки, з використанням багатовалентних антигенів

В одному аспекті цим винаходом пропонується спосіб високоефективного та високоточного скринінгу, ідентифікації та отримання антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що володіють залежною від молекулярної сполуки антигензв'язувальною активністю, за допомогою злитої молекули, отриманої шляхом злиття двох або більше молекул (двох або більше одиниць) антигену з однією молекулою (однією одиницею) молекули-партнера по злиттю.

В одному аспекті в способі цього винаходу, спосіб скринінгу на антигензв'язувальний домен або антигензв'язувальну молекулу, що володіють антигензв'язувальною активністю, залежною від молекулярної сполуки, передбачає:

(a) контактування в присутності низькомолекулярної сполуки антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули або бібліотеки антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул зі злитою молекулою, в якій дві або більше одиниць антигену злиті з однією одиницею партнера по злиттю,

(b) розміщення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що зв'язалися з антигеном всередині злитої молекули на етапі (a), в умовах за відсутності сполук або при їх низькій концентрації, та

(c) виділення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що дисоціювалися на етапі (b).

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу молекулою, що є партнером по злиттю, з яким злиті дві або більше молекул (дві або більше одиниць) антигену, є димерна Fc-ділянка.

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу Fc-ділянка включає першу субодиницю Fc і другу субодиницю Fc, а один антиген злитий з кожною з першої та другої субодиниць Fc.

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу один з антигенів злитий з N-кінцем кожної з першої та другої субодиниць Fc.

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу бібліотека антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул є фаговою бібліотекою.

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу фаги, включені до фагової бібліотеки, являють собою фаги, що представляють на своїй поверхні два або більше антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул.

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу фаги, включені до фагової бібліотеки, є фагами, що мають дефект у гені pIII, що походить від допоміжного фага.

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу антиген може бути будь-яким антигеном, як описано вище, і приклади можуть включати різні типи "антигенів", описаних у "IV. Композиції та методи (антигензв'язувальні молекули, зв'язувальна активність яких стосовно антигенів змінюється залежно від концентрації низькомолекулярної сполуки)", "B. Антиген". В одному варіанті здійснення як антиген переважно можуть бути використані антигени мембранного типу (наприклад, костимулюючі молекули, такі як CD137, CTLA4, CD40, OX40, RANK, GITR та ICOS).

В одному варіанті здійснення у способі цього винаходу злиття між Fc-ділянкою (Fc-субодиницею) та антигеном може бути досягнуто за звичайним способом із використанням технології генетичної рекомбінації, як описано вище.

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу як низькомолекулярна сполука використовуються різні сполуки, описані вище (наприклад, сполуки, специфічні для пухлини, такі як нуклеозиди, що мають структуру пуринового кільця, такі як аденозин (ADO), аденозинтрифосфат (ATP), аденозиндифосфат (ADP), аденозинмонофосфат (AMP), інозин та, окрім того, комерційно доступний ADPbetaS (виробник Sigma); амінокислоти, такі як аланін, глутамінова кислота та аспарагінова кислота; метаболіти амінокислот, такі як кінуренін, антранілова кислота, 3-гідроксикінуренін і кінуренова кислота; метаболіти арахідонової кислоти, такі як простагландин E2; первинні метаболіти гліколітичного шляху або циклу Кребса, такі як молочна кислота, бурштинова кислота та лимонна кислота; і метаболіти нікотинаміду, такі як 1-метил-нікотинамід).

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу контактування антигену (наприклад, злитої молекули Fc-ділянки та антигену) з фаговою бібліотекою антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул, виділення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, зв'язаних з антигеном, аналіз виділеного антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули у присутності або за відсутності низькомолекулярної сполуки можуть бути проведені згідно з вищеописаним способом та способом, описаним нижче у прикладах з посиланням на методи, добре відомі в галузі техніки цього винаходу.

В одному варіанті здійснення спосіб цього винаходу може включати спосіб, описаний у прикладі 2.

(2) Спосіб скринінгу на антигензв'язувальний домен або антигензв'язувальну молекулу, що володіють антигензв'язувальною активністю, залежною від двох або більше різних низькомолекулярних сполук

В одному аспекті цим винаходом пропонується спосіб скринінгу на антигензв'язувальний домен або антигензв'язувальну молекулу, які володіють антигензв'язувальною активністю, залежною від двох або більше різних низькомолекулярних сполук.

В одному варіанті здійснення спосіб цього винаходу передбачає:

(a) контактування антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули або бібліотеки антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул з антигеном у присутності першої низькомолекулярної сполуки,

(b) розміщення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що зв'язалися з антигеном на етапі (a), в умовах за відсутності першої сполуки або при її низькій концентрації,

(c) виділення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що дисоціювалися на етапі (b),

(d) контактування антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, виділених на етапі (c), з антигеном у присутності другої низькомолекулярної сполуки,

(e) розміщення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що зв'язалися з антигеном на етапі (d), в умовах за відсутності другої сполуки або при її низькій концентрації, та

(f) виділення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що дисоціювалися на етапі (e),

де спосіб не передбачає здійснення між етапами (c) і (d) ампліфікації гена, що кодує антигензв'язувальний домен або антигензв'язувальну молекулу, які були виділені на етапі (c).

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу бібліотека антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул є фаговою бібліотекою. В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу антиген може бути будь-яким антигеном, як описано вище, переважно антигеном мембранного типу (наприклад, костимулюючою молекулою, такою як CD137, CTLA4, CD40, OX40, RANK, GITR і ICOS).

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу як низькомолекулярні сполуки застосовуються різні сполуки, як описано вище (наприклад, сполуки, специфічні для пухлини, такі як нуклеозиди, що мають структуру пуринового кільця, такі як аденозин (ADO), аденозинтрифосфат (ATP), аденозиндифосфат (ADP), аденозинмонофосфат (AMP) та інозин; амінокислоти, такі як аланін, глутамінова кислота та аспарагінова кислота; метаболіти амінокислот, такі як кінуренін, антранілова кислота, 3-гідроксикінуренін та кінуренова кислота; метаболіти арахідонової кислоти, такі як простагландин E2; первинні метаболіти гліколітичного шляху або циклу Кребса, такі як молочна кислота, бурштинова кислота та лимонна кислота; і метаболіти нікотинаміду, такі як 1-метил-нікотинамід).

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу перша низькомолекулярна сполука та друга низькомолекулярна сполука можуть бути будь-якими двома типами різних сполук, вибраних із вищезазначених різних низькомолекулярних сполук.

В одному варіанті здійснення у способі цього винаходу контактування антигену з фаговою бібліотекою антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул, виділення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, пов'язаних з антигеном, аналіз виділеного антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули в присутності або за відсутності першої низькомолекулярної сполуки і аналіз у присутності або за відсутності другої низькомолекулярної сполуки можуть бути проведені згідно з вищеописаним способом та способом, описаним нижче у прикладах з посиланням на методи, добре відомі в галузі техніки цього винаходу.

В одному варіанті здійснення як спосіб цього винаходу може бути спосіб, описаний у прикладі 9.

(3) Спосіб скринінгу на антигензв'язувальний домен або антигензв'язувальну молекулу, що володіють антигензв'язувальною активністю, залежною від низькомолекулярної сполуки, за допомогою наївної бібліотеки

В одному аспекті даним винаходом пропонується спосіб скринінгу на антигензв'язувальний домен або антигензв'язувальну молекулу, що володіють антигензв'язувальною активністю, залежною від низькомолекулярної сполуки, з використанням наївної бібліотеки, що містить безліч фагів, презентуючих антигензв'язувальні домени або антигензв'язувальні молекули (наприклад, домени Fab) різних послідовностей антитіл людини, що генеруються лімфоцитами людини (наприклад, PBMC людини), які не були стимульовані антигеном.

В одному варіанті здійснення спосіб цього винаходу передбачає:

(a) контактування наївної бібліотеки антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул з антигеном у присутності низькомолекулярної сполуки,

(b) розміщення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що зв'язалися з антигеном, на етапі (a), в умовах за відсутності сполуки або при її низькій концентрації, та

(c) виділення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, що дисоціювалися на етапі (b).

В одному варіанті здійснення у способі цього винаходу наївна бібліотека являє собою фагову бібліотеку, що включає фаги, що презентують на своїй поверхні два або більше антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул.

В одному варіанті здійснення у способі цього винаходу наївна бібліотека являє собою бібліотеку, що включає фаги, що мають дефект у гені pIII, що походить від допоміжного фага.

В одному варіанті здійснення у способі цього винаходу наївна бібліотека являє собою бібліотеку, що включає фаги, отримані шляхом підвищення експресії антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули за допомогою низькомолекулярної добавки, яка підвищує рівень експресії з боку промотору регулювання експресії антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули.

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу низькомолекулярною добавкою є ізопропіл-β-тіогалактопіранозид (IPTG) або арабіноза.

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу антиген може бути будь-яким антигеном, як описано вище, переважно антигеном мембранного типу (наприклад, костимулюючою молекулою, такою як CD137, CTLA4, CD40, OX40, RANK, GITR або ICOS).

В одному варіанті здійснення в способі цього винаходу як низькомолекулярна сполука можуть використовуватися різні сполуки, як описано вище (наприклад, сполуки, специфічні для пухлини, такі як нуклеозиди, що мають структуру пуринового кільця, такі як аденозин (ADO), аденозинтрифосфат (ATP), аденозиндифосфат (ADP), аденозинмонофосфат (AMP) та інозин; амінокислоти, такі як аланін, глутамінова кислота та аспарагінова кислота; метаболіти амінокислот, такі як кінуренін, антранілова кислота, 3-гідроксикінуренін та кінуренова кислота,

метаболіти арахідонової кислоти, такі як простагландин E2; первинні метаболіти гліколітичного шляху або циклу Кребса, такі як молочна кислота, бурштинова кислота та лимонна кислота; і метаболіти нікотинаміду, такі як 1-метил-нікотинамід).

В одному варіанті здійснення у способі цього винаходу контактування антигену з фаговою бібліотекою антигензв'язувальних доменів або антигензв'язувальних молекул, виділення антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули, пов'язаних з антигеном, аналіз виділених антигензв'язувального домену або антигензв'язувальної молекули в присутності або за відсутності низькомолекулярної сполуки можуть бути проведені згідно з вищеописаним способом та способом, описаним нижче у прикладах з посиланням на методи, добре відомі в галузі техніки цього винаходу.

В одному варіанті здійснення як спосіб цього винаходу може бути спосіб, описаний у прикладі 10.

ПРИКЛАДИ

Далі наводяться приклади методів та композицій цього винаходу. З точки зору наведеного вище загального опису винаходу зрозуміло, що можна втілити різні інші варіанти здійснення.

Приклад 1. Отримання антигену

(1-1) Отримання позаклітинної ділянки CD137 людини

Позаклітинний домен CD137 людини (також називається hCD137) отримали за методами, відомими фахівцям у галузі. Конкретно, в прямому напрямку від генного фрагмента, що кодує позаклітинну ділянку CD137 людини, зшили генний фрагмент, що кодує гістидинову мітку, та генний фрагмент, що кодує специфічну послідовність, до якої додається біотин (послідовність AviTag, SEQ ID NO: 86). Генний фрагмент, що кодує білок, у якому зшиті позаклітинна ділянка CD137 людини, гістидинова мітка та Avitag (CD137 людини або hCD137-HisBAP, SEQ ID NO: 87), включили до вектора експресії, що експресується в тваринній клітині. Побудований плазмідний вектор трансфектували у клітини FreeStyle293 (Invitrogen), застосовуючи 293-фектин (Invitrogen). Одночасно, плазмідний вектор, що включав ген, який експресує EBNA 1 (SEQ ID NO: 88), трансфектували у той самий час. Клітини, трансфектовані генами згідно з вищезгаданою процедурою, культивували при 37 °C, 8 % CO_2; та білок, що представляв інтерес (позаклітинна ділянка CD137 людини), секретувався у культуральну надосадову рідину. Це культуральне середовище клітин профільтрували крізь 0,22 мкм фільтр, внаслідок чого отримали культуральну надосадову рідину. Культуральну надосадову рідину нанесли на HisTrap-HP (GE Healthcare), та позаклітинна ділянка CD137 людини зв'язалася з колонкою.

Позаклітинну ділянку CD137 людини елюювали, застосовуючи розчин 20 мМ натрію фосфату, 500 мМ натрію хлориду та 500 мМ імідазолу, pH 7,5. Агрегати потім видалили шляхом гель-фільтраційної хроматографії із застосуванням Superdex 200 26/600(GE Healthcare), внаслідок чого отримали очищену позаклітинну ділянку CD137 людини. Концентрацію CD137 людини розрахували, застосовуючи метод за Pace et al. на основі амінокислотної послідовності, що виключає сигнальну послідовність, виведену з SEQ ID NO: 87 (SEQ ID NO: 183) [Pace, C.N., et al. Protein Science 1995; 4; 2411-2423].

(1-2) Отримання позаклітинного домену CD137 людини (hCD137(FXa-перетравленого))

Позаклітинний домен CD137 людини (також називається hCD137(FXa-перетравлений)) отримали за методом, відомим фахівцям у цій галузі. Конкретно, генний фрагмент, що кодує розщеплювану послідовність Фактора Xa, та генний фрагмент, що кодує константну ділянку антитіла, приєднали у прямому напрямку від генного фрагмента, що кодує позаклітинну ділянку CD137 людини. Генний фрагмент, що кодує білок, у якому зшиті позаклітинна ділянка CD137 людини, розщеплювана послідовність Фактора Xa та константна ділянка антитіла (hCD137-F-Fc, SEQ ID NO: 89), включили у вектор експресії, що експресується у тваринній клітині. Побудований плазмідний вектор трансфектували у клітини FreeStyle293 (Invitrogen), застосовуючи 293-фектин (Invitrogen). Одночасно, плазмідний вектор, що включав ген, який кодує EBNA 1 (SEQ ID NO: 88), трансфектували у той самий час. Клітини, трансфектовані генами згідно з вищезгаданими процедурами, культивували при 37 °C, 8 % CO_2; та hCD137-F-Fc секретувався у культуральну надосадову рідину. Це культуральне надосадове середовище клітин профільтрували крізь 0,22 мкм фільтр та зібрали культуральну надосадову рідину.

Культуральні надосадові рідини внесли до колонки, заповненої Білком A [MabSelect SuRe, GE Healthcare]. hCD137-F-Fc зв'язався з колонкою, та його елюювали розчином 50 мМ оцтової кислоти. Після того, як елюат нейтралізували за допомогою 1 M Tris-HCl, pH 8.0, розчинник hCD137-F-Fc замінили розчином 20 мМ Tris, 100 мМ натрію хлориду, 2 мМ кальцію хлориду, pH 8,0. Далі, додали протеазу фактора Xa (Factor Xa Protease) [NEW ENGLAND BioLabs, Cat#. P8010L] та перетравлювали hCD137-F-Fc. Щоб зупинити реакцію потім додали інгібітор протеази (DNS-GGACK, Calbiochem, Cat#251700). 5 M натрію хлорид додали до реакційного

розчину протеази та увесь об'єм отриманого розчину нанесли на HiTrap Benzamidine [GE Healthcare, Cat# 17-5143-01]. Далі, профільтрований крізь колонку розчин нанесли на колонку Білка A [MabSelect SuRe, GE Healthcare] та зібрали фракції прогону. Фракції прогону видалили з агрегатів шляхом гель-фільтраційної хроматографії із застосуванням Superdex 200 Increase 10/30 [GE Healthcare, Cat# 28990944], внаслідок чого отримали очищену позаклітинну ділянку CD137 людини.

(1-3) Отримання біотинілованого злитого з Fc CD137 людини

Біотинілований злитий з Fc CD137 людини (також називається "біотинілований hCD137-Fc", або "bio-hCD137-Fc", або "hCD137-Fc-Bio") отримали за відомими фахівцям у цій галузі методами. Конкретно, генний фрагмент, що кодує константну ділянку антитіла, та генний фрагмент, що кодує специфічну послідовність, до якої додається біотин (послідовність AviTag, SEQ ID NO: 86), приєднали в прямому напрямку від генного фрагмента, що кодує позаклітинну ділянку CD137 людини. Генний фрагмент, що кодує білок (злитий з Fc CD137 людини, SEQ ID NO: 90), у якому зшиті позаклітинна ділянка CD137 людини, константна ділянка антитіла та Avitag, включили до вектора експресії, що експресується в клітині тварини.

Побудований плазмідний вектор трансфектували у клітини FreeStyle293 (Invitrogen), застосовуючи 293-фектин (Invitrogen). Одночасно ген, який експресує EBNA 1 (SEQ ID NO: 88), та ген, який експресує біотин-лігазу (BirA, SEQ ID NO: 91), трансфектували у той самий час та додали біотин з метою біотинілування злитого з Fc CD137 людини. Клітини, трансфектовані генами згідно з вищезгаданими процедурами, культивували при 37 °C, 8 % CO_2; та білок, що представляє інтерес (біотинілований злитий з Fc CD137 людини) секретувався у культуральну надосадову рідину. Цю клітинну культуру профільтрували крізь 0,22 мкм фільтр, внаслідок чого отримали культуральну надосадову рідину.

Культуральну надосадову рідину внесли до колонки, заповненої Білком A [MabSelect SuRe, GE Healthcare], та біотинілований злитий з Fc CD137 людини зв'язався з колонкою. Біотинілований злитий з Fc CD137 людини елюювали, застосовуючи розчин 50 мМ оцтової кислоти. Агрегати потім видалили шляхом гель-фільтраційної хроматографії із застосуванням Superdex 200 26/600 (GE Healthcare), внаслідок чого отримали очищений біотинілований злитий з Fc CD137 людини.

(1-4) Отримання злитого з Fc CD137 людини

Злитий з Fc CD137 людини (також позначається як hCD137-Fc) отримали за відомими фахівцям у цій галузі методами. Конкретно, генний фрагмент, що кодує константну ділянку антитіла, та генний фрагмент, що кодує специфічну послідовність, до якої додається біотин (послідовність AviTag, SEQ ID NO: 86), приєднали у прямому напрямку від генного фрагмента, що кодує позаклітинну ділянку CD137 людини. Генні фрагменти, що кодують білок (злитий з Fc CD137 людини, SEQ ID NO: 90), у якому зшиті позаклітинна ділянка CD137 людини, константна ділянка антитіла та Avitag, включили до вектора експресії, що експресується в клітині тварини. Побудований плазмідний вектор трансфектували у клітини FreeStyle293 (Invitrogen), застосовуючи 293-фектин (Invitrogen). Одночасно ген, який експресує EBNA 1 (SEQ ID NO: 88), трансфектували у той самий час. Клітини, трансфектовані генами згідно з вищезгаданими процедурами, культивували при 37 °C, 8 % CO_2; та білок, що представляє інтерес (злитий з Fc CD137 людини) секретувався у культуральну надосадову рідину. Цю клітинну культуру профільтрували крізь 0,22 мкм фільтр, внаслідок чого отримали культуральну надосадову рідину.

Культуральну надосадову рідину внесли до колонки, заповненої Білком A (MabSelect SuRe, GE Healthcare), та злитий з Fc CD137 людини зв'язався з колонкою. Злитий з Fc CD137 людини елюювали, застосовуючи розчин 50 мМ оцтової кислоти. Далі, агрегати видалили шляхом гель-фільтраційної хроматографії із застосуванням Superdex 200 26/600 (GE Healthcare), внаслідок чого отримали очищений злитий з Fc CD137 людини.

(1-5) Отримання біотинілованого злитого з Fc CD137 мавпи

Біотинілований злитий з Fc CD137 мавпи (також називається "cyCD137-Fc-BAP") отримали за відомими фахівцям у цій галузі методами. Конкретно, генний фрагмент, що кодує константну ділянку антитіла, та генний фрагмент, що кодує специфічну послідовність, до якої додається біотин (послідовність AviTag, SEQ ID NO: 86), приєднали у прямому напрямку від генного фрагмента, що кодує позаклітинну ділянку CD137 мавпи. Генний фрагмент, що кодує білок, у якому зшиті позаклітинна ділянка CD137 мавпи, константна ділянка антитіла та Avitag, (злитий з Fc CD137 мавпи, SEQ ID NO: 92), включили до вектора експресії, що експресується в клітині тварини.

Побудований плазмідний вектор трансфектували у клітини FreeStyle293 (Invitrogen), застосовуючи 293-фектин (Invitrogen). Одночасно ген, який експресує EBNA 1 (SEQ ID NO: 88),

та ген, який експресує біотин-лігазу (BirA, SEQ ID NO: 91), трансфектували у той самий час; та додали біотин з метою мічення біотином злитого з Fc CD137 мавпи. Клітини, трансфектовані генами згідно з вищезгаданими процедурами, культивували при 37 °C, 8 % CO_2; та білок, що представляє інтерес (біотинілований злитий з Fc CD137 мавпи) секретувався у культуральну надосадову рідину. Цю клітинну культуру профільтрували крізь 0,22 мкм фільтр, внаслідок чого отримали культуральну надосадову рідину.

Культуральну надосадову рідину внесли до колонки, заповненої Білком A [MabSelect SuRe, GE Healthcare], та біотинілований злитий з Fc CD137 мавпи зв'язався з колонкою. Біотинілований злитий з Fc CD137 мавпи елюювали, застосовуючи розчин 50 мМ оцтової кислоти. Агрегати потім видалили шляхом гель-фільтраційної хроматографії із застосуванням Superdex 200 increase (збільшення) 10/300 (GE Healthcare), внаслідок чого отримали очищений біотинілований злитий з Fc CD137 мавпи.

Приклад 2. Отримання ATP-залежних антитіл проти CD137

(2-1) Отримання антитіл із залежною від низькомолекулярної сполуки антигензв'язувальною активністю (антитіла, що налагоджуються низькомолекулярною сполукою ("свіч-антитіла")) з раціонально побудованої бібліотеки, що застосовує ATP (1)

(2-1-1) Пенінг

Антитіла, які демонструють зв'язувальну активність стосовно антигенів у присутності аденозинтрифосфату (аденозин-5'-трифосфат; ATP) отримали з раціонально побудованої фагової бібліотеки антитіл, побудованої у попередньому патенті, WO2015/083764. Зауважте, що антитіла із зв'язувальною активністю, залежною від низькомолекулярної сполуки, стосовно антигену (наприклад, CD137) можна назвати "свіч-антитілами" або "антитілами, що налагоджуються низькомолекулярною сполукою", та антитіла із зв'язувальною активністю, залежною від ATP, стосовно антигену (наприклад, CD137) можна назвати "свіч-антитілами" або "антитілами, що налагоджуються аденозинтрифосфатом (ATP)". Для отримання зібрали фаги, що презентують антитіла, які у присутності ATP демонструють зв'язувальну активність стосовно антигену, захопленого на мікроносіях. Після цього зібрали фаги з елюатів, елюйованих з мікроносіїв за відсутності ATP.

Фаги отримали за загальним методом з E. coli, що є носієм побудованого фагміду фагового дисплея. Конкретно, E. coli, що є носієм побудованого фагмідного вектора, інфікували M13KO7ΔpIII (побудований як "гіперфаг") (PROGEN Biotechnik), та фаги зібрали з надосадових рідин, культивованих протягом ночі при 30 °C. Розчин фагової бібліотеки отримали шляхом розведення Tris-забуференим сольовим розчином (TBS) популяції фагів, преципітованих внаслідок додавання 2,5 M NaCl/10 % PEG до культури E.coli, у якій здійснювалося виробництво фагів. Потім додали BSA до розчину фагової бібліотеки до кінцевої концентрації 4 %. Пенінг виконували, застосовуючи антитіло, іммобілізоване на магнітних мікроносіях. Як магнітні мікроносії застосовували мікроносії Sera-Mag NeutrAvidin (Thermo Fisher Scientific) або Dynabeads M-280 StreptAvidin (Life Technologies). Як антиген застосовували біотинілований аденозинтрифосфат (аденозин-5'-трифосфат; ATP), який купили у Jena Bioscience, або hCD137-Fc-Bio (SEQ ID NO: 90), або bio-hCD137 (SEQ ID NO: 89), які біотинілували з hCD137(FXa-перетравлений), застосовуючи NHS-PEO4-Biotin (PIERCE) з попередньо не визначеною вагою, що отримали у Прикладах 1-2 та 1-3.

Пенінг здійснювали, щоб ефективно отримати низькомолекулярну сполуку, яка може відігравати роль налагоджувача для залежних від ракової тканини свіч-антитіл. Конкретно, пенінг з метою збагачення антитіл, які зв'язуються з антигеном у присутності ATP, який є низькомолекулярною сполукою, та не зв'язуються з антигеном за відсутності ATP, виконували з посиланням на методи, продемонстровані у попередньому патенті [WO2015/083764]. У Раунді 1 для усіх, біотинілованого hCD137 (bio-hCD137), hCD137-Fc-Bio та біотинілованого ATP (Біо-ATP), пенінг виконували із застосуванням методу, у якому твердофазна іммобілізація біотинілованих антигенів на магнітних мікроносіях (що має назву "твердофазний метод на мікроносіях") передує додаванню розчину отриманої фагової бібліотеки. Для Біо-ATP пенінг з метою збагачення антитіл, які можуть зв'язуватися з антигеном (Біо-ATP) за відсутності ATP як низькомолекулярної сполуки, виконували з посиланням на методи, описані у вищезазначеному попередньому патенті [WO2015/083764]. Для hCD137-Fc-Bio 4 нМ небіотинілованої Fc-ділянки IgG1 людини додали, щоб видалити антитіла, які зв'язуються з Fc-ділянкою. Зібраний фаг додали до штаму ER2738 E. coli, щоб інфікувати фагом E. coli, потім зібрану E. coli інфікували гіперфагом, та фаг зібрали з надосадової рідини, культивованої протягом ночі при 30 °C.

Починаючи з Раунду 2 пенінг здійснювали тільки на біотинілованому hCD137 (bio-hCD137) та hCD137-Fc-Bio, щоб збагатити антитіла, які зв'язуються з антигеном у присутності ATP, проте не зв'язуються з антигеном за відсутності ATP, у твердофазному методі на основі мікроносіїв,

посилаючись при цьому на метод, продемонстрований у попередньому патенті [WO2015/083764]. Для hCD137-Fc-Bio в обох випадках 4 нМ небіотинілованої Fc-ділянки IgG1 людини додали, щоб видалити антитіла, які зв'язуються з Fc-ділянкою. Подібний пенінг повторювали до Раунду 5, щоб збагатити послідовності антитіл, які представляють інтерес.

(2-1-2) Оцінювання зв'язувальної активності у присутності та за відсутності ATP за допомогою фагового ELISA

З єдиних колоній E. coli, отриманих згідно з вищеописаними методами, фаг-вмісну культуральну надосадову рідину зібрали, застосовуючи традиційний метод [Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145]. NucleoFast 96 (MACHEREY-NAGEL) застосовували для ультрафільтрації зібраної культуральної надосадової рідини. Фільтрат видалили шляхом центрифугування (4500 g, 45 хвилин) NucleoFast 96, до якого внесли 100 мкл культуральної надосадової рідини у кожну лунку. NucleoFast 96 знов промили шляхом центрифугування (4500 g, протягом 30 хвилин), додаючи 100 мкл H_2O до кожної лунки. Нарешті додали 100 мкл TBS та відновили фаговий розчин, що містився у надосадових рідинах у лунках NucleoFast 96, який залишили відстоюватися при кімнатній температурі протягом 5 хвилин.

Очищені фаги з доданими TBS або ATP/TBS піддали ELISA за наступною процедурою. Покриті стрептавідином мікропланшети з 384 лунками (Greiner) покривали протягом ночі 10 мкл TBS, що містив біотиніловані антигени (bio-hCD137, hCD137-Fc-Bio та біо-Fc), отримані у Прикладі 1. Після того, як біотиніловані антигени, які не зв'язалися з планшетом, видалили шляхом промивання кожної лунки планшета Tris-забуференим сольовим розчином з Tween 20 (TBST), лунки блокували 80 мкл 2 % Skim Milk-TBS протягом однієї години або більше. 2 % Skim Milk-TBS видалили шляхом промивання TBST, після чого фагам, що презентують антитіло, дозволили зв'язуватися з біотинілованим антигеном, присутнім у кожній лунці за відсутності або у присутності ATP, залишивши планшети з приготовленими очищеними фагами, доданими до кожної лунки, на 1 годину при кімнатній температурі. До кожної лунки, промитої за допомогою TBST або ATP/TBST, додали HRP-кон'юговані антитіла проти M13 (GE Healthcare 27-9421-01), розведені TBS або ATP/TBS, та планшет інкубували протягом однієї години. Після промивання TBST або ATP/TBST розвиток кольору розчину у кожній лунці, до якої було додано єдиний розчин TMB (ZYMED), припинили шляхом додавання сірчаної кислоти, та потім розвиток кольору виміряли поглинанням при 450 нм.

Як наслідок, ідентифікували декілька антитіл зі зміненою зв'язувальною активністю стосовно bio-hCD137 або hCD137-Fc-Bio у присутності або за відсутності ATP.

Результати фагового ELISA із застосуванням клонів після Раундів 4 та 5 пенінгу наведено у Таблиці 9.

Тут, клони з поглинанням 0,2 або більше у присутності ATP та відношенням "сигнал-шум" поглинання вище 2-х у присутності/за відсутності антигену визначили як позитивні клони. Крім того, вважали, що серед позитивних клонів клони з відношенням "сигнал-шум" поглинання вище 2-х у присутності/за відсутності ATP є клонами з ATP-залежною антигензв'язувальною активністю (свіч-клонами).

Таблиця 9

Антиген, що застосовувався у пенінгу	Біотинілований hCD137		hCD137-Fc-Bio	
Раунд	4	5	4	5
Кількість клонів, які піддали ELISA	384	384	384	384
Кількість позитивних клонів (поглинання в ATP+ ≥ 0,2; відношення +/- антиген > 2,0)	31	4	125	169
Кількість свіч-клонів (відношення +/- ATP > 2)	12	2	118	164

(2-1-3) Аналіз послідовностей свіч-антитіл, антигензв'язувальна активність яких змінюється у присутності/за відсутності ATP

На основі результатів фагового ELISA проаналізували нуклеотидні послідовності генів, ампліфікованих із застосуванням специфічних праймерів pBAD-F, G1seq-R з клонів з ATP-залежною антигензв'язувальною активністю (свіч-клонів). В результаті аналізу отримали нуклеотидні послідовності клонів, які, як оцінювалося, зв'язуються з CD137 людини у присутності ATP, проте не зв'язуються з CD137 людини за відсутності ATP.

(2-2) Отримання антитіл, які зв'язуються з антигенами у присутності низькомолекулярної сполуки з раціонально побудованої бібліотеки із застосуванням ATP (2)

(2-2-1) Пенінг

Антитіла, які демонструють зв'язувальну активність стосовно антигенів у присутності ATP отримали з раціонально побудованої фагової бібліотеки антитіл, побудованої у попередньому [патенті WO2015/083764]. Для отримання узяли фаги, що презентують антитіла, які демонструють зв'язувальну активність стосовно антигенів у присутності ATP, після чого фаги одержали з елюату, елюйованого з мікроносіїв за відсутності ATP.

Фаги отримали за загальним методом з E. coli, що є носієм побудованого фагміду фагового дисплея. Конкретно, E. coli, що є носієм побудованого фагмідного вектора, інфікували M13KO7TC (WO2015046554A1) або M13KO7ΔpIII (гіперфаг) (PROGEN Biotechnik), та фаги отримали з надосадових рідин, культивованих протягом ночі при 30 °C. Розчин фагової бібліотеки отримали шляхом розведення з використанням TBS популяції фагів, преципітованих внаслідок додавання 2,5 M NaCl/10 % PEG до культури E. coli, у якій здійснювалося виробництво фагів. Потім додали BSA до розчину фагової бібліотеки до кінцевої концентрації 4 %. Пенінг виконували, застосовуючи антитіла, іммобілізовані на магнітних мікроносіях. Як магнітні мікроносії застосовували покриті NeutrAvidin мікроносії (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated), мікроносії NeutrAvidin (TAMAGAWA SEIKI) або Dynabeads MyOne StreptAvidin T1 (Thermo Fisher Scientific). Як антиген застосовували hCD137-Fc-Bio або bio-hCD137, отримані у Прикладі 1.

Пенінг здійснювали, щоб ефективно отримати свіч-антитіла, що налагоджуються низькомолекулярною сполукою, які залежать від низькомолекулярної сполуки, яка може відігравати роль налагоджувача у ракових тканинах. Конкретно, пенінг з метою збагачення антитіл, які зв'язуються з антигенами у присутності аденозинтрифосфату (аденозин-5'-трифосфату; ATP), який є низькомолекулярною сполукою, та які не зв'язуються з антигенами за відсутності ATP, виконували з посиланням на методи, описані у попередньому патенті WO2015/083764. Для bio-hCD137 здійснювали метод, при якому заздалегідь додається розчин приготованої фагової бібліотеки після твердофазної іммобілізації біотинілованих антигенів на магнітних мікроносіях (називається "твердофазний метод на основі мікроносіїв"), та метод, при якому заздалегідь додаються магнітні мікроносії після змішування розчину приготованої фагової бібліотеки з біотинілованими антигенами (називається "рідиннофазним методом"). Для hCD137-Fc-Bio 4 нМ небіотинілованої Fc-ділянки IgG1 людини додали, щоб видалити антитіла, які зв'язуються з Fc-ділянкою, та пенінг виконували тільки за рідиннофазним методом. Зібрані фаги додали до штаму ER2738 E. coli, та дозволили інфікувати E. coli, потім зібрану E. coli інфікували M13KO7TC (WO2015046554A1) або M13KO7ΔpIII (гіперфаг) (PROGEN Biotechnik), та після культивування протягом ночі при 30 °C фаги зібрали з надосадової рідини. Подібний пенінг здійснювали до Раунду 5.

(2-2-2) Оцінювання зв'язувальної активності у присутності та за відсутності ATP за допомогою фагового ELISA

З єдиних колоній E. coli, отриманих після кожного з Раундів згідно з вищеописаними методами, фаг-вмісні культуральні надосадові рідини зібрали, застосовуючи традиційний метод (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145). NucleoFast 96 (MACHEREY-NAGEL) застосовували для ультрафільтрації зібраних культуральних надосадових рідин. Фільтрат видалили шляхом центрифугування (4500 g, 45 хвилин) NucleoFast 96, де внесли 100 мкл культуральної надосадової рідини у кожну лунку. NucleoFast 96, у якому 100 мкл H_2O додали до кожної лунки, знов промили шляхом центрифугування (4500 g протягом 30 хвилин). Нарешті додали 100 мкл TBS та одержали фаговий розчин, що містився у надосадових рідинах у лунках NucleoFast 96, який залишили відстоюватися при кімнатній температурі протягом 5 хвилин.

Очищені фаги з доданими TBS або ATP/TBS піддали ELISA за нижчеописаною процедурою. Мікротитраційні планшети StreptaWell 96 (Roche) іммобілізували протягом ночі за допомогою 100 мкл TBS, що містив біотиніловані антигени (hCD137-Fc-Bio або bio-hCD137), отримані у Прикладі 1. Після видалення біотинілованого антигену, який не зв'язався з планшетами, шляхом промивання кожної лунки планшетів TBS, лунки блокували 250 мкл 2 % SkimMilk-TBS протягом 1 години або більше. 2 % Skim Milk-TBS видалили, після чого фаги, що презентують антитіло, зв'язалися з біотинілованим антигеном, присутнім у кожній лунці за відсутності або у присутності ATP, залишивши планшети з приготовленими очищеними фагами, доданими до кожної лунки, при 37 °C на 1 годину. До кожної лунки, промитої TBST або ATP/TBST, додали HRP-кон'юговані антитіла проти M13 (GE Healthcare 27-9421-01), розведені у TBS або ATP/TBS, та планшет інкубували протягом однієї години. Після промивання TBST або ATP/TBST розвиток кольору розчину у кожній лунці, до якої було додано єдиний розчин TMB (ZYMED), припинили шляхом додавання сірчаної кислоти, та потім розвиток кольору виміряли поглинанням при 450 нм.

Як наслідок, ідентифікували декілька антитіл зі зміненою зв'язувальною активністю стосовно bio-hCD137 або hCD137-Fc-Bio у присутності або за відсутності ATP.

Як приклад, результати фагового ELISA із застосуванням клонів після пенінгу Раунду 5 наведено у Таблиці 10.

Тут, клони з поглинанням 0,2 або більше у присутності ATP та відношенням "сигнал-шум" поглинання вище 2-х у присутності/за відсутності антигену визначили як позитивні клони. Крім того, вважали, що серед позитивних клонів клони з відношенням "сигнал-шум" поглинання вище 2-х у присутності/за відсутності ATP є клонами з ATP-залежною антигензв'язувальною активністю (свіч-клонами).

Таблиця 10

Антиген, що застосовувався у пенінгу	hCD137-Fc-Bio	hCD137-Fc-Bio	Біотинілований hCD137	Біотинілований hCD137
Метод пенінгу	Рідиннофазний	Рідиннофазний	Рідиннофазний	Твердофазний на мікроносії
Фаг-помічник, що застосовувався у пенінгу	M13KO7ΔpIII	M13KO7ΔpIII та M13KO7TC	M13KO7ΔpIII	M13KO7ΔpIII
Кількість клонів, які піддали ELISA	384	96	96	96
Кількість позитивних клонів (поглинання в ATP+ ≥ 0,2; відношення +/- антиген > 2,0)	383	79	41	29
Кількість свіч-клонів (відношення +/- ATP > 2)	375	77	40	29

(2-2-3) Аналіз послідовностей свіч-антитіл, антигензв'язувальна активність яких змінюється у присутності/відсутності ATP

На основі результатів фагового ELISA проаналізували нуклеотидні послідовності генів, ампліфікованих з клонів з ATP-залежною антигензв'язувальною активністю (свіч-клонів), із застосуванням специфічних праймерів pBAD-F, G1seq-R. В результаті аналізу отримали нуклеотидні послідовності клонів, які, як оцінювалося, зв'язуються з CD137 людини у присутності ATP, проте не зв'язуються з CD137 людини за відсутності ATP.

(2-3) Вибір свіч-антитіл

Сімнадцять зразків вибрали з клонів, які, як оцінювалося, мають ATP-залежну антгензв'язувальну активність, та які отримали внаслідок аналізів у Прикладах 2-1-3 та 2-2-3, та назви клонів були переписані, як показано у Таблиці 11.

Таблиця 11

	Назва фага	Назва клону варіабельної ділянки антитіла
1	dBBATk14-4_003	dBBAT007
2	dBBATk14-4_089	dBBAT013
3	dBBATk17-4_002	dBBAT015
4	dBBATk17-4_009	dBBAT017
5	dBBATk17-4_075	dBBAT019
6	dBBATk05-5_052	dBBAT021
7	dBBATk05-5_076	dBBAT025
8	dBBATk12-5_038	dBBAT029
9	dBBATk12-5_048	dBBAT031
10	dBBATk14-5_012	dBBAT037
11	dBBATk14-5_053	dBBAT042
12	dBBAHk14SF-3_016	dBBAT053
13	dBBAHk14SF-3_032	dBBAT056
14	dBBAHk14FF-4_028	dBBAT091
15	dBBAHk14FS-5_074	dBBAT112
16	dBBAHk14MS-5_034	dBBAT118
17	dBBAHk14MS-5_093	dBBAT119

(2-4) Експресія та очищення свіч-антитіл, антигензв'язувальна активність яких змінюється залежно від присутності/відсутності ATP

Гени, що кодують варіабельні ділянки антитіл, наведені у Таблиці 11, які отримали з раціонально побудованої фагової бібліотеки, вставили у плазміди IgG1/лямбда людини для експресії у тваринах. Антитіла експресували, застосовуючи описані нижче методи. Отримані плазміди ввели за методом ліпофекції у лінію FreeStyle 293-F (Invitrogen), яка походить від зародкових ниркових клітин людини, та яку суспендували у середовищі FreeStyle 293 Expression Medium (Invitrogen) з щільністю клітин 1,33 x 10^6 клітин/мл, при цьому по 3 мл посіяли у кожну лунку планшетів з 6 лунками. Антитіла очистили, застосовуючи rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) від культуральних надосадових рідин, культивованих протягом 4 днів в інкубаторі з CO_2 (37 °C, 8 % CO_2, 90 обертів/хвилину), за методом, відомим фахівцям у цій галузі. Спектрофотометри застосовували для вимірювання поглинання при 280 нм розчинів очищених антитіл. З отриманих виміряних значень концентрації очищених антитіл розрахували, застосовуючи коефіцієнти екстинкції, розраховані за методом PACE (Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

(2-5) Оцінювання антитіл проти CD137, ідентифікованих за методом фагового дисплея

(2-5-1) Експресія та очищення свіч-антитіл, які зв'язуються з антигенами залежно від присутності або відсутності ATP та його метаболітів

Гени, що кодують варіабельні ділянки антитіл, отриманих з раціонально побудованої фагової бібліотеки людини, вставили в плазміди експресії, що експресуються в тваринних клітинах, які мають константну ділянку важкого ланцюга, злиту з геном, що кодує Gly та Lys, у прямому напрямку модифікованого IgG1 людини (P253) (SEQ ID NO: 93), та константну ділянку легкого ланцюга лямбда Lamlib (SEQ ID NO: 63). Назви клонів та номери послідовностей перелічені у Таблиці 12.

Таблиця 12

Оцінені клони

	Назва клону	SEQ ID NO важкого ланцюга (повнорозмірна)	SEQ ID NO легкого ланцюга (повнорозмірна)
1	dBBAT007-P253	94	113
2	dBBAT013-P253	95	114
3	dBBAT015-P253	96	115
4	dBBAT017-P253	97	116
5	dBBAT019-P253	98	117
6	dBBAT025-P253	99	118
7	dBBAT029-P253	100	119
8	dBBAT031-P253	100	119
9	dBBAT037-P253	101	120
10	dBBAT042-P253	102	121
11	dBBAT053-P253	103	122
12	dBBAT056-P253	104	123
13	dBBAT021-P253	105	124
14	dBBAT091-P253	106	125
15	dBBAT112-P253	107	126
16	dBBAT118-P253	108	127
17	dBBAT119-P253	109	128
18	dBBAT121-P253	110	129
19	dBBAT122-P253	111	130
20	dBBAT134-P253	112	131

Антитіла експресували та очистили за відомими фахівцям у цій галузі методами. Спектрофотометри застосовували для вимірювання поглинання при 280 нм розчинів очищених антитіл. З отриманих виміряних значень концентрації очищених антитіл розрахували, застосовуючи коефіцієнти екстинкції, розраховані за методом PACE (Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

(2-5-2) Оцінювання впливу ATP, ADP та AMP на зв'язування CD137 людини за допомогою поверхневого плазмонного резонансу

Biacore T200 (GE Healthcare) застосовували для аналізу взаємодії реакції антиген-антитіло між антитілами проти CD137 та hCD137 (FXa-перетравлені). Антитіла проти CD137 захопили на сенсорний чип CM3 (GE Healthcare), на якому іммобілізували Білок G (CALBIOCHEM) у відповідних кількостях за допомогою методу іммобілізації по аміно-групі, та антигену hCD137 (FXa-перетравлений), отриманому у Прикладі 1-2, дозволили взаємодіяти. Як буфер прогону застосовували 20 мМ ACES, 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$, 0,05 % Tween20 (pH 7,4), а як розчин для регенерації застосовували 10 мМ гліцин-HCl (Glycine-HCl) (pH 1,5).

Після захоплення антитіла проти CD137, суспендовані у TBS, 500 нМ hCD137 (FXa-перетравлені), впорскували у кожну проточну комірку з витратою потоку 10 мкл/хв протягом трьох хвилин. Цей трихвилинний період слугував як фаза зав'язування для hCD137 (FXa-перетравлений), та після завершення фази зв'язування двохвилинний період перемикання на буфер прогону слугував як фаза дисоціації для hCD137 (FXa-перетравлений). Після завершення фази дисоціації регенеративний розчин впорскували з витратою потоку 30 мкл/хв протягом 30 секунд. Вищезазначене було циклом вимірювання зв'язувальної активності антитіл проти CD137. Зв'язувальну кількість hCD137 (FXa-перетравлений), що взаємодіяв з антитілом проти CD137 у фазі зв'язування, скорегували за кількістю захопленого антитіла. Програмне забезпечення Biacore T200 Evaluation Software Version 2.0 застосовували для представлення зв'язувальної кількості (RU) на 1RU ліганду захоплення, та отримали значення захоплення антитіла (кількість захопленого антитіла) та значення зв'язування з антигеном. Зв'язувальну кількість антигену наведено у Таблиці 13. Оскільки зв'язувальна кількість антигену відображає зв'язувальну активність, можна говорити про те, що залежність від низькомолекулярної сполуки розпізнається, коли значення у присутності низькомолекулярної сполуки (ATP, ADP або AMP) перевищує значення без низькомолекулярної сполуки. Зокрема, чим більше різниця, тим вище залежність від низькомолекулярної сполуки.

Таблиця 13

Номер клону	Зразки низькомолекулярних сполук, концентрація						
	ATP 1 мМ	ATP 100 мкМ	ADP 100 мкМ	ADP 10 мкМ	AMP 1 мМ	AMP 100 мкМ	Без н.м. сполуки
dBBAT007-P253	49,2	29,5	89,0	70,0	28,5	16,5	3,6
dBBAT013-P253	26,2	8,1	77,3	48,5	13,8	6,6	2,7
dBBAT015-P253	8,3	3,1	41,8	17,9	11,9	5,5	1,5
dBBAT017-P253	9,8	5,0	39,7	18,8	6,8	4,8	4,4
dBBAT019-P253	3,8	3,0	25,7	7,4	11,1	4,6	3,7
dBBAT021-P253	9,2	2,4	56,6	19,6	5,7	3,0	2,9
dBBAT025-P253	28,5	10,0	89,1	55,7	16,4	6,1	4,4
dBBAT029-P253	10,9	6,9	53,3	38,5	17,4	11,4	3,7
dBBAT031-P253	8,4	5,0	47,8	33,3	14,8	8,3	2,8
dBBAT037-P253	27,5	15,9	72,1	62,9	21,7	13,8	3,8
dBBAT042-P253	11,7	4,3	58,7	19,1	7,8	4,7	2,9
dBBAT053-P253	15,0	8,4	46,9	40,4	9,6	6,9	1,9
dBBAT056-P253	20,3	13,4	59,4	50,7	12,8	9,7	3,7
dBBAT118-P253	27,7	14,1	76,9	62,9	14,9	8,7	3,3
dBBAT121-P253	11,5	4,8	42,3	24,7	6,1	2,6	1,9
dBBAT122-P253	11,5	4,7	55,5	19,2	5,7	4,1	3,3
dBBAT134-P253	5,2	4,4	29,3	16,2	3,7	4,5	3,0
dBBAT091-P253	6,2	3,0	33,0	20,0	2,9	3,3	1,5
dBBAT112-P253	12,6	6,3	43,0	27,4	6,5	4,8	3,7
dBBAT119-P253	45,7	12,9	112,5	67,2	58,6	26,9	3,3

(2-5-3) Оцінювання зв'язувальної активності стосовно антигену CD137 мавпи

Отримані антитіла оцінювали стосовно зв'язування з CD137 мавпи за допомогою ELISA. cyCD137-Fc-BAP, приготовлений у Прикладі 1, іммобілізували на мікротитраційних планшетах Streptawell. Після того, як незв'язаний антиген видалили з планшетів шляхом промивання кожної лунки планшетів буфером промивання, лунки блокували 150 мкл блокувального буфера (TBS з 2 % BSA) протягом 1 години або більше. Блокувальний буфер видалили з кожної лунки та до кожної лунки додали 100 мкл очищених антитіл, розведених у TBS з кінцевою концентрацією 1 мМ ADP або TBS з кінцевою концентрацією 1 мМ ADP. Планшет, до якого додали антитіло, струшували при 600 об/хв протягом 1 години. AP-кон'юговані антитіла до лямбда людини (BETHYL), розведені у TBS з кінцевою концентрацією 1 мМ ADP, додали до кожної лунки після промивання буфером промивання (TBS з 0,1 % Tween20), що містив кінцеву концентрацію 1 мМ ADP. Після інкубування протягом однієї години та промивання буфером промивання, що містив кінцеву концентрацію 1 мМ ATP, додали фосфатний субстрат BluePhos (KPL). Інтенсивність кольору вимірювали за поглинанням при 600 нм. Підвищення коефіцієнта поглинання при концентрації антитіла 0 мкг/мл наведено у Таблиці 14. Можна говорити, що зразки із залежним від концентрації підвищенням коефіцієнта поглинання зв'язуються з CD137 мавпи.

Таблиця 14

Коефіцієнт поглинання

CD137 мавпи		dBBAT 007	dBBAT 013	dBBA T015	dBBA T017	dBBA T019	dBBAT 021	dBBAT 025	dBBAT0 29	dBBAT0 37	dBBAT 042
Концентрація антитіла [мкг/мл]	10	30,5	43,2	42,9	25,6	40,5	40,5	72,0	50,3	32,5	41,8
	2,5	30,2	42,4	32,4	8,7	40,3	14,0	67,6	42,7	12,7	40,0
	0,625	29,2	33,3	14,4	3,1	39,1	4,6	49,7	26,7	4,6	31,3
	0,156	22,0	15,3	3.6	1,4	23,7	1,7	20,7	9,7	1,9	12,2
	0,039	0,7	4,2	1,5	1,2	8,2	1,2	4,5	2,0	1,3	2,9
	0,010	3,8	1,5	1,1	1,2	2,5	0,9	1,6	1,1	1,1	1,3
	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
		dBBAT 053	dBBAT 056	dBBA T091	dBBA T112	dBBA T118	dBBAT 119	dBBAT 121	dBBAT1 22	dBBAT1 34	
Концентрація антитіла [мкг/мл]	10	17,9	23,1	15,1	19,8	35,4	55,3	26,0	31,9	33,9	
	2,5	6,9	10,7	5,5	8,1	30,6	56,6	16,4	16,7	16,8	
	0,625	2,3	3,6	1,7	2,8	18,1	57,2	5,9	5,7	5,8	
	0,156	1,0	1,3	0,7	1,0	7,1	47,7	1,3	1,9	2,2	
	0,039	0,7	0,8	0,5	0,6	1,8	26,6	0,6	1,0	1,2	
	0,010	0,8	1,2	0,6	0,6	1,0	10,2	0,6	0,9	1,0	
	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	

(2-5-4) Оцінювання агоністичної активності стосовно CD137 із застосуванням клітин Jurkat

Лінію клітин GloResponse™ NF-kappa B-Luc2/4-1BB Jurkat (Promega) застосовували для вимірювання активності антитіла in vitro. До кожної лунки планшетів з 384 лунками додали 10 мкл клітин FcγRIIB CHO-K1 (Promega), приготовлених зі щільністю $2x10^6$ клітин/мл з аналітичним середовищем (99 % RPMI, 1 % FBS). Після цього до кожної лунки додали 10 мкл розчину антитіла, що містив ADP, розчину антитіла, що містив ATP, або розчину антитіла, що не містив ані ATP, ані ADP. Потім до кожної лунки додали 10 мкл лінії клітин GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat, приготовлених зі щільністю 2 x 10^6 клітин/мл з аналітичним середовищем (99 % RPMI, 1 % FBS). Кінцева концентрація ADP становила 50 мкМ; та кінцева концентрація ATP становила 50 мкМ. Планшети залишили відстоюватися протягом 6 годин при 37 °C в інкубаторі з 5 % CO_2, а потім протягом 15 хвилин при кімнатній температурі, та до кожної лунки додали 30 мкл реагенту Bio-Glo. Систему аналізу люциферази Bio-Glo (Буфер та Субстрат) застосовували для реагенту Bio-Glo. Після цього за допомогою планшет-ридера виміряли люмінесценцію кожної лунки. Значення люмінесценції кожної лунки, розділене на значення люмінесценції лунки без доданого антитіла, показувало кратність збільшення люмінесценції, та воно слугувало показником для оцінювання активності кожного антитіла.

Отримані результати наведено на Фіг. 1 та 2. Фіг. 1 та 2 підтверджують, що усі антитіла, за винятком NS1-P253, яке не є свіч-антитілом, демонстрували агоністичну активність стосовно CD137 людини залежним від ATP та ADP чином.

(2-6) Оцінювання агоністичної активності стосовно CD137 in vitro свіч-антитіл, набутої внаслідок пенінгу із застосуванням Т-клітин людини

(2-6-1) Розмноження культур Т-клітин людини

Застосовували мононуклеари периферійної крові людини, виділені зі зразків крові здорових волонтерів. 50 мл крові змішали з 0,5 мл гепарину та потім розвели 50 мл PBS. Мононуклеари периферійної крові людини виділили двома етапами, які описані нижче. На першому етапі Лейкосеп (Leucosep (greiner bio-one)), до якого додали Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare), центрифугували при 1000 x g протягом 1 хвилини при кімнатній температурі, після чого додали розведену PBS кров та здійснили центрифугування при кімнатній температурі при 400 x g протягом 30 хвилин. На другому етапі лейкоцитарну плівку зібрали з пробірок після центрифугування та потім промили 60 мл PBS (Wako). Після цього набір активації/розмноження Т-клітин людини (MACS Miltenyi biotec) застосовували для розмноження культур Т-клітин.

(2-6-2) Оцінювання агоністичної активності стосовно CD137 in vitro із застосуванням Т-клітин людини

$2x10^4$ Т-клітин, що походять з мононуклеарів периферійної крові людини, та $2x10^4$ клітин

REC-1 суспендували у 100 мкл середовища RPMI1640, що містило 30 одиниць/мл IL-2 людини (SIGMA), 10 нг/мл PMA (SIGMA), 0,5 мкг/мл іономіцину, 500 мкМ ADPbetaS (Sigma) та 10 % FBS (Sigma), та засіяли у планшети з пласким дном з 96 лунками (Corning) з контрольним антитілом IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0, NS1-P253, яке є антитілом з не залежною від ATP зв'язувальною активністю стосовно CD137 людини (називається "нон-свіч-антитіло" або "нон-свіч-антитіло проти CD137" в усіх прикладах), або будь-яким з клонів, наведених у Таблиці 12. NS1-P253, IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0 та клони, наведені у Таблиці 12, оцінювали при 10 мкг/мл. Також оцінювали виробництво IFN-γ у середовищі ADPbetaS-мінус. Планшети струшували, а потім залишили при 37 °C на 72 години в інкубаторі з 5 % CO_2. Потім, зібрали культуральні надосадові рідини та визначили кількість IFN-γ, що містилася у культуральних надосадових рідинах, застосовуючи набір Human IFN-γ ELISA Development Kit (PeproTech). ELISA здійснювали згідно з інструкціями виробника набору (PeproTech). Вимірювання поглинання здійснювали за допомогою EnVision (PerkinElmer).

Результати наведено на Фігурі 3.

Підтвердили, що dBBAT007-P253, dBBAT013-P253, dBBAT015-P253, dBBAT019-P253, dBBAT021-P253, dBBAT025-P253, dBBAT031-P253, dBBAT042-P253, dBBAT056-P253, dBBAT118-P253, dBBAT121-P253, dBBAT122-P253 та dBBAT119-P253 демонструють агоністичну активність стосовно CD137 людини залежним від ADPbetaS чином. ADPbetaS – це аналог ADP, який є менш сприйнятливим до гідролізу, як порівняти з ADP. Це вказує на можливість, що ці свіч-антитіла проти CD137 людини демонструють агоністичну активність стосовно CD137 людини залежним від низькомолекулярної сполуки, такої як ATP, ADP або AMP, чином.

(2-6-3) Оцінювання агоністичної активності стосовно CD137 in vitro із застосуванням Т-клітин людини (2)

$2x10^4$ Т-клітин, що походять з мононуклеарів периферійної крові людини, та $2x10^4$ клітин REC-1 суспендували у 100 мкл середовища RPMI1640, що містило 30 одиниць/мл IL-2 людини (SIGMA), 10 нг/мл PMA (SIGMA), 0,5 мкг/мл іономіцину, 500 мкМ ADPbetaS (Sigma) та 10 % FBS (Sigma), та посіяли у планшети з пласким дном з 96 лунками (Corning), або з NS1-P253 (нон-свіч-антитіло), або з dBBAT119-P253. NS1-P253 та dBBAT119-P253 оцінювали при 10, 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032, та 0,00064 мкг/мл. Планшети струшували, а потім залишили при 37 °C на 72 години в інкубаторі з 5 % CO_2. Потім збирали культуральні надосадові рідини та визначили кількість IFN-γ, що містилася у культуральних надосадових рідинах, застосовуючи набір Human IFN-γ ELISA Development Kit (PeproTech). ELISA здійснювали згідно з інструкціями виробника набору (PeproTech). Вимірювання поглинання здійснювали за допомогою EnVision (PerkinElmer).

Результати наведено на Фіг. 4.

Підтвердили, що dBBAT119-P253 демонструє агоністичну активність стосовно CD137 людини у присутності ADPβS. Це вказує на можливість, що dBBAT119-P253 демонструє агоністичну активність стосовно CD137 людини залежним від низькомолекулярної сполуки, такої як ATP, ADP або AMP, чином.

Приклад 3. Підсилення зв'язувальної активності антитіл, які зв'язують антигени у присутності низькомолекулярних сполук, із застосуванням раціонально побудованих бібліотек легкого ланцюга та важкого ланцюга

(3-1) Побудова бібліотеки для підсилення зв'язувальної активності із застосуванням раціонально побудованої бібліотеки легкого ланцюга

Для бібліотеки антитіл, яка містить велику кількість антитіл, зібраних у Прикладі 2-2-1, з антигензв'язувальною активністю, яка залежить від ATP, підсилення зв'язувальної активності виконували шляхом перебудови бібліотек (re-librarization) легких ланцюгів антитіла.

Ділянки легкого ланцюга та важкого ланцюга раціонально побудованої фагової бібліотеки антитіла, побудованої у попередньому патенті WO2015/083764, застосовували для побудови бібліотеки легкого ланцюга антитіла та бібліотеки важкого ланцюга антитіла для підсилення зв'язувальної активності. Їх ввели у вищезгадані бібліотеку легкого ланцюга або ділянки легкого ланцюга або важкого ланцюга бібліотеки фагмідного вектора, зібраної у Прикладі 2-2-1, та шляхом електропорації ввели у штам ER2738 E. coli.

(3-2) Підсилення зв'язувальної активності антитіл із залежною від ATP антигензв'язувальною активністю із застосуванням раціонально побудованої бібліотеки

Фаги отримали за загальним методом з E. coli, яка є носієм побудованого фагміду фагового дисплея. Конкретно, E. coli, яка є носієм побудованого фагмідного вектора, інфікували M13KO7TC (WO2015/046554) або M13KO7ΔpIII (гіперфаг) (PROGEN Biotechnik) та фаги зібрали з надосадових рідин, культивованих протягом ночі при 30 °C. Розчин фагової бібліотеки

отримали шляхом розведення за допомогою TBS популяції фагів, осаджених внаслідок додавання 2,5 M NaCl/10 % PEG до культури E. coli, у якій здійснювалося виробництво фагів. Потім BSA додали до розчину фагової бібліотеки при кінцевій концентрації 4 %. Пенінг здійснювали із застосуванням антигену, іммобілізованого на магнітних мікроносіях. Як магнітні мікроносії застосовували покриті NeutrAvidin мікроносії (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated), мікроносії NeutrAvidin (TAMAGAWA SEIKI) або Dynabeads MyOne StreptAvidin T1 (Thermo Fisher Scientific). Як антиген застосовували біотинілований hCD137-Fc.

Пенінг здійснювали, щоб ефективно отримати свіч-антитіла, що налагоджуються низькомолекулярною сполукою, які залежать від низькомолекулярної сполуки, яка здатна відігравати роль налагоджувача у ракових тканинах. Конкретно, пенінг з метою збагачення антитіл, які зв'язуються з антигенами у присутності аденозинтрифосфату (аденозин-5'-трифосфапт; ATP), який є низькомолекулярною сполукою, та не зв'язуються з антигенами за відсутності ATP, виконували з посиланням на методи, описані у попередньому патенті WO2015/083764.

(3-3) Оцінювання зв'язувальної активності у присутності та за відсутності ATP за допомогою фагового ELISA

З єдиних колоній E. coli, отриманих після кожного раунду за вищеописаними методами, фаг-вмісні культуральні надосадові рідини зібрали, застосовуючи традиційний метод [Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145]. Зв'язувальну активність стосовно CD137 людини у присутності та за відсутності ATP потім підтвердили шляхом фагового ELISA за методами, описаними у Прикладі 2-2-2.

Результати наведено на Фігурі 5.

Отримали ряд клонів, які, як оцінювали, є клонами, які мають ATP-залежну антигензв'язувальну активність, з відношенням "сигнал-шум" поглинання вище 2-х у присутності/відсутності антигену та з відношенням "сигнал-шум" поглинання вище 2-х у присутності/відсутності ATP (свіч-клони).

Приклад 4. Отримання модифікованих антитіл проти CD137 та оцінювання їхньої активності

(4-1) Підвищення зв'язувальної активності внаслідок зміни dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib

Варіанти варіабельної ділянки важкого ланцюга, dBBAT119H, та варіабельної ділянки легкого ланцюга, dBBAT119L, антитіла проти CD137 (назва клону: dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib), отримані у Прикладі 2-4, виробляли за відомими фахівцям у цій галузі методами, такими як ПЛР. Для варіабельної ділянки важкого ланцюга зробили варіанти, у яких D10 (позначає аспарагінову кислоту (Asp) на позиції 10 (за номенклатурою Кебота)) та G17 (позначає гліцин (Gly) на позиції 17 (за номенклатурою Кебота)) dBBAT119H замістили гліцином (Gly) та серином (Ser), відповідно, внаслідок чого отримали dBBAT119H010; та N99 (позначає аспарагін (Asn) на позиції 99 (за номенклатурою Кебота)), M100a (позначає метіонін (Met) на позиції 100a (за номенклатурою Кебота)) та N100b (позначає аспарагін (Asn) на позиції 100b (за номенклатурою Кебота)) dBBAT119H010 замістили іншими амінокислотами. Для варіабельної ділянки легкого ланцюга створили варіанти, у яких F87 (позначає фенілаланін (Phe) на позиції 87 (за номенклатурою Кебота)) dBBAT119L замістили тирозином (Tyr), внаслідок чого отримали dBBAT119L010; та D27b (позначає аспартат (Asp) на позиції 27b (за номенклатурою Кебота)), N31 (позначає аспарагін (Asn) на позиції 31 (за номенклатурою Кебота)) та D94 (позначає аспартат (Asp) на позиції 94 (за номенклатурою Кебота)) dBBAT119L010 замістили іншими амінокислотами.

Для варіантів варіабельної ділянки важкого ланцюга зв'язувальну активність стосовно CD137 людини вимірювали за допомогою BiacoreT200 (GE Healthcare), аналізатора поверхневого плазмонного резонансу. Антитіла захопилися взаємодіючими очищеними варіантами з сенсорним чипом CM3 (Series S Sensor Chip CM3) (GE Healthcare), на якому був іммобілізований Білок G (CALBIOCHEM). Розчин CD137 людини (FXa-перетравлений) з доданим ATP або розчин CD137 людини (FXa-перетравлений) без ATP потім піддали взаємодії у присутності ATP та за відсутності ATP, щоб оцінити зв'язувальну активність варіантів стосовно CD137 людини (FXa-перетравлений). Вимірювання виконували при 25 °C із застосуванням 20 мМ ACES, 150 мМ NaCl, 0,05 % Tween20 та 2 мМ $MgCl_2$, pH 7,4, як буфера прогону. Результати вимірювання показали, що варіант L100a (варіант, у якому метіонін (Met) на позиції 100a (за номенклатурою Кебота) замінили лейцином (Leu)), мав підвищену зв'язувальну активність стосовно CD137 людини тільки у присутності ATP (Фігура 6). Варіабельна ділянка важкого ланцюга варіантів L100a являє собою dBBATk119H024 (SEQ ID NO: 132). Зв'язувальну кількість CD137 людини відкоригували за допомогою кількості захоплення (1000 RU) кожного варіанта.

Для варіабельної ділянки легкого ланцюга зв'язувальну активність стосовно CD137 людини

(FXa-перетравлений) визначили за допомогою BiacoreT200 за умовами, подібними до вищеописаних умов. Результати вимірювання продемонстрували, що варіант E94 (варіант, у якому аспартат (Asp) на позиції 94 (за номенклатурою Кебота) замінили глутаматом (Glu)), мав підвищену зв'язувальну активність з CD137 людини тільки у присутності ATP (Фіг. 6). Варіабельна ділянка легкого ланцюга варіанта E 94 являє собою dBBATk119L020 (SEQ ID NO: 133).

Такі варіанти, що поєднують ці варіанти важкого ланцюга та легкого ланцюга, скорочуються як dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib (варіабельна ділянка важкого ланцюга SEQ ID NO: 132; варіабельна ділянка легкого ланцюга SEQ ID NO: 133; константна ділянка важкого ланцюга SEQ ID NO: 93 та константна ділянка легкого ланцюга SEQ ID NO: 63).

Антитіла у цьому описі винаходу позначаються згідно з наступним правилом: (варіабельна ділянка важкого ланцюга)-(константна ділянка важкого ланцюга)/(варіабельна ділянка легкого ланцюга)-(константна ділянка легкого ланцюга).

Наприклад, назва антитіла dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib означає, що варіабельна ділянка важкого ланцюга антитіла – це dBBAT119H, константна ділянка важкого ланцюга – це P253, варіабельна ділянка легкого ланцюга – це dBBAT119L, та константна ділянка легкого ланцюга – це LamLib.

(4-2) Оцінювання агоністичної активності стосовно CD137 модифікованих антитіл проти CD137 людини in vitro із застосуванням Т-клітин людини

(4-2-1) Розмноження культур Т-клітин людини

Т-клітини людини розмножували та культивували, як описано у Прикладі 2-6-1.

(4-2-2) Оцінювання агоністичної активності стосовно CD137 in vitro із застосуванням Т-клітин людини

У методах, описаних у Прикладі 2-6-2, оцінювалося виробництво IFN-γ у присутності NS1-P253 (нон-свіч-антитіло), dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib, dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib або контрольного антитіла, IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0, при 10, 2, 0,4, 0,08, та 0,016 мкг/мл, відповідно. Також оцінювали виробництво IFN-γ у середовищі ADPbetaS-мінус.

Обидва результати наведено на Фіг. 7.

Модифіковане dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib демонструвало сильнішу залежну від ADPbetaS агоністичну активність, як порівняти з dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib. Це вказує на можливість того, що dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib демонструє сильнішу агоністичну активність стосовно CD137 людини, залежну від ATP, ADP та AMP, ніж dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib.

Приклад 5: Подальші модифікації антитіл проти CD137

(5-1) Пошук модифікацій, які підсилюють зв'язувальну активність внаслідок внесення всебічних модифікацій

Для того, щоб отримати найкращі антитіла проти CD137, всебічно внесли амінокислотні модифікації у варіабельну ділянку важкого ланцюга, dBBATk119H024, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, dBBATk119L020, антитіл проти CD137, отриманих у Прикладах 4-1. Використовуючи відомі фахівцям у цій галузі методи, такі як ПЛР, зробили кожен з варіантів так, що в них усі амінокислотні залишки, які складають CDR dBBATk119H024 та dBBATk119L020, було замінено усіма 18 амінокислотами за виключенням цистеїну. Вимірювання приблизно 1200 варіантів, які отримали для зв'язування з CD137 людини, виконували із застосуванням Biacore4000. Антитіла захоплювалися внаслідок взаємодії культуральних надосадових рідин варіантів з сенсорним чипом CM3 (Series S Sensor Chip CM3) (GE Healthcare), на якому був іммобілізований Білок G (CALBIOCHEM). Розчин CD137 людини з доданою низькомолекулярною сполукою (ATP) або розчин CD137 людини без додавання низькомолекулярної сполуки потім взаємодіяв у присутності низькомолекулярної сполуки або за відсутності низькомолекулярної сполуки, щоб оцінити зв'язувальну активність антитіл стосовно CD137 людини. Вимірювання здійснювали при 25 °C із застосуванням буфера прогону, 20 мМ ACES, 150 мМ NaCl, 0,02 % Tween20 та 2 мМ $MgCl_2$, pH 7,4, до якого був доданий $CaCl_2$.

(5-2) Підсилення зв'язування ATP

Ген важкого ланцюга антитіла, A002-P253 (SEQ ID NO: 134), утворили, поєднавши модифікації, визначені у Прикладі 5-1, щоб підвищити зв'язувальну активність стосовно CD137 людини у присутності низькомолекулярної сполуки, у гені dBBATk119H024-P253, що має dBBATk119H024 (SEQ ID NO: 132) як варіабельну ділянку важкого ланцюга, та P253 (SEQ ID NO: 93) як константну ділянку важкого ланцюга, при цьому ген отримали внаслідок внесення модифікації S267E/L328F у IgG1 людини та внаслідок стирання Gly та Lys на його C-кінці. Ген легкого ланцюга антитіла, B040-Lamlib (SEQ ID NO: 135), також утворили, поєднавши

модифікації, визначені у Прикладі 5-1, які підвищили зв'язувальну активність стосовно CD137 людини у присутності низькомолекулярної сполуки, у легкому ланцюгу антитіла dBBATk119L020-Lamlib, який має dBBATk119L020 (SEQ ID NO: 133) як варіабельну ділянку легкого ланцюга, та Lamlib λ-ланцюга людини (SEQ ID NO: 63) як константну ділянку легкого ланцюга. Ці гени поєднали, щоб експресувати та очистити антитіла за відомими фахівцям у галузі методами, щоб отримати антитіло проти CD137 людини, яке представляє інтерес, A002-P253/B040-Lamlib. Варіабельна ділянка важкого ланцюга антитіла A002-P253/B040-Lamlib - це A002 (SEQ ID NO: 136), варіабельна ділянка легкого ланцюга – це B040 (SEQ ID NO: 137), константна ділянка важкого ланцюга – це P253 (SEQ ID NO: 93), а константна ділянка легкого ланцюга – це Lamlib λ-ланцюга людини (SEQ ID NO: 63).

Для варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла A002-P253/B040-Lamlib, отриманої у цьому розділі, отримали різні варіанти, у яких 53-я, 54-а або 55-а амінокислоти за номенклатурою Кебота замінені іншими амінокислотами з метою підвищення активності зв'язування з ATP. У Таблиці 15 наведено амінокислотні модифікації (номенклатура Кебота) з A002 у варіабельних ділянках важкого ланцюга отриманих антитіл.

Таблиця 15

Варіабельна ділянка важкого ланцюга	
A002	—
A146	S54A / N55S
A159	R53S / N55S
A160	R53T / N55S
A161	R53Q / N55S
A162	R53K / N55S
A163	R53H / N55S
A164	R53S / N55T
A165	R53T / N55T
A166	R53Q / N55T
A167	R53K / N55T
A168	R53H / N55T
A169	R53S / N55H
A170	R53T / N55H
A171	R53Q / N55H

Зв'язувальну активність отриманих варіантів стосовно ATP та CD137 людини оцінили за допомогою Biacore T200.

Вимірювання активності зв'язування стосовно ATP здійснювали при 37 °C, застосовуючи як буфер прогону 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$ та 0,05 % Tween20. Спочатку антитіла захопилися внаслідок взаємодії розчинів антитіла, приготовлених у буфері прогону, з сенсорним чипом CM3 (Series S Sensor Chip CM3) (GE Healthcare), на якому був іммобілізований Sure Protein A (GE Healthcare). Зв'язувальну активність антитіл потім визначили за допомогою взаємодії з розчином ATP, приготовленим у буфері прогону. Чип регенерували, застосовуючи 25 мМ NaOH та 10 мМ гліцин-HCl (pH 1,5), а вимірювання здійснювали шляхом багаторазового захоплення антитіл. Зв'язувальну кількість ATP для кожного антитіла розрахували, коригуючи зв'язувальну кількість ATP при впорскуванні у концентрації 100 нМ кількістю антитіла, захопленого на поверхні чипа, як кількість ATP на одиницю кількості антитіла.

Вимірювання зв'язувальної активності стосовно CD137 людини здійснювали при 37 °C, застосовуючи як буфер прогону 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$ та 0,05 % Tween20. Спочатку антитіла захопилися внаслідок взаємодії розчинів антитіла, приготовлених у буфері прогону, з сенсорним чипом CM3 (Series S Sensor Chip CM3) (GE Healthcare), на якому був іммобілізований Sure Protein A (GE Healthcare). Потім оцінили зв'язувальну активність стосовно CD137 людини за допомогою взаємодії з розчином CD137 людини, до якого був доданий 100 мкМ ATP як низькомолекулярна сполука. Як антиген CD137 людини застосовували hCD137-HisBAP, що отримали у Прикладі (1-1), а вимірювання здійснювали при концентрації антигену у 0, 15,625, 62,5, 250 або 1000 нМ. Чип регенерували, застосовуючи 25 мМ NaOH та 10 мМ гліцин-HCl (pH 1,5), а вимірювання здійснювали шляхом багаторазового захоплення антитіл.

Константу дисоціації (KD) відповідних антитіл стосовно CD137 людини розрахували, застосовуючи програмне забезпечення Biacore T200 Evaluation Software 2.0. Конкретно, константу швидкості асоціації ka (л/моль/с) та константу швидкості дисоціації kd (1/с) розрахували шляхом глобального узгодження сенсограм, отриманих внаслідок вимірювання з використанням моделі зв'язування 1:1 за Langmuir, та з цих значень розрахували константу дисоціації KD (моль/л).

У Таблиці 16 наведено результати цих вимірювань.

Таблиця 16

Аналіз зв'язування з ATP та CD137 людини

		Параметри зв'язування з CD137 людини (ATP=100 мкМ)		
Назва антитіла	Зв'язування з ATP	ka	kd	KD
A002-P253/B040-Lamlib	-0,0001	3,94E+04	2,89E-03	7,35E-08
A146-P253/B040-Lamlib	-0,0001	7,80E+04	2,32E-02	2,97E-07
A159-P253/B040-Lamlib	0,0013	8,21E+04	3,83E-02	4,66E-07
A160-P253/B040-Lamlib	-0,0001	9,59E+03	2,46E-02	2,56E-06
A161-P253/B040-Lamlib	0,0010	1,87E+04	2,35E-02	1,25E-06
A162-P253/B040-Lamlib	0,0002	1,47E+05	3,17E-02	2,16E-07
A163-P253/B040-Lamlib	0,0016	5,60E+04	1,36E-02	2,43E-07
A164-P253/B040-Lamlib	0,0017	9,81E+04	4,38E-02	4,46E-07
A165-P253/B040-Lamlib	0,0002	1,14E+04	1,96E-02	1,72E-06
A166-P253/B040-Lamlib	0,0011	1,21E+04	1,92E-02	1,59E-06
A167-P253/B040-Lamlib	0,0001	8,45E+04	3,96E-02	4,69E-07
A168-P253/B040-Lamlib	0,0017	7,01E+04	1,81E-02	2,58E-07
A169-P253/B040-Lamlib	0,0011	1,15E+04	5,88E-03	5,11E-07
A170-P253/B040-Lamlib	0,0000	5,13E+03	5,36E-03	1,04E-06
A171-P253/B040-Lamlib	0,0012	4,93E+03	5,24E-03	1,06E-06

Як показано у Таблиці 16, варіанти, у яких 53-я, 54-а або 55-а амінокислоти (номенклатура Кебота) варіабельної ділянки важкого ланцюга замінені іншими амінокислотами, мали підвищену зв'язувальну активність стосовно ATP, як порівняти з антитілом A002-P253/B040-Lamlib до модифікації, за виключенням A146-P253/B040-Lamlib та A160-P253/B040-Lamlib. Порівняння константи швидкості асоціації ka (л/моль/с) також демонструє, що константа швидкості асоціації з CD137 людини підвищилася для A146-P253/B040-Lamlib, A159-P253/B040-Lamlib, A162-P253/B040-Lamlib, A163-P253/B040-Lamlib, A164-P253/B040-Lamlib, A167-P253/B040-Lamlib та A168-P253/B040-Lamlib серед антитіл, які оцінювалися вище.

(5-3) Підвищення зв'язувальної активності внаслідок внесення всебічних модифікацій

Для того, щоб отримати кращі антитіла проти CD137, модифікації, визначені у Прикладі 5-1, які підвищують зв'язувальну активність стосовно CD137 людини у присутності низькомолекулярної сполуки та які знижують зв'язування з CD137 людини за умов, коли відсутня низькомолекулярна сполука, та модифікації, визначені у Прикладі 5-2, які підвищують зв'язувальну активність стосовно ATP та підвищують константу швидкості асоціації з CD137 людини, об'єднали, щоб отримати антитіла проти CD137 людини, які демонструють кращий профіль. Отримали гени важкого ланцюга антитіла, які поєднують модифікації, визначені у Прикладах 5-1 та 5-2 у гені важкого ланцюга антитіла A002-G1T3, який має A002 (SEQ ID NO: 136) як варіабельну ділянку важкого ланцюга та G1T3 (SEQ ID NO: 138) як константну ділянку важкого ланцюга та який отримали внаслідок внесення модифікації K214R/Q419E у IgG1 людини та стирання його C-кінцевих Gly та Lys. Гени легкого ланцюга антитіла отримали внаслідок поєднання модифікацій, визначених у Прикладі 5-1 в B040-Lamlib легкого ланцюга антитіла, який має B040 (SEQ ID NO: 137) як варіабельну ділянку легкого ланцюга та Lamlib λ-ланцюга людини як константну ділянку легкого ланцюга.

Як предмет порівняння отримали ген важкого ланцюга антитіла 20H4.9-P253, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга 20H4.9 (SEQ ID NO: 139) існуючого антитіла проти CD137 людини, яке описано у US8137667, та P253 (SEQ ID NO: 93) як константну ділянку важкого ланцюга; та ген легкого ланцюга антитіла, який поєднує варіабельну ділянку легкого ланцюга 20H4.9LC (SEQ ID NO: 140) з k0 κ-ланцюга людини (SEQ ID NO: 141), що є константною

ділянкою легкого ланцюга. Як інший предмет порівняння отримали ген важкого ланцюга антитіла MOR-7480.1H-P253, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга MOR-7480.1H (SEQ ID NO: 142), яка засновує існуюче антитіло проти CD137 людини MOR-7480.1, описане у US8337850, та P253 (SEQ ID NO: 93) як константну ділянку важкого ланцюга; та легкий ланцюг антитіла MOR-7480.1L-lam, що поєднує варіабельну ділянку легкого ланцюга MOR-7480.1L (SEQ ID NO: 143) з lam λ-ланцюга людини (SEQ ID NO: 63) як константною ділянкою легкого ланцюга (зауважте: як Lamlib, так і lam λ-ланцюга людини мають однакову амінокислотну послідовність (SEQ ID NO: 63)).

Ці гени поєднали, щоб експресувати та очистити антитіла, застосовуючи відомі фахівцям у галузі методи, щоб отримати антитіла проти CD137 людини, які представляють інтерес. Таблиця 17 – це перелік номерів послідовностей варіабельної ділянки важкого ланцюга, варіабельної ділянки легкого ланцюга, константної ділянки важкого ланцюга, константної ділянки легкого ланцюга та гіперваріабельної ділянки отриманих антитіл (гіперваріабельна ділянка; також позначається як HVR або CDR).

Таблиця 17

Амінокислотні послідовності важких ланцюгів та легких ланцюгів та їх гіперваріабельних ділянок (позначено ідентифікаційними номерами послідовностей)

Назва антитіла	Варіабельна ділянка		Константна ділянка		Гіперваріабельна ділянка (HVR)					
	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	H1	H2	H3	L1	L2	L3
A375-G1T3/ B167-Lamlib	43	54	138	63	7	8	17	21	26	27
A372-G1T3/ B040-Lamlib	44	55	138	63	7	9	17	22	26	27
A356-G1T3/ B040-Lamlib	45	55	138	63	7	10	17	22	26	27
A486-G1T3/ B167-Lamlib	46	54	138	63	7	11	18	21	26	27
A487-G1T3/ B167-Lamlib	47	54	138	63	7	8	18	21	26	27
A488-G1T3/ B226-Lamlib	48	56	138	63	7	12	18	21	26	28
A489-G1T3/ B223-Lamlib	49	57	138	63	7	13	18	21	26	29
A548-G1T3/ B376-Lamlib	50	58	138	63	7	14	19	23	26	27
A551-G1T3/ B256-Lamlib	51	59	138	63	7	15	20	24	26	27
A551-G1T3/ B379-Lamlib	51	60	138	63	7	15	20	25	26	27
A555-G1T3/ B379-Lamlib	52	60	138	63	7	16	20	25	26	27
A548-G1T3/ B256-Lamlib	50	59	138	63	7	14	19	24	26	27
A549-G1T3/ B167-Lamlib	53	54	138	63	7	14	17	21	26	27

Зв'язування отриманих варіантів з ATP та CD127 людини оцінювали за допомогою Biacore T200. Вимірювання зв'язування CD137 людини здійснювали при 37 °C, застосовуючи як буфер прогону 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$ та 0,05 % Tween20. Спочатку 250-400 RU (одиниць резонансу) антитіл захопилися внаслідок взаємодії розчинів антитіла, приготовлених у буфері прогону, з сенсорним чипом CM3 (Series S Sensor Chip CM3) (GE Healthcare), на якому був іммобілізований Sure Protein A (GE Healthcare). Зв'язувальну активність стосовно CD137 людини у присутності ATP або за відсутності ATP оцінили за допомогою взаємодії з розчином CD137 людини, приготовленим у буфері прогону, до якого був

доданий ATP у бажаній концентрації, або з розчином CD137 людини, приготовленим у буфері прогону без ATP. Як антиген CD137 людини застосовували hCD137-HisBAP, що отримали у прикладі (1-1), та вимірювання значення KD виконували при концентрації антигену у 0, 15,625, 62,5, 250 та 1000 нМ. Для визначення зв'язувальної кількості вимірювання виконували при концентрації антигену 0 та 1000 нМ. Чип регенерували, застосовуючи 25 мМ NaOH та 10 мМ гліцин-HCl (pH 1,5), а вимірювання здійснювали шляхом багаторазового захоплення антитіл. Константу дисоціації відповідних антитіл стосовно CD137 людини розрахували, застосовуючи програмне забезпечення Biacore T200 Evaluation Software 2.0. Конкретно, константу швидкості асоціації ka (л/моль/с) та константу швидкості дисоціації kd (1/с) розрахували шляхом глобального узгодження сенсограм, отриманих внаслідок вимірювання з використанням моделі зв'язування 1:1 за Langmuir, та з цих значень розрахували константу дисоціації KD (моль/л).

У Таблиці 18 наведено результати цих вимірювань.

Таблиця 18

Аналіз зв'язування модифікованих антитіл з CD137 людини

	Зв'язування з CD137 людини						K_D (M) стосовно CD137 людини					
Назва антитіла	Без ATP	ATP= 1 мкМ	ATP = 10 мкМ	ATP = 100 мкМ	ADP = 10 мкМ	AMP = 10 мкМ	Без ATP	ATP = 1 мкМ	ATP = 10 мкМ	ATP = 100 мкМ	ADP = 10 мкМ	AMP = 10 мкМ
20H4.9-P253/20H4.9LC-к0	0,280	0,283	0,283	0,283	0,287	0,287	2,68E-08	2,17E-08	2,03E-08	2,04E-08	1,90E-08	2,17E-08
MOR-7480.1H-P253/ MOR-7480.1L-lam	0,260	0,261	0,261	0,261	0,266	0,266	8,22E-08	8,40E-08	7,50E-08	6,31E-08	7,30E-08	8,46E-08
A375-G1T3/B167-Lamlib	0,053	0,179	0,255	0,275	0,280	0,276	N.A.	4,43E-07	6,17E-08	1,35E-08	5,43E-09	8,91 E-09
A372-G1T3/B040-Lamlib	0,017	0,135	0,242	0,269	0,284	0,245	N.A.	1,14E-06	1,58E-07	5,25E-08	9,36E-09	1,47E-07
A356-G1T3/B040-Lamlib	0,008	0,083	0,211	0,262	0,278	0,255	N.A.	N.A.	4,90E-07	1,19E-07	3,31E-08	1,34E-07
A486-G1T3/B167-Lamlib	0,128	0,260	0,282	0,292	0,294	0,289	1,04E-06 *	7,30E-08	1,08E-08	3,22E-09	2,48E 09	4,33E-09
A487-G1T3/B167-Lamlib	0,110	0,229	0,270	0,282	0,283	0,279	1,43E-06 *	1,63E-07	2,70E-08	7,33E-09	3,01E-09	3,86E-09
A488-G1T3/B226-Lamlib	0,042	0,135	0,232	0,268	0,281	0,261	N.A.	4,24E-07	1,33E-07	5,77E-08	1,60E-08	6,80E-08
A489-G1T3/B223-Lamlib	0,004	0,095	0,214	0,257	0,276	0,261	N.A.	4,42E-06	3,45E-07	1,59E-07	5,45E-08	1,05E-07
A548-G1T3/B376-Lamlib	0,012	0,149	0,245	0,270	0,270	0,262	N.A.	6,75E-07	7,69E-08	1,53E-08	1,55E-08	3,71 E-08
A551-G1T3/B256-Lamlib	0,006	0,133	0,254	0,285	0,285	0,275	N.A.	1,23E-06	1,44E-07	2,91E-08	2,81E-08	6,12E-08
A551-G1T3/B379-Lamlib	0,014	0,173	0,271	0,290	0,291	0,283	N.A.	5,59E-07	7,17E-08	1,58E-08	1,51E-08	3,25E-08
A555-G1T3/B379-Lamlib	0,017	0,180	0,267	0,282	0,282	0,274	N.A.	4,77E-07	5,84E-08	1,35E-08	1,31E-08	2,75E-08
A548-G1T3/B256-Lamlib	0,009	0,156	0,257	0,284	0,287	0,276	N.A.	9,31E-07	1,08E-07	2,63E-08	2,14E-08	4,61 E-08
A549-G1T3/B167-Lamlib	0,048	0,209	0,261	0,277	0,279	0,272	N.A.	2,04E-07	2,83E-08	6,12E-09	5,53E-09	1,35E-08

N.A. - дуже слабке для визначення значення KD.

* Значення KD визначили за моделлю сталого стану.

Значення "зв'язування з CD137 людини" у наведеній вище Таблиці 18 вказують на зв'язувальну кількість CD137 людини на одиницю кількості антитіла, коли CD137 людини дозволили взаємодіяти при 1000 нМ при кожній наведеній вище концентрації, а "K_D (M) стосовно CD137 людини" вказує на константу дисоціації стосовно CD137 людини при кожній концентрації

ATP. Значення KD, позначені у таблиці як *, розрахували за допомогою моделі сталого стану. Зв'язувальна кількість усіх отриманих варіантів у присутності 10 мкМ ATP перебільшувала кількість за умови, коли ATP був присутній у концентрації 1 мкМ, та була навіть більшою за наявності 100 мкМ, що дозволяє припустити, що вони зв'язуються з CD137 людини в залежності від концентрації ATP. З іншого боку, порівняльні об'єкти, 20H4.9-P253/20H4.9LC-k0 та MOR-7480.1 H-P253/MOR-7480.1L-lam, не продемонстрували залежності зв'язування з CD137 від концентрації ATP.

(5-4) Оцінювання in vitro залежної від ATP агоністичної активності стосовно CD137 модифікованих антитіл проти CD137 людини за допомогою аналізу з використанням репортерного гена клітин 4-1BB Jurkat

Клітинну лінію GloResponse™ NF-κ B-Luc2/4-1BB Jurkat (Promega, CS196004) застосовували для вимірювання in vitro активності отриманих варіантів. До кожної лунки 96-лункових планшетів додали по 200 мкл клітин FcγRIIB CHO-K1 Cells (Promega), приготовлених зі щільністю $5x10^4$ клітин/мл за допомогою середовища, та залишили відстоюватися протягом ночі при 37 °C в інкубаторі з CO_2. Культуральне середовище CHO (90 % Ham's F12, 10 % FBS) застосовували як культуральне середовище. Потім, після відсмоктування усього середовища, до кожної лунки додали 25 мкл розчину клітинної лінії GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat, приготовленого зі щільністю $2x10^6$ клітин/мл за допомогою аналітичного середовища (99 % RPMI, 1 % FBS). Після цього 25 мкл кожного розчину антитіла, розведеного аналітичним середовищем, додали так, що кінцева концентрація становила 0, 0,001, 0,01, 0,1 та 10 мкг/мл; та, нарешті, 25 мкл розчину ATP, розведеного аналітичним середовищем, додали так, що кінцева концентрація становила 0 та 250 мкМ. Планшети залишили відстоюватися протягом 6 годин при 37 °C в інкубаторі з 5 % CO_2 та протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та до кожної лунки додали 75 мкл реагенту Bio-Glo. Як реагент Bio-Glo застосовували аналітичну систему Bio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate). Після цього за допомогою планшет-ридера виміряли люмінесценцію кожної лунки. Значення люмінесценції кожної лунки, поділене на значення люмінесценції лунки без додавання антитіла, було відносною світловою одиницею (кратність індукції) та воно було індикатором для оцінювання агоністичної активності кожного антитіла стосовно CB137.

Результати наведено на Фіг. 8.

(5-5) Оцінювання in vitro залежної від ATP агоністичної активності стосовно CD137 модифікованих антитіл проти CD137 людини із застосуванням мононуклеарів периферійної крові людини

(5-5-1) Виділення мононуклеарів периферійної крові людини

Мононуклеари периферійної крові людини (PBMC) виділили із зразків крові здорових волонтерів в компанії заявника, та їх виділили так, як описано у Прикладі 2-6-1. Після цього клітини розвели у середовищі (5 % сироватка людини (SIGMA), 95 % AIM-V (Thermo Fischer Scientific) зі щільністю клітин $5x10^6$ клітин/мл.

(5-5-2) Оцінювання агоністичної активності стосовно CD137 із застосуванням мононуклеарів периферійної крові людини

Мононулеари периферійної крові людини відкоригували до щільності клітин $5x10^6$ клітин/мл та посіяли у 96-лункові планшети з пласким дном (Corning) по 100 мкл у кожну лунку. Після цього додали 50 мкл 0,04 мкг/мл антитіла проти CD3ε людини (BD, клон SP34) та 20 мкг/мл антитіла проти CD28 людини (BD, клон: CD28.2), розведених у середовищі. Планшети струшували та потім залишили відстоюватися в інкубаторі з 5 % CO_2 при 37 °C протягом 6 годин. До кожної лунки потім додали 25 мкл середовища з 2 мМ ATP (SIGMA) або середовища без ATP та 25 мкл кожного антитіла у концентрації 40 мкг/мл та планшети струшували до того, як їх залишили в інкубаторі з 5 % CO_2 при 37 °C на 18 годин. Після цього зібрали частину культуральної надосадової рідини та культуральну надосадову рідину застосовували для кількісного оцінювання вмісту IL-2 у культуральній надосадовій рідині, застосовуючи набір Human IL-2 DuoSet ELISA (R&D systems) або Human IL-2 ELISA Set (BD Biosciences). Після збирання культуральної надосадової рідини планшети знов залишили в інкубаторі з 5 % CO_2 на 24 години. Після цього частину культуральної надосадової рідини зібрали та визначили кількість IFN-γ, що містився у культуральній надосадовій рідині, застосовуючи набір Human IFN-γ DuoSet ELISA (R&D systems) або набір Human IFN-γ ELISA Development Kit (PeproTech). ELISA здійснювали в цілому згідно з протоколом набору, що додається. Для набору Human IL-2 DuoSet ELISA (R&D systems) та набору Human IFN-γ DuoSet ELISA (R&D systems) розвиток кольору та припинення розвитку кольору здійснювали згідно з протоколами, застосовуючи розчин субстрату (R&D systems), який містить H_2O_2 та тетраметилбензидин, та 1N H_2SO_4 (Wako). Для Human IL-2 ELISA Set (BD Biosciences) розвиток кольору припинили, застосовуючи

1 N H_2SO_4 (Wako). Для IFN-γ ELISA Development Kit (PeproTech) для розвитку кольору та припинення розвитку кольору застосовували TMB Chromogen Solution (Thermo Fischer Scientific) та 1N H_2SO_4 (Wako). Потім виконали вимірювання поглинання за допомогою EnVision (PerkinElmer).

Результати докладно описуються у Прикладі 5-5-3 та далі.

(5-5-3) Оцінювання підсилення агоністичної активності константної ділянки важкого ланцюга внаслідок підвищення активності зв'язування з рецептором Fcγ

Внаслідок оцінювання in vitro із застосуванням моноцитів периферійної крові людини, як описується у Прикладах 5-5-1 та 5-5-2, оцінили вплив застосування P587, MY518, TT14 та TT16, які по-різному підвищили зв'язувальну активність стосовно FcγRIIb константної ділянки важкого ланцюга, на агоністичну активність стосовно CD137.

Антитіла, що оцінили, наведено у Таблиці 19.

Виробництво антитіл, перелічених у Таблиці 19, описується у Прикладі 7-1. Порівняно з кількістю IL-2 та IFN-γ у культуральній надосадовій рідині, коли негативне контрольне антитіло (IC17HdK-MY518/IC17L-k0, IC17HdK-G4d/IC17L-k0) додали у присутності 250 мкМ ATP, коли внаслідок додавання антитіла підвищилася кількість IL-2 у культуральній надосадовій рідині у 1,05 раза або більше, а кількість IFN-γ у 1,15 раза або більше, вважалося, що антитіло демонструє агоністичну активність стосовно CD137. Вимірювання агоністичної активності із застосуванням мононуклеарів периферійної крові (PBMC) може відрізнятися від донора до донора зразка крові. З цієї точки зору визначили, що антитіла, які не демонстрували агоністичної активності стосовно CD137 для деяких або більше ніж половини PBMC людини, виділених від численних донорів, можна вважати як такі, що не демонструють агоністичної активності стосовно CD137, навіть якщо вони відповідають стандартам для агоністичної активності для іншої частини PBMC людини.

Антитіла, які, як оцінили, демонструють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності 20 мкМ ATP, наведено у Таблиці 19. Це вказує на те, що агоністична активність стосовно CD137 підсилилася внаслідок поєднання TT16 з P587, що підвищує зв'язувальну активність константної ділянки важкого ланцюга стосовно FcγRIIb (Фігури 9 та 10). Вважають, що агоністична активність підсилилася внаслідок підвищення активності зв'язування з клітинами, що експресують FcγRIIb, які є каркасами перехресного зшивання, необхідними для того, щоб антитіло демонструвало агоністичну активність стосовно клітин, що експресують CD137 [дивись Protein Eng Des Sel. 2013 Oct; 26(10): 589-598]. Опубліковано в Інтернеті [Published online 2013 Jun 5. doi:10.1093/protein)].

Таблиця 19

Назва оціненого антитіла	Назва антитіла, яке оцінили як таке, що володіє активністю у присутності ATP
A375-MY518/B167-LamLib	A375-P587/B167-LamLib
A356-MY518/B040-LamLib	A356-P587/B040-LamLib
A375-P587/B167-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib
A356-P587/B040-LamLib	A356-TT16/B040-LamLib
A375-TT16/B167-LamLib	
A356-TT16/B040-LamLib	
A375-TT14/B167-LamLib	

(5-5-4) Оцінювання ATP-залежної агоністичної активності варіабельних ділянок стосовно CD137

Залежну від ATP агоністичну активність стосовно CD137 кожної варіабельної ділянки внаслідок поєднання константних ділянок важкого ланцюга P587 та P253 з різними варіабельними ділянками оцінили за допомогою аналізу in vitro із застосуванням моноцитів периферійної крові людини, як описано у Прикладах 5-5-1 та 5-5-2.

Антитіла, що оцінили, наведено у Таблиці 20.

Виробництво антитіл, перелічених у Таблиці 20, описується у Прикладі 7-1. Порівняно з кількістю IL-2 та IFN-γ у культуральній надосадовій рідині, коли негативне контрольне антитіло (IC17HdK-MY518/IC17L-k0, IC17HdK-G4d/IC17L-k0) додали у присутності 250 мкМ ATP, коли внаслідок додавання антитіла підвищилася кількість IL-2 у культуральній надосадовій рідині у 1,05 раза або більше, а кількість IFN-γ у 1,15 раза або більше, вважалося, що антитіло демонструє агоністичну активність стосовно CD137. Вимірювання агоністичної активності із

застосуванням мононуклеарів периферійної крові (PBMC) може відрізнятися від донора до донора зразка крові. З цієї точки зору визначили, що антитіла, які не демонстрували агоністичної активності стосовно CD137 для деяких або більше ніж половини PBMC людини, виділених від численних донорів, можна вважати як такі, що не демонструють агоністичної активності стосовно CD137, навіть якщо вони відповідають стандартам для агоністичної активності для іншої частини PBMC людини. Антитіла, які, як оцінили, демонструють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності 250 мкМ ATP, наведено у Таблиці 20 (Фіг. 11, Фіг. 12, Фіг. 13, Фіг. 14 та Фіг. 15).

На додаток, серед антитіл, які, як оцінили, демонструють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності 250 мкМ ATP, антитіла, кратність зміни яких відносно групи, до якої додали негативне контрольне антитіло (IC17HdK-P253/IC17L-k0, IC17HdK-P587/IC17L-k0), стосовно як кількості IL-2, так і кількості IFN-γ у культуральній надосадовій рідині за умови відсутності ATP, була меншою порівняно з кратністю зміни відносно негативного контрольного антитіла за умови наявності 250 мкМ ATP, оцінили як такі, що мають нижчу агоністичну активність стосовно CD137 за умови відсутності ATP. Антитіла, які демонстрували агоністичну активність стосовно CD137 у присутності 250 мкМ ATP та які оцінили як такі, що мають нижчу агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності ATP, наведено у Таблиці 20 (Фіг. 11, Фіг. 12, Фіг. 13, Фіг. 14 та Фіг. 15). Вважалося, що ці антитіла демонструють залежну від ATP агоністичну активність стосовно CD137.

Згідно з вищезазначеним було підтверджено, що для варіабельних ділянок комбінації варіабельних ділянок важкого ланцюга / варіабельних ділянок легкого ланцюга (A375/B167), (A356/B040), (A372/B040), (A486/B167), (A488/B226), (A489/B223), (A551/B256), (A548/B256) та (A551/B379) демонструють залежну від концентрації ATP агоністичну активність стосовно CD137.

Таблиця 20

Назва оціненого антитіла	Назва антитіла, яке оцінили як таке що володіє активністю у присутності ATP	Назва антитіла, яке оцінили як таке, що володіє нижчою активністю за відсутності ATP
A372-P253/B040-LamLib	A372-P253/B040-LamLib	A372-P253/B040-LaimLib
A486 P253/B167-LamLib	A486-P253/B167-LamLib	A486 P253/B167-LamLib
A488-P253/B226-LamLib	A488-P253/B226-LamLib	A488-P253/B226-LaimLib
A489-P253/B223-LamLib	A489-P253/B223-LamLib	A489-P253/B223-LamLib
A551-P587/B256-LamLib	A551-P587/B256-LamLib	A551-P587/B256-LamLib
A375-P587/B167-LamLib	A375-P587/B167-LamLib	A375-P587/B167-LamLib
A548-P587/B256-LamLib	A548-P587/B256-LamLib	A548-P587/B256-LamLib
A356-P587/B040 LamLib	A356-P587/B040-LamLib	A356-P587/B040-LamLib
A551-P587/B379-LamLib	A651-P587/B379-LamLib	A551-P587/B379-LamLib

(5-5-5) Оцінювання підсилюючого впливу на агоністичну активність стосовно CD137 комбінації змін, які підвищують pI константної ділянки важкого ланцюга, з константною ділянкою важкого ланцюга з підвищеною зв'язувальною активністю стосовно рецептора Fcγ

Вплив на агоністичну активність стосовно CD137 внесення різних амінокислотних модифікацій, які підвищують pI константної ділянки важкого ланцюга, у константну ділянку важкого ланцюга з неоднаково підвищеною зв'язувальною активністю стосовно FcγRIIb аналізували шляхом оцінювання in vitro із застосуванням моноцитів периферійної крові людини, як описано у Прикладах 5-5-1 та 5-5-2. Амінокислотні зміни, які підвищують pI, внесли у константні ділянки важкого ланцюга TT16, MY518 та TT14, внаслідок чого отримали константні ділянки важкого ланцюга TT16+P343R/D413K (SCF028), TT16+Q311R/P343R (SCF033), MY518+P343R/D413K (SCF025), MY518+Q311R/P343R (SCF030), TT14+P343R/D413K (SCF027) та TT14+Q311R/P343R (SCF032). Назви антитіл, які оцінювалися та у які було внесено амінокислотні зміни, які підвищують pI, та назви відповідних антитіл до амінокислотних змін, які підвищують pI, наведено у Таблиці 21. Одержання антитіл, перелічених у Таблиці 21, описано у Прикладі 7-2.

Стосовно оцінювання підсилення агоністичної активності внаслідок внесення амінокислотних модифікацій, що підвищують pI, коли внаслідок додавання антитіла підвищується кількість IL-2 у 1,04 раза або більше та кількість IFN-γ у 1,1 раза або більше у культуральній надосадовій рідині, як порівняти з групою, до якої додані антитіла, які містять константну ділянку важкого ланцюга, яка не має цих амінокислотних модифікацій, A375-

TT16/B167-LamLib, A375-MY518/B167-LamLib та A375-TT14/B167-LamLib, був зроблений висновок, що агоністична активність стосовно CD137 підсилилася. Щоб порівняти з антитілами, які включають константну ділянку важкого ланцюга без амінокислотних модифікацій, що підвищують pI, у Таблиці 22 (Фіг. 10) наведено антитіла, які включають константну ділянку важкого ланцюга, для яких показано, що амінокислотні модифікації підсилюють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності 250 мкМ ATP.

Це вказує на те, що незалежно від ступеня підвищення зв'язувальної активності константної ділянки важкого ланцюга стосовно FcγRIIb внаслідок внесення модифікацій, які підвищують pI константної ділянки важкого ланцюга, підсилюється агоністична активність стосовно CD137 антитіла проти CD137 людини. Припустили, що: внаслідок поєднання модифікацій, які підвищують pI константної ділянки важкого ланцюга, з модифікаціями, які підвищують зв'язування константної ділянки важкого ланцюга з FcγRIIb, у константній ділянці важкого ланцюга підсилюється взаємодія з негативно зарядженою поверхнею клітин, що експресують FcγRIIb; та що імунні комплекси антитіл або пов'язаних з антигеном антитіл щільніше наближалися до поверхні клітин, які експресують FcγRIIb; та внаслідок цього також підвищувалося зв'язування з клітинами, що експресують FcγRIIb, які є каркасами перехресного зшивання, необхідними для того, щоб антитіла демонстрували агоністичну активність стосовно клітин, що експресують CD137; та, як наслідок, агоністична активність також підсилювалася.

Таблиця 21

Назва оціненої константної ділянки важкого ланцюга, у яку внесені амінокислотні зміни, що підвищують pI	Назва відповідної константної ділянки важкого ланцюга до внесення амінокислотних змін, що підвищують pI	Зміни, внесені для pI
A375 SCF028/B167-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib	P343R/D413K
A375 SCF033/B167-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF025/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF030/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF027/B167-LamLib	A375-TT14/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF032/B167-LamLib	A375-TT14/B167-LamLib	Q311R/P343K

Таблиця 22

Назва антитіла, яке, як оцінили, демонструє підвищену агоністичну активність
A375-SCF028/B167-LamLib
A375-SCF033/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF027/B167-LamLib
A375-SCF032/B167-LamLib

(5-5-6) Оцінювання впливу на агоністичну активність внесення модифікацій, що підвищують pI константної ділянки важкого ланцюга

Вплив на агоністичну активність стосовно CD137 внесення різних амінокислотних модифікацій, які підвищують pI константних ділянок важкого ланцюга MY201aPh та MY518, аналізували шляхом оцінювання in vitro із застосуванням моноцитів периферійної крові людини, як описано у Прикладах 5-5-1 та 5-5-2. У константні ділянки важкого ланцюга MY518, MY518a та MY201aPh внесли амінокислотні модифікації, які підвищують pI, та внаслідок цього отримали MY518+P343R/D413K (SCF025), MY518+Q311R/P343R(SCF030), MY518+P343R(SCF039), MY518+D413K (SCF040), MY518a+Q311R (SCF060a), MY201aPh+P343R(SCF041aPh), MY201aPh+P343R/D413K (SCF043aPh), MY201aPh+Q311R (SCF056aPh), MY201aPh+Q311R/P343Rb(SCF057aPh) та MY201aPh+Q311R/D413K (SCF059aPh). Назви антитіл, які оцінювалися та у які було внесено амінокислотні зміни, що підвищують pI, та назви антитіл до внесення амінокислотних змін, які підвищують відповідну pI, наведено у Таблиці 23. Одержання антитіл, перелічених у Таблиці 23, описується у Прикладі 7-2.

Стосовно оцінювання підсилення агоністичної активності внаслідок внесення

амінокислотних модифікацій, що підвищують pI, коли внаслідок додавання антитіла підвищується кількість IL-2 у 1,04 раза або більше та кількість IFN-γ – у 1,1 раза або більше у культуральній надосадовій рідині, як порівняти з групою, до якої додані антитіла, які включають константну ділянку важкого ланцюга, яка не має цих амінокислотних модифікацій, A375-MY518a/B167-LamLib та A375-MY201aPh/B167-LamLib, був зроблений висновок, що агоністична активність стосовно CD137 підсилювалася. Щоб порівняти з антитілами, які включають константну ділянку важкого ланцюга без амінокислотних модифікацій, що підвищують pI, у Таблиці 24 (Фіг. 16 та 17) наведено антитіла, які включають константну ділянку важкого ланцюга, у якій, як показано, амінокислотні зміни підсилили агоністичну активність стосовно CD137 у присутності 250 мкМ ATP.

Таблиця 23

Назва оціненої константної ділянки важкого ланцюга, у яку внесені амінокислотні зміни, що підвищують pI	Назва відповідної константної ділянки важкого ланцюга до внесення амінокислотних змін, що підвищують pI	Зміни, внесені для pI
A375-SCF025/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF025/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF039/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	P143R
A375-SCF040/B167-LamLib	A375-MY518/B167- LamLib	D413K
A375-SCF060a/B167-LamLib	A375-MY518a/B167-LamLib	Q311R
A375-SCF041a/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	P343P
A375-SCF043a/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF056a/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	Q311R
A375-SCF057a/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF059a/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	Q311R/D413K

Таблиця 24

Назва антитіла, яке, як оцінили, демонструє підвищену агоністичну активність
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF039/B167-LamLib
A375-SCF040/B167-LamLib
A375-SCF060a/B167-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A375-SCF043aPh/B167-LamLib
A375^SCF056aPh/B167-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib
A375-SCF059aPh/B167-LamLib

(5-5-7) Оцінювання залежної від ATP агоністичної активності стосовно CD137 антитіл проти CD137 людини, які поєднують отримані варіабельні ділянки та константні ділянки

Залежну від ATP агоністичну активність стосовно CD137 антитіл проти CD137 людини, отриманих внаслідок поєднання вищеописаних варіабельних ділянок з константними ділянками важкого ланцюга, що підвищують pI, проаналізували шляхом оцінювання in vitro, застосовуючи моноцити периферійної крові людини, як описано у Прикладах 5-5-1 та 5-5-2. Антитіла, що оцінюються, наведено у Таблиці 25.

Порівнюючи кількість IL-2 та IFN-γ у культуральній надосадовій рідині, коли негативне контрольне антитіло (IC17HdK-MY518a/IC17L-k0, IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0, IC17HdK-MY201/IC17L-k0, IC17HdK-G4d/IC17L-k0, IC17HdK-MY518/IC17L-k0 або IC17HdK-TT16/IC17L-k0) ввели у присутності 250 мкМ ATP з тим, коли внаслідок додавання антитіла підвищилася кількість IL-2 у культуральній надосадовій рідині у 1,05 раза або більше, а кількість IFN-γ – у 1,15 раза або більше, був зроблений висновок, що антитіло демонструє агоністичну активність стосовно CD137. Вимірювання агоністичної активності із застосуванням мононуклеарів периферійної крові (PBMC) може відрізнятися від донора до донора зразка крові. З цієї точки

зору визначили, що антитіла, які не демонстрували агоністичної активності стосовно CD137 для деяких або більше ніж половини PBMC людини, виділених від численних донорів, можна оцінити як такі, що не демонструють агоністичної активності стосовно CD137, навіть якщо вони відповідають стандартам для агоністичної активності для іншої частини PBMC людини. Антитіла, які оцінили як такі, що демонструють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності 250 мкМ ATP, наведено у Таблиці 25 (Фіг. 16, Фіг. 17, Фіг. 18, Фіг. 19, Фіг. 20, Фіг. 21, Фіг. 22 та Фіг. 23).

Крім того, антитіла, які оцінили як такі, що демонструють агоністичну активність стосовно CD137 у присутності 250 мкМ ATP, кратність зміни яких, як порівняти з групою, до якої додано негативне контрольне антитіло (IC17HdK-MY518a/IC17L-k0, IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0, IC17HdK-MY201/IC17L-k0, IC17HdK-G4d/IC17L-k0, IC17HdK-MY518/IC17L-k0 або IC17HdK-TT16/IC17L-k0), стосовно як кількості IL-2, так і кількості IFN-γ у культуральній надосадовій рідині за умови відсутності ATP, була меншою порівняно з кратністю змін відносно негативного контрольного антитіла за умов присутності 250 мкМ ATP, були оцінені як такі, що мають нижчу агоністичну активність стосовно CD137 за умови відсутності ATP. Антитіла, які були оцінені як такі, що мають нижчу агоністичну активність стосовно CD137 за відсутності ATP, наведено у Таблиці 25 (Фіг. 16, Фіг. 17, Фіг. 18, Фіг. 19, Фіг. 20, Фіг. 21, Фіг. 22 та Фіг. 23). Було показано, що такі антитіла демонструють залежну від ATP агоністичну активність стосовно CD137.

Таблиця 25

Назва оціненого антитіла	Назва антитіла, яке, як оцінили, має активність у присутності ATP	Назва антитіла, яке, як оцінили має нижчу активність за відсутності ATP
A375-MY518/B167-LamLib	A375-SCF025/B167-LamLib	A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib	A375-SCF030/B167-LamLib	A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib	A375-SCF039/B167-LamLib	A375-SCF039/B167-LamLib
A375-SCF039/B167-LamLib	A375-SCF040/B167-LamLib	A375-SCF040/B167-LamLib
A375-SCF040/B16/-LamLib	A375-MY518a/B167-LamLib	A375-MY518a/B167-LamLib
A375-MY518a/B167-LamLib	A375-SCF060a/B167-LamLib	A375-SCF060a/B167-LamLib
A375-SCF060a/B167-LamLib	A375-SCFU41aPh/B167-LamLib	A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A375-MY201aPh/B167-LamLib	A375-SCF043aPh/B167-LamLib	A375-SCF043aPh/B167-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib	A375-SCF056aPh/B167-LamLib	A375-SCF056aPh/B167-LamLib
A375-SCF043aPh/B167-LamLib	A375-SCF057aPh/B167-LamLib	A375-SCF057aPh/B167-LamLib
A375-SCF056aPh/B167-LamLib	A375-SCF059aPh/B167-LamLib	A551-SCF041a/B256-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib	A551-SCF041a/B256-LamLib	A551-SCF057a/B256-LamLib
A375-SCF059aPh/B167-LamLib	A551-SCF057a/B256-LamLib	A551-SCF059a/B256-LamLib
A551-SCF041a/B256-LamLib	A551-SCF059a/B256-LamLib	A551-SCF057aPh/B256-LamLib
A551-SCF056a/B256-LamLib	A551-SCF057aPh/B256-LamLib	A551-SCF025a/B256-LamLib
A551-SCF057a/B256-LamLib	A551-SCF059aPh/B256-LamLib	A551-SCF039a/B256-LamLib
A551-SCF059a/B256-LamLib	A551-SCF025a/B256-LamLib	A551-SCF043a/B256-LamLib
A551-SCF056aPh/B256-LamLib	A551-SCF039a/B256-LamLib	A551-SCF041aPh/B256-LamLib
A551-SCF057aPh/B256-LamLib	A551-MY201a/B256-LamLib	A551-SCF043aPh/B256-LamLib
A551-SCF059aPh/B256-LamLib	A551-SCF043a/B256-LamLib	A551-SCF039a/B379-LamLib
A551-MY518/B256-LamLib	A551-SCF041aPh/B256-LamLib	A551-SCF041a/B379-LamLib
A551-SCF025a/B256-LamLib	A551-SCF043aPh/B256-LamLib	A551-SCF043a/B379-LarnLib
A551-SCF039a/B256-LamLib	A551-SCF039a/B379-LamLib	A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A551-MY201a/B256-LamLib	A551-SCF041a/B379-LamLib	A551-SCF043aPh/B379-LamLib
A551-SCF043a/B256-LamLib	A551-SCF043a/B379-LamLib	A551-SCF060a/B379-LamLib
A551-MY201aPh/B256-LamLib	A551-SCF041aPh/B379-LamLib	A551-SCF057a/B379-LamLib
A551-SCF041aPh/B256-LamLib	A551-SCF043aPh/B379-LamLib	A551-SCF059a/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B256-LamLib	A551-SCF060a/B379-LamLib	A551-SCF056aPh/B379-LamLib
A551-MY518a/B379-LamLib	A551-SCF057a/B379-LamLib	A551-SCF057aPh/B379-LamLib
A551-SCF039a/B379-LamLtb	A551-SCF059a/B379-LamLib	A551-SCF059aPh/B379-LamLib
A551-SCFU41a/B379-LamLib	A551-SCF056aPh/B379-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib
A551-SCF043a/B379-LamLib	A551-SCF057aPh/B379-LamLib	A356-TT16/B040-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib	A551-SCF059aPh/B379-LamLib	A551-TT16/B379-LamLib
A551-SCFU43aPh/B379-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib	
A551-SCF060a/B379-LamLib	A356-TT16/B040-LamLib	

Продовження таблиці 25

A551-SCF056a/B379-LamLib	A551-TT16/B379-LamLib	
A551-SCF057a/B379-LamLib		
A551-SCF059a/B379-LamLib		
A551-SCF056aPh/B379-LamLib		
A551-SCF057aPh/B379-LamLib		
A551-SCF059aPh/B379-LamLib		
A375-TT16/B167-LamLib		
A356-TT16/B040-LamLib		
A551-TT16/B379-LamLib		

Приклад 6: Тест введення свіч-антитіл проти CD137 людини мишам з нокіном CD137 людини

(6-1) Отримання антитіл для дослідження їх введення мишам з нокіном CD137 людини

Свіч-антитіла та нон-свіч-антитіла проти CD137 людини, які мають мишачу константну ділянку, отримали для дослідження їх введення мишам з нокіном CD137 людини. Конкретно, отримали нон-свіч-антитіла проти CD137 людини (20H4.9-mIgG1/20H4.9LC-mk0, скорочена назва: NS1-mIgG1, 20H4.9-MB110/20H4.9LC-mk0, скорочена назва: NS1-MB110, 20H4.9-MB492/20H4.9LC-mk0, скорочена назва: NS1-MB492, MOR-7480.1 H-MB110/MOR-7480.1 L-ml0r, скорочена назва: NS2-MB110, MOR-7480.1 H-MB492/MOR-7480.1 L-ml0r, скорочена назва: NS2-MB492) та свіч-антитіла проти CD137 людини (A375-mIgG1/B167-ml0r, A372-mIgG1/B040-ml0r, A372-MB110/B040-ml0r, A372-MB492/B040-ml0r, A356-MB110/B040-ml0r, A486-MB492/B167-ml0r, A488-MB492/B226-ml0r, A489-MB492/B223-ml0r, A551-mIgG1/B256-ml0r, A551-MB110/B379-ml0r, та A548-mIgG1/B256-ml0r).

Для важких ланцюгів антитіл NS1-mIgG1, NS1-MB110 та NS1-MB492 гени важких ланцюгів антитіл отримали внаслідок поєднання варіабельної ділянки важкого ланцюга 20H4.9 (SEQ ID NO: 139) з будь-чим з наступного:

(i) mIgG1, константна ділянка важкого ланцюга мишачого IgG1 (SEQ ID NO: 144),

(ii) MB110, як описується у WO2014030750 (SEQ ID NO: 145), та

(iii) MB492, як описується у WO2014030750 (SEQ ID NO: 146), як константною ділянкою важкого ланцюга. Тобто, отримали гени 20H4.9-mIgG1, 20H4.9-MB110 та 20H4.9-MB49.

Для легкого ланцюга антитіл NS1-mIgG1, NS1-MB110 та NS1-MB492 ген легкого ланцюга антитіла 20H4.9LC-mk0 отримали внаслідок поєднання варіабельної ділянки легкого ланцюга 20H4.9LC (SEQ ID NO: 140) з мишачим к-ланцюгом mk0 (SEQ ID NO: 147) як константною ділянкою легкого ланцюга. Внаслідок поєднання цих генів важкого ланцюга та легкого ланцюга кожне антитіло експресували та очищували за методами, відомими фахівцям у цій галузі.

Для важких ланцюгів антитіл NS2-MB110 та NS2-MB492 гени важких ланцюгів антитіл отримали внаслідок поєднання варіабельної ділянки важкого ланцюга MOR-7480.1 H (SEQ ID NO: 142) з одним з наступного:

(i) MB110 (SEQ ID NO: 145) або

(ii) MB492 (SEQ ID NO: 146), як константною ділянкою важкого ланцюга. Тобто, отримали гени MOR-7480.1H-MB110 та MOR-7480.1H-MB492.

Для легких ланцюгів антитіл NS2-MB110 та NS2-MB492 ген легкого ланцюга антитіла MOR-7480.1L-ml0r отримали внаслідок поєднання варіабельної ділянки легкого ланцюга MOR-7480.1L (SEQ ID NO: 143) з мишачим λ-ланцюгом ml0r (SEQ ID NO: 148) як константною ділянкою легкого ланцюга. Внаслідок поєднання цих генів важкого ланцюга та легкого ланцюга кожне антитіло експресували та очистили за методами, відомими фахівцям у цій галузі.

Для свіч-антитіл проти CD137 отримали гени важких ланцюгів антитіла та легких ланцюгів антитіла, які наведено у Таблицях 26 та 27 нижче; та кожне антитіло експресували та очистили за методами, відомими фахівцям у цій галузі.

Таблиця 26

Важкі ланцюги свіч-антитіл проти CD137, які мають мишачу константну ділянку

Повнорозмірний важкий ланцюг	A375-mIgG1	Варіабельна ділянка	A375 (SEQ ID NO: 43)
		Константна ділянка	mIgG1 (SEQ ID NO: 144)
Повнорозмірний важкий ланцюг	A372-mIgG1	Варіабельна ділянка	A372 (SEQ ID NO: 44)
		Константна ділянка	mIgG1 (SEQ ID NO: 144)
Повнорозмірний важкий ланцюг	A372-MB110	Варіабельна ділянка	A372 (SEQ ID NO: 44)
		Константна ділянка	MB110 (SEQ ID NO: 145)
Повнорозмірний важкий ланцюг	A372-MB492	Варіабельна ділянка	A372 (SEQ ID NO: 44)
		Константна ділянка	MB492 (SEQ ID NO: 146)
Повнорозмірний важкий ланцюг	A356-MB110	Варіабельна ділянка	A356 (SEQ ID NO: 45)
		Константна ділянка	MB110 (SEQ ID NO: 145)
Повнорозмірний важкий ланцюг	A486-MB492	Варіабельна ділянка	A486 (SEQ ID NO: 46)
		Константна ділянка	MB492 (SEQ ID NO: 146)
Повнорозмірний важкий ланцюг	A488-MB492	Варіабельна ділянка	A488 (SEQ ID NO: 48)
		Константна ділянка	MB492 (SEQ ID NO: 146)
Повнорозмірний важкий ланцюг	A489-MB492	Варіабельна ділянка	A489 (SEQ ID NO: 49)
		Константна ділянка	MB492 (SEQ ID NO: 146)
Повнорозмірний важкий ланцюг	A548-mIgG1	Варіабельна ділянка	A548 (SEQ ID NO: 50)
		Константна ділянка	mIgG1 (SEQ ID NO: 144)
Повнорозмірний важкий ланцюг	A551-mIgG1	Варіабельна ділянка	A551 (SEQ ID NO: 51)
		Константна ділянка	mIgG1 (SEQ ID NO: 144)
Повнорозмірний важкий ланцюг	A551-MB110	Варіабельна ділянка	A551 (SEQ ID NO: 51)
		Константна ділянка	MB110 (SEQ ID NO: 145)

Таблиця 27

Легкі ланцюги свіч-антитіл проти CD137, які мають мишачу константну ділянку

Повнорозмірний легкий ланцюг	B040-ml0r	Варіабельна ділянка	B040 (SEQ ID NO: 55)
		Константна ділянка	ml0r (SEQ ID NO: 148)
Повнорозмірний легкий ланцюг	B167-ml0r	Варіабельна ділянка	B167 (SEQ ID NO: 54)
		Константна ділянка	ml0r (SEQ ID NO: 148)
Повнорозмірний легкий ланцюг	B226-ml0r	Варіабельна ділянка	B226 (SEQ ID NO: 56)
		Константна ділянка	ml0r (SEQ ID NO: 148)
Повнорозмірний легкий ланцюг	B223-ml0r	Варіабельна ділянка	B223 (SEQ ID NO: 57)
		Константна ділянка	ml0r (SEQ ID NO: 148)
Повнорозмірний легкий ланцюг	B256-ml0r	Варіабельна ділянка	B256 (SEQ ID NO: 59)
		Константна ділянка	ml0r (SEQ ID NO: 148)
Повнорозмірний легкий ланцюг	B379-ml0r	Варіабельна ділянка	B379 (SEQ ID NO: 60)
		Константна ділянка	ml0r (SEQ ID NO: 148)

(6-2) Оцінювання зв'язувальної активності стосовно CD137 людини антитіл, приготовлених для дослідження їх введення мишам з нокіном CD137 людини

Оцінювали зв'язувальну активність нон-свіч-антитіла проти CD137 людини та свіч-антитіла проти CD137, які були отримані у Прикладі 6-1, з CD137 людини. Вимірювання зв'язування з CD137 людини виконували при 37 °C, застосовуючи як буфер прогону 20 мМ ACES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$ та 0,05 % Tween20. Спочатку антитіла захопилися внаслідок взаємодії розчинів антитіла, приготовлених у буфері прогону, з сенсорним чипом CM5 (Series S Sensor Chip CM5) (GE Healthcare), на якому було іммобілізоване кроляче антитіло проти IgG миші (Thermo Scientific). Потім оцінили зв'язувальну активність стосовно CD137 людини у присутності ATP або за відсутності ATP за допомогою взаємодії з розчином CD137 людини, приготовленим у буфері прогону, до якого був доданий ATP у бажаній концентрації, або з розчином CD137 людини, приготовленим у буфері прогону без ATP. Як антиген CD137 людини застосовували hCD137 (FXa-перетравлений), отриманий у Прикладі (1-2), а вимірювання виконували при концентрації антигену у 0, 15,625, 62,5, 250 та 1000 нМ. Чип регенерували, застосовуючи 25 мМ NaOH та 10 мМ гліцин-HCl (pH 1,5), а вимірювання здійснювали шляхом багаторазового захоплення антитіл. Константу дисоціації (KD) відповідних антитіл стосовно CD137 людини розрахували, застосовуючи програмне забезпечення Biacore T200 Evaluation Software 2.0. Конкретно, константу швидкості асоціації ka (л/моль/с) та константу швидкості дисоціації kd (1/с) розрахували шляхом глобального узгодження сенсограм, отриманих внаслідок вимірювання з використанням моделі зв'язування 1:1 за Ленгмюром (Langmuir), та з цих значень розрахували константу дисоціації KD (моль/л).

У Таблиці 28 наведено результати цих вимірювань.

Таблиця 28

Аналіз зв'язування з CD137 людини антитіл проти CD137,
які мають мишачу константну ділянку

	K_D (M) стосовно CD137 людини			
Назва антитіла	Без ATP	ATP=1 мкМ	ATP=10 мкМ	ATP=100 мкМ
NS1-mIgG1	6,17E-08	5,62E-08	5,44E-08	5,36E-08
NS1-MB110	6,10E-08	5,65E-08	5,39E-08	5,19E-08
NS1-MB492	6,16E-08	5,49E-08	5,35E-08	5,04E-08
NS2-MB110	1,88E-07	1,44E-07	1,02E-07	1,04E-07
NS2-MB492	2,16E-07	1,70E-07	1,12E-07	1,12E-07
A375-mIgG1/ B167-ml0r	N.A.	3,43E-07	1,14E-07	2,92E-08
A372-mIgG1/ B040-ml0r	N.A.	4,78E-07	2,59E-07	1,08E-07
A372-MB110/ B040-ml0r	N.A.	6,11E-07	2,64E-07	1,12E-07
A372-MB492/ B040-ml0r	N.A.	7,82E-07	2,51E-07	1,04E-07
A356-MB110/ B040-ml0r	N.A.	1,01E-06	4,10E-07	1,68E-07
A486-MB492/ B167-ml0r	N.A.	1,31E-07	2,70E-08	7,67E-09
A488-MB492/ B226-ml0r	N.A.	N.D.	1,36E-07	8,25E-08
A489-MB492/ B223-ml0r	N.A.	1,62E-06	3,58E-07	1,54E-07
A551-mIgG1/ B256-ml0r	N.A.	7,55E-07	2,31E-07	6,22E-08
A551-MB110/ B379-ml0r	N.A.	5,12E-07	1,43E-07	3,51E-08
A548-mIgG1/ B256-ml0r	N.A.	8,61E-07	2,19E-07	5,58E-08

N.A. - занадто слабке, щоб визначити значення KD.
N.D. - не визначене.

Було підтверджено, що як нон-свіч-антитіло проти CD137 людини, так і свіч-антитіло проти CD137 людини, які були отримані вище та які мають мишачу константну ділянку, зв'язуються з CD137 людини. Було також продемонстровано, що усі свіч-антитіла проти CD137 людини зв'язуються з CD137 людини в залежності від концентрації ATP. З іншого боку, для нон-свіч-антитіл не спостерігали такого залежного від концентрації ATP зв'язування з CD137 людини, та це зв'язування відбувалося майже однаково за будь-якої концентрації ATP.

(6-3) Оцінювання кінетики модифікованих антитіл у плазмі миші з нокіном CD137 людини

(6-3-1) Отримання миші з нокіном CD137 людини

Внаслідок введення вектора заміщення гена CD137 людини у мишачі ембріональні стовбурові клітини (клітини ES) отримали мишу з нокіном CD137 людини, у якій ген CD137 миші замінений геном CD137 людини. Ця миша описується як миша hCD137 KI.

(6-3-2) Вимірювання концентрації антитіла проти CD137 людини у плазмі у мишачій моделі hCD137KI

Після отримання миші hCD137KI у Прикладі 6-3-1 відповідні антитіла ввели внутрішньовенно з однократною дозою миші hCD137KI, як показано у Таблиці 29. У Таблиці 29, NS1-mIgG1, NS1-MB110 та NS1-MB492 - усі є нон-свіч-антитілами, а решта антитіл – це свіч-антитіла. Кров збирали багаторазово у період від 5 хвилин до 28 днів після введення. Отриману кров піддавали центрифугуванню, щоб відокремити плазму. Плазму зберігали у морозильнику при температурі нижче -20° до вимірювання.

Таблиця 29

Деталі груп для дослідження оцінювання кінетики у плазмі

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг
1	3	NS1-mIgG1	7,5 одноразове введення
2	3	NS1-MB110	7,5 одноразове введення
3	3	NS1-MB492	7,5 одноразове введення
4	3	A375-mIgG1/B167-ml0r	7,5 одноразове введення
5	3	A356-MB110/B040-ml0r	7,5 одноразове введення
6	3	A372-mIgG1/B040-ml0r	7,5 одноразове введення
7	3	A372-MB110/B040-ml0r	7,5 одноразове введення
8	3	A372-MB492/B040-ml0r	7,5 одноразове введення
9	3	A486-MB492/B167-ml0r	7,5 одноразове введення
10	3	A488-MB492/B226-ml0r	7,5 одноразове введення
11	3	A489-MB492/B223-ml0r	7,5 одноразове введення
12	3	A548-mIgG1/B256-ml0r	7,5 одноразове введення
13	3	A551-mIgG1/B256-ml0r	7,5 одноразове введення
14	3	A551-MB110/B379-ml0r	7,5 одноразове введення

Концентрацію кожного свіч-антитіла в плазмі вимірювали за методом електрохемілюмінесценції (ECL). Конкретно, hCD137 (Sino Biological Inc.) розвели у PBS (-) та додали до 96-лункового планшета MULTI-ARRAY (Meso Scale Diagnostics, LLC). До планшета додали hCD137 та струшували при кімнатній температурі протягом однієї години, і hCD137 іммобілізувався на планшеті. Потім для блокування додали розчин PBS, що містив 1 % BSA та 0,05 % Tween 20, та струшували при кімнатній температурі протягом однієї години. Калібрувальні криві для окремих свіч-антитіл отримали при концентрації в плазмі у 64, 32, 16, 8, 4, 2 та 1 нг/мл. Після додавання розчину PBS, що містив 3 мМ ADP, 1 % BSA та 0,05 % Tween 20, до планшета з іммобілізованим hCD137, до цього додали двократний об'їм зразків плазми, розведених у розчині PBS, що містив 1 % BSA та 0,05 % Tween20, а також зразки для калібрувальних кривих. Після струшування планшета при кімнатній температурі протягом однієї години додали біотиніловане антитіло проти мишачого IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Крім того, після струшування планшета при кімнатній температурі протягом однієї години додали стрептавідин, мічений міткою SULFO-TAG (SULFO-TAG Labeled Streptavidin) (Meso Scale Diagnostics, LLCs). Крім того, після струшування планшета при кімнатній температурі протягом однієї години додали буфер Read buffer T (Meso Scale Diagnostics, LLCs), розведений удвічі розчином PBS, що містив 2 мМ ADP, 1 % BSA та 0,05 % Tween20. Вимірювання концентрації антитіл у плазмі миші hCD137KI здійснювали шляхом детектування з використанням SULFO-TAG на планшет-ридері SECTOR Imager (Meso Scale Diagnostics, LLC). Розрахунок концентрації окремих антитіл у мишачій плазмі здійснювали за допомогою SOFTmax PRO (Molecular Devices).

Концентрацію нон-свіч-антитіл у плазмі вимірювали за методом електрохемілюмінесценції (ECL). Конкретно, hCD137 (Sino Biological Inc.) розвели у PBS (-) та додали до 96-лункового планшета MULTI-ARRAY (Meso Scale Diagnostics, LLC). До планшета додали hCD137 та струшували при кімнатній температурі протягом однієї години, і hCD137 іммобілізувався на планшеті. Потім для блокування додали розчин PBS, що містив 1 % BSA та 0,05 % Tween 20, та струшували при кімнатній температурі протягом однієї години. Калібрувальні криві для окремих нон-свіч-антитіл отримали при концентрації в плазмі у 32, 16, 8, 4, 2, 1 та 0,5 нг/мл. Зразки плазми, розведені у розчині PBS, що містив 1 % BSA та 0,05 % Tween 20, а також зразки для калібрувальних кривих додали до планшета з іммобілізованим hCD137. Після струшування планшета при кімнатній температурі протягом однієї години додали біотиніловане антитіло до мишачого IgG [Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.]. Крім того, після струшування планшета при кімнатній температурі протягом однієї години додали стрептавідин, мічений міткою SULFO-TAG [SULFO-TAG Labeled Streptavidin] [Meso Scale Diagnostics, LLCs]. Крім того, після струшування планшета при кімнатній температурі протягом однієї години додали буфер Read buffer T [Meso Scale Diagnostics, LLCs], розведений удвічі. Вимірювання концентрації антитіл у плазмі миші hCD137KI здійснювали подібно до вимірювання для свіч-антитіл, як описано вище.

Результати наведено на Фіг. 24, 25 та 26.

Фіг. 24 демонструє часову динаміку середньої концентрації у плазмі миші hCD137 KI антитіл, що мають mIgG1 як Fc (NS1-mIgG1 як нон-свіч-антитіло, а A375-mIgG1/B167-ml0r, A372-mIgG1/B040-ml0r, A548-mIgG1/B256-ml0r або A551-mIgG1/B256-ml0r як свіч-антитіло) серед антитіл, наведених у Таблиці 29. Фіг. 25 демонструє часову динаміку середньої концентрації у плазмі миші hCD137 KI антитіл, що мають MB110 як Fc (NS1-MB110 як нон-свіч-антитіло, а A356-MB110/B040-ml0r, A372-MB110/B040-ml0r або A551-MB110/B379-ml0r як свіч-антитіло). Фіг. 26 демонструє часову динаміку середньої концентрації у плазмі миші hCD137 KI антитіл, що мають MB492 як Fc (NS1-MB492 як нон-свіч-антитіло, а A372-MB492/B040-ml0r, A486-MB492/B167-ml0r, A488-MB492/B226-ml0r або A489-MB492/B223-ml0r як свіч-антитіло). На Фіг. 26, що стосується A488-MB492/B226-ml0r, у одного суб'єкта було підтверджено різке відхилення часової динаміки концентрації у плазмі, що, як підозрюють, спричинено ADA, а середнє значення було розраховано від двох суб'єктів.

У миші hCD137 KI свіч-антитіло з будь-якою Fc демонструвало повільніше виведення з плазми, як порівняти з нон-свіч-антитілом. Вважають, що це відбувається тому, що нон-свіч-антитіло, яке зв'язане з CD137, експресується у тілі та виводиться з плазми швидше, як порівняти зі свіч-антитілом. Крім того, припустили, що концентрація позаклітинного ATP у здоровій тканині була достатньо низькою для того, щоб свіч-антитіла, які застосовуються у цьому дослідженні, не зв'язувалися з CD137 людини. Ці результати дозволяють припустити, що зв'язування з антигеном, що експресується системно, можна знизити завдяки застосуванню свіч-антитіл та, як наслідок, можна отримати антитіло з підвищеною кінетикою у крові.

(6-4) Динаміка маркерів ефективності ліків та системної реакції антитіл проти CD137 за допомогою сингенної моделі трансплантації пухлинних клітин із застосуванням миші hCD137KI

(6-4-1) Отримання клітинних ліній та сингенної мишачої моделі трансплантації пухлини, а також метод оцінювання протипухлинного ефекту та системної реакції

Для різних досліджень застосовувалися клітини мишачої лінії MC38 клітин раку прямої кишки, ліцензовані National Cancer Institute, та миша hCD137 KI, описана у Прикладі 6-3-1. Модель створили, коли об'єм пухлини досягнув приблизно до 50-300 мм^3, шляхом підшкірної імплантації клітинної лінії MC38 у черевну порожнину мишей. Після створення моделі мишей, яким трансплантували клітинну лінію MC38, розподілили по групах, а потім вводили різні антитіла проти CD137.

Для оцінювання протипухлинного ефекту виконували вимірювання об'єму пухлини з частотою 1–2 рази на тиждень. Об'єм пухлини розраховували за наступною формулою:

Об'єм пухлини (мм^3) = довжина (мм) x ширину (мм) x ширину (мм)/2

Внаслідок видалення печінки та селезінки або лімфатичних вузлів у відповідний час після введення антитіла, визначили системні реакції за вагою органу, кількістю клітин фракцій лімфоцитів або аналізом Т-клітин із застосуванням протокової цитометрії (FCM). При оцінюванні цих показників визначили, що досліджуване свіч-антитіло було оцінене як таке, що мало властивість пригнічувати системні реакції та/або активацію Т-клітин у непухлинних тканинах (тобто, лімфатичних вузлах, селезінці та печінці), коли показник системної реакції був низьким, як порівняти з такою ж самою кількістю нон-свіч-антитіла (контрольного антитіла проти CD137 людини з незалежною від ATP зв'язувальною активністю стосовно CD137 людини).

Антитіла, отримані у Прикладі 6-1 (отримання антитіл для тесту їх введення мишам з нокіном CD137 людини), застосовували у різних тестах.

(6-4-2) Узяття різних органів у миші з трансплантованою клітинною лінією MC38 та приготування фракцій лімфоцитів

Здійснювали вимірювання ваги зібраних селезінок та лімфатичних вузлів та рахування клітин фракцій лімфоцитів. Фракції лімфоцитів, отримані із застосуванням набору дисоціації печінки миші (Liver dissociation kit, mouse) (Milteny Biotec), також використовували для оцінювання активації печінки. Фракції лімфоцитів після лізису еритроцитів використовували для оцінювання активації в селезінках, а фракції лімфоцитів, отримані внаслідок розтирання, використовували для оцінювання активації в лімфатичних вузлах.

(6-4-3) Аналіз FCM (протокової цитометрії) із застосуванням фракцій лімфоцитів від різних органів

Для оцінювання маркерів активації за допомогою FCM застосовували експресію гранзиму B (Granzyme B) або PD-1, або експресію ICOS на CD8α-позитивних Т-клітинах, або процентний вміст CD8α-позитивних Т-клітин серед CD45-позитивних клітин. Для цього в аналізі FCM застосовували антитіло проти гранзиму B, антитіло проти PD-1, антитіло проти ICOS, антитіло проти CD8α та антитіло проти CD45, які мали флюоресцентні мітки. Вимірювання виконували за допомогою цитометра BD LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences).

(6-4-4) Дослідження ефективності ліків (протипухлинний ефект) на антитілі A375-

mIgG1/B167-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій та A375-mIgG1/B167-ml0r ввели у дозах, наведених у Таблиці 30. Введення антитіла здійснювали через хвостову вену двічі: у день розподілу по групах та через чотири дні після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Таблиця 30

Деталі по групах для дослідження ефективності A375-mIgG1/B167-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення
1	5	Носій	-	У день розподілу по групах та через чотири дні після розподілу по групах
2	5	A375-mIgG1/ B167-ml0r	22,5	У день розподілу по групах та через чотири дні після розподілу по групах
3	5	A375-mIgG1/ B167-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через чотири дні після розподілу по групах
4	5	A375-mIgG1/ B167-ml0r	2,5	У день розподілу по групах та через чотири дні після розподілу по групах
5	5	A375-mIgG1/ B167-ml0r	0,83	У день розподілу по групах та через чотири дні після розподілу по групах
6	5	A375-mIgG1/ B167-ml0r	0,28	У день розподілу по групах та через чотири дні після розподілу по групах

Протипухлинний ефект у кожній групі оцінювали за об'ємом пухлини, розрахованим, як описано у Прикладі 6-4-1. Як наслідок, був підтверджений залежний від дози протипухлинний ефект антитіла A375-mIgG1/B167-ml0r.

(6-4-5) Введення антитіла та узяття зразків, а також аналіз FCM для оцінювання системних ефектів A375-mIgG1/B167-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій, NS1-mIgG1 (нон-свіч-антитіло) та A375-mIgG1/B167-ml0r ввели, як показано у Таблиці 31. Введення антитіла здійснювали через хвостову вену двічі: у день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Через п'ять днів після початкового введення печінку, лімфатичні вузли та селезінки узяли, як показано у Прикладі 6-4-2 (узяття різних органів у миші, якій була трансплантована клітинна лінія MC38, та приготування фракцій лімфоцитів). Потім для селезінок та лімфатичних вузлів поєднали органи від трьох мишей та виконували аналіз FCM, як показано у Прикладі 6-4-3 (аналіз FCM із застосуванням фракцій лімфоцитів від різних органів).

Таблиця 31

Деталі по групах щодо оцінювання системних
реакцій при використанні антитіла A375-mIgG1/B167-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення	День узяття зразків
1	3	Носій	-	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
2	3	NS1-mIgG1	0,06	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
3	3	NS1-mIgG1	0,3	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
4	3	NS1-mIgG1	1,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
5	3	NS1-mIgG1	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
6	3	NS1-mIgG1	37,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
7	3	A375-mIgG1/ B167-ml0r	1,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
8	3	A375-mIgG1/ B167-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
9	3	A375-mIgG1/ B167-ml0r	37,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах

Оцінювали системні ефекти від введення антитіл. Внаслідок оцінювання ваги органів - лімфатичних вузлів та селезінок - спостерігали підвищення ваги органів, коли NS1-mIgG1 вводили у концентрації 0,3 мг/кг, а інтенсивнішу гіпертрофію органів спостерігали при концентрації 1,5 мг/кг та 7,5 мг/кг. З іншого боку, збільшення органів не спостерігали, коли вводили A375-mIgG1/B167-ml0r у будь-якій з доз 1,5 мг/кг, 7,5 мг/кг або 37,5 мг/кг (Фіг. 28).

Крім того, внаслідок оцінювання активації Т-клітин за допомогою FCM спостерігали підвищення експресії усіх маркерів - PD-1, ICOS та гранзиму B - при концентрації 0,3 мг/кг після введення NS1-mIgG1. З іншого боку, коли вводили A375-mIgG1/B167-ml0r у дозах 1,5 мг/кг, 7,5 мг/кг та 37,5 мг/кг, спостерігалося помітне пригнічення експресії усіх маркерів: PD-1, ICOS та гранзиму B (Фіг. 29 та Фіг. 30). Оскільки результати A375-mIgG1/B167-ml0r показали, що вага органів корелювалася з маркерами активації Т-клітин у лімфатичних вузлах та селезінках, у наступних аналізах антитіл вагу органів застосовували здебільшого як показник активації імунних клітин, які походять від лімфатичних вузлів та селезінок.

Внаслідок оцінювання активації Т-клітин у печінці спостерігали підвищення експресії PD-1 та гранзиму B, коли NS1-mIgG1 вводили у дозі 0,3 мг/кг. З іншого боку, коли вводили A375-

mIgG1/B167-ml0r, експресія пригнічувалася при усіх дозах у 1,5 мг/кг, 7,5 мг/кг та 37,5 мг/кг (Фігура 31).

Отже, свіч-антитіло пригнічувало активацію Т-клітин у лімфатичних вузлах, селезінках та печінці, як порівняти з такою самою кількістю нон-свіч-антитіла.

(6-4-6) Дослідження ефективності ліків (протипухлинний ефект) на антитілі A356-MB110/B040-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій та A356-MB110/B040-ml0r ввели, як показано у Таблиці 32. Введення антитіла здійснювали через хвостову вену двічі: у день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Таблиця 32

Деталі по групах для дослідження ефективності A356-MB110/B040-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення
1	5	Носій	-	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
2	5	A356-MB110/B040-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
3	5	A356-MB110/B040-ml0r	2,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах

Протипухлинний ефект у кожній групі оцінювали за об'ємом пухлини, розрахованим, як описується у Прикладі 6-4-1. Результати підтвердили залежний від дози протипухлинний ефект A356-MB110/B040-ml0r (Фіг. 32).

(6-4-7) Введення антитіла та узяття зразків, а також аналіз FCM для оцінювання системних ефектів A356-MB110/B040-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій, NS2-MB110 (яке не є свіч-антитілом) та A356-MB110/B040-ml0r ввели, як показано у Таблиці 33. Введення антитіла здійснювали через хвостову вену двічі: у день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Через сім днів після першого введення печінку, лімфатичні вузли та селезінки узяли за методом, показаним у Прикладі 6-4-2 (узяття різних органів у мишей, яким була трансплантована клітинна лінія MC38, та приготування фракцій лімфоцитів). Для селезінок та лімфатичних вузлів виконували вимірювання тільки ваги органів.

Деталі по групах для оцінювання системних реакцій при використанні антитіла A356-MB110/B040-ml0r

Таблиця 33

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення	День узяття зразків
1	3	Носій	-	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах
2	3	NS2-MB110	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах
3	3	NS2-MB110	2,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах
4	3	NS2-MB110	0,3	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах
5	3	A356-MB110/ B040-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах
6	3	A356-MB110/ B040-ml0r	2,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах

Оцінювали системні ефекти від введення антитіл. Результат оцінювання ваги органів лімфатичних вузлів та селезінок, коли вводили NS2-MB110 та A356-MB110/B040-ml0r, показав, що гіпертрофію спостерігали тільки, коли NS2-MB110 вводили у дозі 2,5 мг/кг. З іншого боку, при введенні A356-MB110/B040-ml0r лімфаденопатія пригнічувалася навіть при 7,5 мг/кг, а спленомегалія пригнічувалася при 2,5 мг/кг (Фіг. 33).

Крім того, результат оцінювання активації Т-клітин у печінці показав, що підвищення експресії PD-1 у CD8α-позитивних клітинах також спостерігалося, коли NS2-MB110 вводили у дозі 0,3 мг/кг. При цьому, коли вводили A356-MB110/B040-ml0r, експресія PD-1 пригнічувалася при 7,5 мг/кг і помітно пригнічувалася при 2,5 мг/кг. Незначне підвищення експресії ICOS у CD8α-позитивних клітинах також спостерігалося після введення антитіла NS2-MB110 у дозі 0,3 мг/кг. З іншого боку, спостерігали, що експресія від носія пригнічувалася при 2,5 мг/кг, коли вводили A356-MB110/B040-ml0r (Фіг. 34).

Отже, свіч-антитіло пригнічувало активацію Т-клітин у лімфатичних вузлах, селезінках та печінці, як порівняти з нон-свіч-антитілом.

(6-4-8) Дослідження ефективності ліків (протипухлинний ефект) на антитілі A372-mIgG1/B040-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій та A372-mIgG1/B040-ml0r ввели у дозах, наведених у Таблиці 34. Введення антитіла виконували через хвостову вену чотири рази: у день розподілу по групах та через 4 дні, 7 днів та 10 днів після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Таблиця 34

Деталі по групах для дослідження ефективності A372-mIgG1/B040-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення
1	5	Носій	-	У день розподілу по групах та через чотири, сім та 10 днів після розподілу по групах
2	5	A372-mIgG1/ B040-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через чотири, сім та 10 днів після розподілу по групах

Протипухлинний ефект у кожній групі оцінювали за об'ємом пухлини, який розрахували, як описано у Прикладі 6-4-1. Як результат, протипухлинний ефект антитіла A372-mIgG1/B040-ml0r спостерігався при введенні 7,5 мг/кг (Фіг. 35).

(6-4-9) Введення антитіла та узяття зразків, а також аналіз FCM для оцінювання системних ефектів A372-mIgG1/B040-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій та A372-mIgG1/B040-ml0r ввели, як показано у Таблиці 35. Введення антитіла виконували через хвостову вену тричі: у день розподілу по групах та через 3 дні і 6 днів після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Через сім днів після першого введення печінку, лімфатичні вузли та селезінки узяли за методом, показаним у Прикладі 6-4-2 (узяття різних органів у мишей, яким була трансплантована клітинна лінія MC38, та приготування фракцій лімфоцитів). Для селезінок виконували вимірювання тільки ваги органів; а для лімфатичних вузлів здійснювали лише підрахунок клітин фракцій лімфоцитів, отриманих з лімфоцитів, об'єднаних від трьох мишей.

Деталі по групах для оцінювання системних реакцій при використанні антитіла A372-mIgG1/B040-ml0r

Таблиця 35

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення	День узяття зразків
1	3	Носій	-	У день розподілу по групах та через три і шість днів після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах
2	3	A372-mIgG1/ B040-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три і шість днів після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах

Оцінювали системні ефекти від введених антитіл. Внаслідок вимірювання кількості клітин у лімфатичних вузлах та оцінювання ваги органу для селезінок підтвердили, що не відбувалося підвищення кількості клітин у лімфатичних вузлах та збільшення ваги селезінок при введенні A372-mIgG1/B040-ml0r та що вага органу була еквівалентна вазі органу у групі, якій вводили носій (Фігура 36).

Внаслідок оцінювання активації Т-клітин у печінці визначили, що, коли вводили A372-mIgG1/B040-ml0r, рівні експресії гранзиму B були подібними до рівнів експресії у групі, якій вводили носій (Фігура 37).

Отже, було підтверджено, що свіч-антитіло інгібує активацію Т-клітин у лімфатичних вузлах, селезінках та печінці.

(6-4-10) Дослідження ефективності ліків (протипухлинний ефект) на антитілі A372-MB110/B040-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій та A372-MB110/B040-ml0r ввели у дозах, показаних у Таблиці 36. Введення антитіла виконували через хвостову вену двічі: у день розподілу по групах та через 4 дні після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Таблиця 36

Деталі по групах для дослідження ефективності A372-MB110/B040-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення
1	5	Носій	-	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
2	5	A372-MB110/ B040-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах

Протипухлинний ефект у кожній групі оцінювали за об'ємом пухлини, який розрахували, як описано у Прикладі 6-4-1. Як наслідок, підтвердили протипухлинний ефект A372-MB110/B040-ml0r (Фіг. 38).

(6-4-11) Введення антитіла та узяття зразків, а також аналіз FCM для оцінювання системних ефектів від A372-MB110/B040-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій, NS2-MB110 (нон-свіч-антитіло) та A372-MB110/B040-ml0r ввели, як показано у Таблиці 37. Введення антитіла виконували через хвостову вену двічі: у день розподілу по групах та через 3 дні після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Через сім днів після першого введення печінку, лімфатичні вузли та селезінки узяли за методом, показаним у Прикладі 6-4-2 (узяття різних органів у мишей, яким була трансплантована клітинна лінія MC38, та приготування фракцій лімфоцитів). Для селезінок та лімфатичних вузлів виконували тільки вимірювання ваги органів.

Таблиця 37

Деталі по групах для оцінювання системних реакцій при використанні антитіла A372-MB110/B040-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення	День узяття зразків
1	3	Носій	-	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах
2	3	NS2-MB110	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах
3	3	NS2-MB110	2,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах
4	3	NS2-MB110	0,3	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах
5	3	A372-MB110/ B040-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах
6	3	A372-MB110/ B040-ml0r	2,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах

Оцінювали системні ефекти від введених антитіл. Внаслідок оцінювання ваги лімфатичних вузлів та селезінок спостерігали збільшення ваги органу, коли NS2-MB110 вводили при 2,5 мг/кг та 7,5 мг/кг. З іншого боку, пригнічення органомегалії спостерігали при обох дозах у 2,5 мг/кг та 7,5 мг/кг, коли вводили A372-MB110/B040-ml0r (Фіг. 39).

Внаслідок оцінювання активації Т-клітин у печінці спостерігали підвищення експресії PD-1, коли вводили NS2-MB110. Це також спостерігали, коли вводили A372-MB110/B040-ml0r (Фіг. 40).

Як висновок, свіч-антитіло пригнічувало активацію Т-клітин у лімфатичних вузлах та селезінках, як порівняти з нон-свіч-антитілом.

(6-4-12) Дослідження ефективності ліків (протипухлинний ефект) на антитілі A372-MB492/B040-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій та A372-MB492/B040-ml0r ввели, як показано у Таблиці 38. Введення антитіла виконували через хвостову вену двічі: у день розподілу по групах та через 3 дні після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Таблиця 38

Деталі по групах для дослідження ефективності A372-MB492/B040-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення
1	5	Носій	-	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
2	5	A372-MB492/ B040-ml0r	1,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
3	5	A372-MB492/ B040-ml0r	3,0	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
4	5	A372-MB492/ B040-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах

Протипухлинний ефект у кожній групі оцінювали за об'ємом пухлини, який розрахували, як описано у Прикладі 6-4-1. Як наслідок, спостерігали протипухлинний ефект антитіла A372-MB492/B040-ml0r при усіх дозах (Фіг. 41).

(6-4-13) Введення антитіла та узяття зразків, а також аналіз FCM для оцінювання системних ефектів від антитіла A372-MB492/B040-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій, NS1-MB492 (нон-свіч-антитіло) та A372-MB492/B040-ml0r ввели, як показано у Таблиці 39. Введення антитіла виконували через хвостову вену двічі: у день розподілу по групах та через 3 дні після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Через вісім днів після першого введення печінку, лімфатичні вузли та селезінки узяли за методом, показаним у Прикладі 6-4-2 (узяття різних органів у мишей, яким була трансплантована клітинна лінія MC38, та приготування фракцій лімфоцитів). Для селезінок виконували тільки вимірювання ваги органів; а для лімфатичних вузлів виконували тільки підрахунок клітин приготовлених фракцій лімфоцитів.

Таблиця 39

Деталі по групах для оцінювання системних реакцій
при використанні антитіла A372-MB492/B040-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення	День узяття зразків
1	3	Носій	-	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через вісім днів після розподілу по групах
2	3	NS1-MB492	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через вісім днів після розподілу по групах
3	3	A372-MB492/ B040-ml0r	1,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через вісім днів після розподілу по групах
4	3	A372-MB492/ B040-ml0r	3,0	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через вісім днів після розподілу по групах
5	3	A372-MB492/ B040-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через вісім днів після розподілу по групах

Оцінювали системні ефекти від введених антитіл. Спостерігали збільшення ваги органів при вимірюванні ваги селезінок, коли вводили NS1-MB492, та підвищення фракцій лімфоцитів при вимірювання кількості клітин, коли вводили NS1-MB492. З іншого боку, коли A372-MB492/B040-ml0r вводили у дозі 1,5 мг/кг, 3,0 мг/кг та 7,5 мг/кг, спостерігали пригнічення органомегалії, як порівняти з NS1-MB492 (Фіг. 42).

Внаслідок оцінювання активації Т-клітин у печінці спостерігали підвищення експресії гранзиму B, коли вводили NS1-MB492 та A372-MB492/B040-ml0r, як порівняти з носієм (Фіг. 43).

Як висновок, свіч-антитіло пригнічувало активацію Т-клітин у лімфатичних вузлах та селезінках, як порівняти з нон-свіч-антитілом.

(6-4-14) Дослідження ефективності ліків (протипухлинний ефект) на антитілах A486-MB492/B167-ml0r та A488-MB492/B226-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій, A486-MB492/B167-ml0r та A488-MB492/B226-ml0r ввели, як показано у Таблиці 40. Розподіл по групах здійснювали через 10 днів після трансплантації клітин та введення антитіла виконували через хвостову вену загалом чотири рази: через 11, 15, 18 та 22 дні після трансплантації клітин. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Таблиця 40

Деталі по групах для дослідження ефективності ліків
на антитілах A486-MB492/B167-ml0r та A488-MB492/B226-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення
1	5	Носій	-	Через 11, 15, 18 та 22 дні після трансплантації
2	5	A486-MB492/B167-ml0r	7,5	Через 11, 15, 18 та 22 дні після трансплантації
3	5	A488-MB492/B226-ml0r	7,5	Через 11, 15, 18 та 22 дні після трансплантації

Протипухлинний ефект у кожній групі оцінювали за об'ємом пухлини, розрахованим, як описано у Прикладі 6-4-1. Результати підтвердили протипухлинні ефекти A486-MB492/B167-ml0r та A488-MB492/B226-ml0r (Фіг. 44).

(6-4-15) Введення антитіла та узяття зразків, а також аналіз FCM для оцінювання системних ефектів A486-MB492/B167-ml0r та A488-MB492/B226-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій, NS1-MB492 (нон-свіч-антитіло), A486-MB492/B167-ml0r та A488-MB492/B226-ml0r ввели, як показано у Таблиці 41. Розподіл по групах здійснювали через 10 днів після трансплантації клітин, а введення антитіла виконували через хвостову вену загалом чотири рази: через 11, 15, 18 та 22 дні після трансплантації клітин. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Печінку, лімфатичні вузли та селезінки узяли через 13 днів після початкового введення за методом, показаним у Прикладі 6-4-2 (узяття різних органів у мишей, яким була трансплантована клітинна лінія MC38, та приготування фракцій лімфоцитів). Для селезінок виконували тільки вимірювання ваги органу; а для лімфатичних вузлів виконували тільки підрахунок клітин фракцій лімфоцитів.

Таблиця 41

Деталі по групах для оцінювання системних реакцій при використанні антитіл A486-MB492/B167-ml0r та A488-MB492/B226-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення	День узяття зразків
1	3	Носій	-	Через 11, 15, 18 та 22 дні після трансплантації	Через 24 дні після трансплантації (через 13 днів після початкового введення)
2	3	NS1-MB492	7,5	Через 11, 15, 18 та 22 дні після трансплантації	Через 24 дні після трансплантації (через 13 днів після початкового введення)
3	3	A486-MB492/ B167-ml0r	7,5	Через 11, 15, 18 та 22 дні після трансплантації	Через 24 дні після трансплантації (через 13 днів після початкового введення)
4	3	A488-MB492/ B226-ml0r	7,5	Через 11, 15, 18 та 22 дні після трансплантації	Через 24 дні після трансплантації (через 13 днів після початкового введення)

Внаслідок вимірювання кількості клітин фракцій лімфоцитів для лімфатичних вузлів та вимірювання ваги селезінок спостерігали підвищення кількості клітин в лімфоцитах та збільшення ваги селезінок, коли вводили NS1-MB492. З іншого боку, спостерігали, що підвищення кількості лімфоцитів та ваги селезінок пригнічувалося, коли вводили A486-MB492/B167-ml0r та A488-MB492/B226-ml0r, як порівняти з такими ж показниками, коли вводили NS1-MB492 (Фіг. 45).

Внаслідок оцінювання активації Т-клітин у печінці спостерігали збільшення процентного вмісту CD8α-позитивних клітин, коли вводили NS1-MB492, A486-MB492/B167-ml0r та A488-MB492/B226-ml0r, як порівняти з носієм (Фіг. 46).

Завдяки вищезазначеному підтвердили, що свіч-антитіло пригнічувало активацію Т-клітин у лімфатичних вузлах та селезінках, як порівняти з нон-свіч-антитілом.

(6-4-16) Дослідження ефективності ліків (протипухлинний ефект) на антитілі A489-MB492/B223-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій та A489-MB492/B223-ml0r ввели, як показано у Таблиці 42. Введення антитіла виконували через

хвостову вену чотири рази: наступного дня після розподілу по групах та через чотири, сім та десять днів після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Таблиця 42

Деталі по групах для дослідження ефективності ліків на A489-MB492/B223-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення
1	5	Носій	-	Наступного дня після розподілу по групах та через чотири, сім та десять днів після розподілу по групах
2	5	A489-MB492/ B223-ml0r	7,5	Наступного дня після розподілу по групах та через чотири, сім та десять днів після розподілу по групах

Протипухлинний ефект у кожній групі оцінювали за об'ємом пухлини, розрахованим, як описано у Прикладі 6-4-1. Як наслідок, протипухлинний ефект підтвердили при введенні 7,5 мг/кг (Фіг. 47).

(6-4-17) Введення антитіла та узяття зразків, а також аналіз FCM для оцінювання системних ефектів від антитіла A489-MB492/B223-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій, NS1-MB492 (нон-свіч-антитіло) та A489-MB492/B223-ml0r ввели, як показано у Таблиці 43. Введення антитіла виконували через хвостову вену загалом тричі: у день розподілу по групах та через 3 і 6 днів після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Через сім днів після першого введення печінку, лімфатичні вузли та селезінки узяли за методом, показаним у Прикладі 6-4-2 (узяття різних органів у мишей, яким була трансплантована клітинна лінія MC38, та приготування фракцій лімфоцитів). Для селезінок та лімфатичних вузлів виконували вимірювання кількості клітин приготовлених фракцій лімфоцитів.

Таблиця 43

Розподіл по групах для оцінювання системних реакцій при використанні антитіла A489-MB492/B223-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення	День узяття зразків
1	3	Носій	-	У день розподілу по групах та через три і шість днів після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах
2	3	NS1-MB492	7,5	У день розподілу по групах та через три і шість днів після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах
3	3	A489-MB492/ B223-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три і шість днів після розподілу по групах	Через сім днів після розподілу по групах

Внаслідок вимірювання кількості клітин фракцій лімфоцитів для лімфатичних вузлів та селезінок спостерігали збільшення кількості клітин, коли вводили NS1-MB492. З іншого боку, пригнічення зростання кількості лімфоцитів спостерігали, коли вводили A489-MB492/B223-ml0r, як порівняти з тим, коли вводили NS1-MB492 (Фіг. 48).

Внаслідок оцінювання активації Т-клітин у печінці спостерігали підвищення процентного вмісту CD8α-позитивних клітин, коли вводили NS1-MB492 та A489-MB492/B223-ml0r, як

порівняти з носієм (Фіг. 49).

Згідно з вищезазначеним, було підтверджено, що свіч-антитіло пригнічувало активацію Т-клітин у лімфатичних вузлах та селезінках, як порівняти з нон-свіч-антитілом.

(6-4-18) Дослідження ефективності ліків (протипухлинний ефект) на антитілах A548-mIgG1/B256-ml0r та A551-mIgG1/B256-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій, A548-mIgG1/B256-ml0r та A551-mIgG1/B256-ml0r ввели, як показано у Таблиці 44. Введення антитіла виконували через хвостову вену двічі: у день розподілу по групах та через 3 дні після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Таблиця 44

Деталі по групах для дослідження ефективності ліків на антитілах A548-mIgG1/B256-ml0r та A551-mIgG1/B256-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення
1	5	Носій	-	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
2	5	A548-mIgG1/ B256-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
3	5	A548-mIgG1/ B256-ml0r	37,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
4	4	A548-mIgG1/ B256-ml0r	100	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
5	5	A551-mIgG1/ B256-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
6	5	A551-mIgG1/ B256-ml0r	37,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
7	4	A551-mIgG1/ B256-ml0r	100	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах

Протипухлинний ефект у кожній групі оцінювали за об'ємом пухлини, розрахованим, як описано у Прикладі 6-4-1. Результати показали протипухлинний ефект внаслідок введення A548-mIgG1/B256-ml0r при 37,5 мг/кг та 100 мг/кг. A551-mIgG1/B256-ml0r також показав значний протипухлинний ефект при 100 мг/кг (Фіг. 50).

(6-4-19) Введення антитіла та узяття зразків, а також аналіз FCM для оцінювання системних ефектів антитіл A548-mIgG1/B256-ml0r та A551-mIgG1/B256-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій, NS1-mIgG1 (нон-свіч-антитіло), A548-mIgG1/B256-ml0r та A551-mIgG1/B256-ml0r ввели, як показано у Таблиці 45. Введення антитіла виконували через хвостову вену двічі: у день розподілу по групах та через 3 дні після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Через п'ять днів після початкового введення печінку, лімфатичні вузли та селезінки узяли за методом, показаним у Прикладі 6-4-2 (забір різних органів від мишей, яким була трансплантована клітинна лінія MC38, та приготування фракцій лімфоцитів). Для селезінок та лімфатичних вузлів виконували тільки вимірювання ваги органу.

Таблиця 45

Деталі по групах для оцінювання системних реакцій при використанні антитіл A548-mIgG1/B256-ml0r та A551-mIgG1/B256-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення	День узяття зразків
1	3	Носій	-	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
2	3	NS1-mIgG1	0,3	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
3	3	NS1-mIgG1	1,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
4	3	NS1-mIgG1	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
5	3	A548-mIgG1/ B256-ml0r	1,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
6	3	A548-mIgG1/ B256-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
7	3	A548-mIgG1/ B256-ml0r	37,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
8	3	A548-mIgG1/ B256-ml0r	100	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
9	3	A551-mIgG1/ B256-ml0r	1,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
10	3	A551-mIgG1/ B256-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
11	3	A551-mIgG1/ B256-ml0r	37,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
12	3	A551-mIgG1/ B256-ml0r	100	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах

Внаслідок оцінювання ваги органів - лімфатичних вузлів та селезінок - спостерігали збільшення ваги органів, коли NS1-mIgG1 вводили при 0,3 мг/кг, 1,5 мг/кг та 7,5 мг/кг. З іншого боку, гіпертрофію органів не спостерігали, коли A548-mIgG1/B256-ml0r або A551-mIgG1/B256-

ml0r вводили у будь-якій з доз у 1,5 мг/кг, 7,5 мг/кг, 37,5 мг/кг та 100 мг/кг (Фіг. 51).

Внаслідок оцінювання активації Т-клітин у печінці спостерігали підвищення експресії як гранзиму B, так і PD-1, коли NS1-mIgG1 вводили при 0,3 мг/кг. З іншого боку, експресія пригнічувалася, коли A548-mIgG1/B256-ml0r та A551-mIgG1/B256-ml0r вводили у будь-якій з доз у 1,5 мг/кг, 7,5 мг/кг, 37,5 мг/кг та 100 мг/кг (Фіг. 52).

Отже, свіч-антитіло пригнічувало активацію Т-клітин у лімфатичних вузлах, селезінках та печінці, як порівняти з нон-свіч-антитілом.

(6-4-20) Дослідження ефективності ліків (протипухлинний ефект) на антитілі A551-MB110/B379-ml0r

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій та A551-MB110/B379-ml0r ввели у дозах, як показано у Таблиці 46. Введення антитіла виконували через хвостову вену двічі: у день розподілу по групах та через 3 дні після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Таблиця 46

Деталі по групах для дослідження ефективності ліків на антитілі A551-MB110/B379-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення
1	6	Носій	-	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
2	5	A551-MB110/ B379-ml0r	2,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
3	6	A551-MB110/ B379-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах
4	6	A551-MB110/ B379-ml0r	22,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах

Протипухлинний ефект у кожній групі оцінювали за об'ємом пухлини, розрахованим, як описано у Прикладі 6-4-1. Як наслідок, було підтверджено протипухлинний ефект при будь-яких дозах (Фіг. 53).

(6-4-21) Введення антитіла та узяття зразків, а також аналіз FCM для оцінювання системних ефектів

Після отримання мишачої моделі, якій трансплантували MC38, як у Прикладі 6-4-1, носій, NS1-mIgG1 (нон-свіч-антитіло) та A551-MB110/B379-ml0r ввели, як показано у Таблиці 47. Введення антитіла виконували через хвостову вену двічі: у день розподілу по групах та через 3 дні після розподілу по групах. Як носій застосовували PBS, що містив 0,05 % Tween-20.

Печінку, лімфатичні вузли та селезінки узяли через 5 днів після початкового введення за методом, показаним у Прикладі 6-4-2 (узяття різних органів у мишей, яким була трансплантована клітинна лінія MC38, та приготування фракцій лімфоцитів), а аналіз FCM здійснювали за методом, показаним у Прикладі 6-4-3 (аналіз FCM із застосуванням фракцій лімфоцитів від різних органів).

Таблиця 47

Деталі по групах для оцінювання системних реакцій
при використанні антитіла A551-MB110/B379-ml0r

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза мг/кг	День введення	День узяття зразків
1	3	Носій	-	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
2	3	NS1-mIgG1	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
3	3	A551-MB110/ B379-ml0r	0,83	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
4	3	A551-MB110/ B379-ml0r	2,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
5	3	A551-MB110/ B379-ml0r	7,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах
6	3	A551-MB110/ B379-ml0r	22,5	У день розподілу по групах та через три дні після розподілу по групах	Через п'ять днів після розподілу по групах

Внаслідок оцінювання ваги органів - лімфатичних вузлів та селезінок - спостерігали збільшення ваги органів, коли NS1-mIgG1 вводили при 7,5 мг/кг. З іншого боку, збільшення жодного органа не спостерігали, коли A551-MB110/B379-ml0r вводили у будь-якій з доз у 0,83 мг/кг, 2,5 мг/кг, 7,5 мг/кг та 22,5 мг/кг (Фіг. 54). Крім того, при оцінюванні активації Т-клітин у селезінках шляхом оцінювання FCM підвищення експресії маркерів активації (PD-1, ICOS, гранзиму B), яке спостерігалося після введення NS1-mIgG1, не підтвердилося, коли A551-MB110/B379-ml0r вводили у будь-якій дозі (Фіг. 55).

В ході оцінювання активації Т-клітин у печінці спостерігали підвищення експресії як PD-1, так і ICOS, коли NS1-mIgG1 вводили при 7,5 мг/кг. З іншого боку, спостерігали пригнічення експресії до рівня носія, коли A551-MB110/B379-ml0r вводили при 0,83 мг/кг та 2,5 мг/кг, і експресія пригнічувалася навіть більше, ніж при NS1-mIgG1, коли його вводили при 7,5 мг/кг (Фіг. 56).

Отже, свіч-антитіло пригнічувало активацію Т-клітин у лімфатичних вузлах, селезінках та печінці, як порівняти з нон-свіч-антитілом.

Приклад 7. Отримання модифікованої Fc, спроможної підсилювати агоністичну активність

(7-1) Отримання варіантів з підвищеною зв'язувальною активністю стосовно FcγR

Константну ділянку важкого ланцюга TT14 (SEQ ID NO: 149), яка підвищує зв'язувальну активність стосовно FcγRIIb, як описано у WO2017104783 (константна ділянка важкого ланцюга, яка містить T250V/T307P як амінокислотні модифікації та L234Y/P238D/V264I/A330K як амінокислотні модифікації для підвищення зв'язувальної активності стосовно FcγRIIb у Fc-ділянці, яка включає SEQ ID NO: 182 (обидві модифіковані позиції вказані за Європейською номенклатурою)), TT16 (SEQ ID NO: 150), що включає амінокислотну мутацію G237D, внесену у TT11 константної ділянки важкого ланцюга, яка підвищує зв'язувальну активність стосовно FcγRIIb, як описано у WO2017104783 (константна ділянка важкого ланцюга, яка містить амінокислотні модифікації T250V/T307P та L234Y/P238D/A330K як амінокислотні модифікації для підвищення зв'язувальної активності стосовно FcγRIIb в Fc-ділянці, яка включає SEQ ID NO: 182 (обидві модифіковані позиції вказані за Європейською номенклатурою), константну ділянку важкого ланцюга P587 (SEQ ID NO: 151), яка підвищує зв'язувальну активність стосовно

FcγRIIb, як описано у WO2014163101; та P253 (SEQ ID NO: 93), яка була попередньо існуючою константною ділянкою важкого ланцюга з підвищеним зв'язуванням з FcγRIIb, поєднали з варіабельною ділянкою важкого ланцюга свіч-антитіла (A375; A372; A356; A486; A488; A489; A548 та A551) або варіабельною ділянкою важкого ланцюга негативного контрольного антитіла (IC17HdK (SEQ ID NO: 152)). Ці утворені гени з комбінацією кожної константної ділянки та варіабельної ділянки важкого ланцюга, є наступними.

Таблиця 48

Повнорозмірний важкий ланцюг	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (SEQ ID NO)	Константна ділянка важкого ланцюга (SEQ ID NO)
A375-TT14	A375 (SEQ ID NO: 43)	TT14 (SEQ ID NO: 149)
A375-TT16	A375 (SEQ ID NO: 43)	TT16 (SEQ ID NO: 150)
A375-P587	A375 (SEQ ID NO: 43)	P587 (SEQ ID NO: 151)
A372-P253	A372 (SEQ ID NO: 44)	P253 (SEQ ID NO: 93)
A356-TT16	A356 (SEQ ID NO: 45)	TT16 (SEQ ID NO: 150)
A356-P587	A356 (SEQ ID NO: 45)	P587 (SEQ ID NO: 151)
A486-P253	A486 (SEQ ID NO: 46)	P253 (SEQ ID NO: 93)
A488-P253	A488 (SEQ ID NO: 48)	P253 (SEQ ID NO: 93)
A489-P253	A489 (SEQ ID NO: 49)	P253 (SEQ ID NO: 93)
A548-P587	A548 (SEQ ID NO: 50)	P587 (SEQ ID NO: 151)
A551-TT16	A551 (SEQ ID NO: 51)	TT16 (SEQ ID NO: 150)
A551-P587	A551 (SEQ ID NO: 51)	P587 (SEQ ID NO: 151)
IC17HdK-TT16	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	TT16 (SEQ ID NO: 150)
IC17HdK-P587	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	P587 (SEQ ID NO: 151)
IC17HdK-P253	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	P253 (SEQ ID NO: 93)

Варіабельну ділянку важкого ланцюга свіч-антитіла (A375, A356 та A551) або варіабельну ділянку важкого ланцюга негативного контрольного антитіла (IC17HdK (SEQ ID NO: 152)) поєднали з константною ділянкою важкого ланцюга MY201 (SEQ ID NO: 153) (константна ділянка важкого ланцюга, яка містить G236N/H268D/A330K як амінокислотні модифікації, які підвищують зв'язувальну активність Fc-ділянки стосовно FcγRIIb, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 182 (усі позиції модифікації вказані за Європейською номенклатурою) або MY518 (SEQ ID NO: 154) (константна ділянка важкого ланцюга, яка містить L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K як амінокислотні модифікації, які підвищують зв'язувальну активність Fc-ділянки стосовно FcγRIIb, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 182 (усі позиції модифікації вказані за Європейською номенклатурою), які описано у WO 2017104783 та які мають підвищену зв'язувальну активність стосовно FcγR, константну ділянку важкого ланцюга MY201a (SEQ ID NO: 155) або MY518a (SEQ ID NO: 156), у яких модифікацію K214R зробили у MY201 або MY518, або константну ділянку важкого ланцюга MY201aPh (SEQ ID NO: 157), у якій модифікацію L235W було зроблено у MY201a. Ці утворені гени з комбінаціями кожної константної ділянки та варіабельної ділянки важкого ланцюга є наступними.

Таблиця 49

Повнорозмірний важкий ланцюг	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (SEQ ID NO)	Константна ділянка важкого ланцюга (SEQ ID NO)
A375-MY201aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	MY201aPh (SEQ ID NO: 157)
A375-MY518	A375 (SEQ ID NO: 43)	MY518 (SEQ ID NO: 154)
A375-MY518a	A375 (SEQ ID NO: 43)	MY518a (SEQ ID NO: 156)
A356-MY518	A356 (SEQ ID NO: 45)	MY518 (SEQ ID NO: 154)
A551-MY201a	A551 (SEQ ID NO: 51)	MY201a SEQ ID NO: 155)
A551-MY201aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	MY201aPh (SEQ ID NO: 157)
A551-MY518	A551 (SEQ ID NO: 51)	MY518 (SEQ ID NO: 154)
A551-MY518a	A551 (SEQ ID NO: 51)	MY518a (SEQ ID NO: 156)
IC17HdK-MY201	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	MY201 (SEQ ID NO: 153)
IC17HdK-MY201aPh	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	MY201aPh (SEQ ID NO: 157)
IC17HdK-MY518	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	MY518 (SEQ ID NO: 154)
IC17HdK-MY518a	IC17HdK (SEQ ID NO: 152)	MY518a (SEQ ID NO: 156)

Як показано у Таблиці 50, антитіла, що представляють інтерес, експресували та очищували, застосовуючи відомі фахівцям у цій галузі методи, шляхом поєднання вищезгаданих генів важкого ланцюга антитіла з геном легкого ланцюга свіч-антитіла (B040-Lamlib, B167-Lamlib, B226-Lamlib, B223-Lamlib, B256-Lamlib та B379-Lamlib, які були отримані у Прикладах 5-2 та 5-3) або з геном легкого ланцюга негативного контрольного антитіла (IC17L-k0, отриманого внаслідок поєднання варіабельної ділянки легкого ланцюга IC17L (SEQ ID NO: 158) з k0 κ-ланцюга людини (SEQ ID NO: 141) як константною ділянкою легкого ланцюга).

Таблиця 50

Варіанти з підвищеною зв'язувальною активністю стосовно FcγR

Варіабельна ділянка (важкий ланцюг / легкий ланцюг)	Константна ділянка важкого ланцюга	Константна ділянка легкого ланцюга	Назва антитіла
A375 / B167	MY201aPh	Lamlib	A375-MY201aPh/B167-Lamlib
	MY518	Lamlib	A375-MY518/B167-Lamlib
	MY518a	Lamlib	A375-MY518a/B167-Lamlib
	P587	Lamlib	A375-P587/B167-Lamlib
	TT14	Lamlib	A375-TT14/B167-Lamlib
	TT16	Lamlib	A375-TT16/B167-Lamlib
A372 / B040	P253	Lamlib	A372-P253/B040-Lamlib
A356 / B040	MY518	Lamlib	A356-MY518/B040-Lamlib
	P587	Lamlib	A356-P587/B040-Lamlib
	TT16	Lamlib	A356-TT16/B040-Lamlib
A486 / B167	P253	Lamlib	A486-P253/B167-Lamlib
A488 / B226	P253	Lamlib	A488-P253/B226-Lamlib
A489 / B223	P253	Lamlib	A489-P253/B223-Lamlib
A548 / B256	P587	Lamlib	A548-P587/B256-Lamlib
A551 / B256	MY201a	Lamlib	A551-MY201a/B256-Lamlib
	MY201aPh	Lamlib	A551-MY201aPh/B256-Lamlib
	MY518	Lamlib	A551-MY518/B256-Lamlib
	P587	Lamlib	A551-P587/B256-Lamlib
A551 / B379	MY518a	Lamlib	A551-MY518a/B379-Lamlib
	P587	Lamlib	A551-P587/B379-Lamlib
	TT16	Lamlib	A551-TT16/B379-Lamlib
IC17HdK / IC17L	MY201	k0	IC17HdK-MY201/IC17L-k0
	MY201aPh	k0	IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0
	MY518	k0	IC17HdK-MY518/IC17L-k0
	MY518a	k0	IC17HdK-MY518a/IC17L-k0
	P253	k0	IC17HdK-P253/IC17L-k0
	P587	k0	IC17HdK-P587/IC17L-k0
	TT16	k0	IC17HdK-TT16/IC17L-k0

(7-2) Отримання варіантів з підвищеною pI шляхом амінокислотної модифікації константної ділянки

Константну ділянку важкого ланцюга отримали шляхом поєднання константної ділянки важкого ланцюга з підвищеною зв'язувальною активністю стосовно FcγR, отриманої у Прикладі 7-1, з Q311R, P343R та D413K, які є амінокислотними мутаціями, які підвищують pI, при цьому суттєво не змінюючи зв'язувальну активність стосовно FcγR, як описується у WO2017046994.

Конкретно, гени константної ділянки важкого ланцюга з амінокислотними мутаціями, внесеними у кожен з генів константної ділянки важкого ланцюга антитіла, отримали, як показано нижче.

- Внесення P343R/D413K у MY518 (SEQ ID NO: 154): SCF025 (SEQ ID NO: 64).
- Внесення P343R/D413K у MY518a (SEQ ID NO: 156): SCF025a (SEQ ID NO: 65).
- Внесення P343R/D413K у TT14 (SEQ ID NO: 149): SCF027 (SEQ ID NO: 66).
- Внесення P343R/D413K у TT16 (SEQ ID NO: 150): SCF028 (SEQ ID NO: 67).
- Внесення Q311R/P343R у MY518 (SEQ ID NO: 154): SCF030 (SEQ ID NO: 68).

- Внесення Q311R/P343R у TT14 (SEQ ID NO: 149): SCF032 (SEQ ID NO: 69).
- Внесення Q311R/P343R у TT16 (SEQ ID NO: 150): SCF033 (SEQ ID NO: 70).
- Внесення P343R у MY518 (SEQ ID NO: 154): SCF039 (SEQ ID NO: 71).
- Внесення P343R у MY518a (SEQ ID NO: 156): SCF039a (SEQ ID NO: 72).
- Внесення D413K у MY518 (SEQ ID NO: 154): SCF040 (SEQ ID NO: 73).
- Внесення P343R у MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF041a (SEQ ID NO: 74).
- Внесення P343R у MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF041aPh (SEQ ID NO: 75).
- Внесення D413K у MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF042a (SEQ ID NO: 76).
- Внесення P343R/D413K у MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF043a (SEQ ID NO: 77).
- Внесення P343R/D413K у MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF043aPh (SEQ ID NO: 78).
- Внесення Q311R у MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF056a (SEQ ID NO: 79).
- Внесення Q311R у MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF056aPh (SEQ ID NO: 80).
- Внесення Q311R/P343R у MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF057a (SEQ ID NO: 81).
- Внесення Q311R/P343R у MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF057aPh (SEQ ID NO: 82).
- Внесення Q311R/D413K у MY201a (SEQ ID NO: 155): SCF059a (SEQ ID NO: 83).
- Внесення Q311R/D413K у MY201aPh (SEQ ID NO: 157): SCF059aPh (SEQ ID NO: 84).
- Внесення Q311R у MY518a (SEQ ID NO: 156): SCF060a (SEQ ID NO: 85).

Гени важкого ланцюга антитіла отримали, як показано нижче у Таблиці 51, шляхом поєднання гена константної ділянки важкого ланцюга, отриманого тут, з геном варіабельної ділянки важкого ланцюга A375 (SEQ ID NO: 43) або A551 (SEQ ID NO: 51).

Таблиця 51

Повнорозмірний важкий ланцюг	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (SEQ ID NO)	Константна ділянка важкого ланцюга (SEQ ID NO)
A375-SCF025	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF025 (SEQ ID NO: 64)
A375-SCF027	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF027 (SEQ ID NO: 66)
A375-SCF028	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF028 (SEQ ID NO: 67)
A375-SCF030	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF030 (SEQ ID NO: 68)
A375-SCF032	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF032 (SEQ ID NO: 69)
A375-SCF033	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF033 (SEQ ID NO: 70)
A375-SCF039	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF039 (SEQ ID NO: 71)
A375-SCF040	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF040 (SEQ ID NO: 73)
A375-SCF041aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)
A375-SCF043aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)
A375-SCF056aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)
A375-SCF057aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)
A375-SCF059aPh	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)
A375-SCF060a	A375 (SEQ ID NO: 43)	SCF060a (SEQ ID NO: 85)
A551-SCF025a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF025a (SEQ ID NO: 65)
A551-SCF039a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF039a (SEQ ID NO: 72)
A551-SCF041a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF041a (SEQ ID NO: 74)
A551-SCF041aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)
A551-SCF043a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF043a (SEQ ID NO: 77)
A551-SCF043aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)
A551-SCF056a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF056a (SEQ ID NO: 79)
A551-SCF056aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)
A551-SCF057a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF057a (SEQ ID NO: 81)
A551-SCF057aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)
A551-SCF059a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF059a (SEQ ID NO: 83)
A551-SCF059aPh	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)
A551-SCF060a	A551 (SEQ ID NO: 51)	SCF060a (SEQ ID NO: 85)

Крім того, внаслідок поєднання цих генів важкого ланцюга антитіла з генами B167-Lamlib, B256-Lamlib та B379-Lamlib, отриманими у Прикладі 5-3 як гени легкого ланцюга антитіла, бажане антитіло експресували та очищували, як показано у Таблиці 52, за методами, відомими фахівцям у цій галузі.

Таблиця 52

Варіабельна ділянка (важкий ланцюг/ легкий ланцюг)	Константна ділянка важкого ланцюга	Константна ділянка легкого ланцюга	Назва антитіла
A375/B167 (A375 SEQ ID NO: 43) (B167 (SEQ ID NO: 54)	SCF025 (SEQ ID NO: 64)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF025/B167-LamLib
	SCFO27 (SEQ ID NO: 66)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF027/Bl67-LamLib
	SCF028 (SEQ ID NO: 67)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF028/B167-LamLib
	SCF030 (SEQ ID NO: 68)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF030/B167-LamLib
	SCF032 (SEQ ID NO: 69)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF032/B167-LamLib
	SCF033 (SEQ ID NO: 70)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF033/B167-LamLib
	SCF039 (SEQ ID NO: 71)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF039/B167-LamLib
	SCF040 (SEQ ID NO: 73)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF040/B167-LamLib
	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF041aPh/B167-LamLib
	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF043aPh/B167-LamLib
	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF056aPh/B167-LamLib
	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF057aPh/B167-LamLib
	SCF059aPh (SEQ ID NO : 84)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF059aPh/B167-LamLib
	SCF060a (SEQ ID NO: 85)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A375-SCF060a/B167-LamLib
A551/B256 (A551 SEQ ID NO: 51) (B256 SEQ ID NO: 59)	SCF025a (SEQ ID NO: 65)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF025a/B256-LamLib
	SCF039a (SEQ ID NO: 72)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF039a/B256-LamLib
	SCF041a CSEQ IDNO: 74)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF041a/B256-LamLib
	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF041aPh/B256-LamLib
	SCF043a (SEQ ID NO: 77)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF043a/B256-LamLib
	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF043aPh/B256-LamLib
	SCF056a (SEQ ID NO: 79)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF056a/B256-LamLib
	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF056aPh/B256-LamLib
	SCF057a (SEQ ID NO: 81)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF057a/B256-LamLib
	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF057aPh/B256-LamLib
	SCF059a (SEQ ID NO: 83)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF059a/B256-LamLib
	SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF059aPh/B256-LamLib
A551 /B379 (A551 SEQ ID NO: 51) (B379 SEQ ID NO: 60)	SCF039a (SEQ ID NO: 72)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF039a/B379-LamLib
	SCF041a (SEQ ID NO: 74)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF041a/B379-LamLib
	SCF041aPh (SEQ ID NO: 75)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF041aPh/B379-LamLib
	SCF043a (SEQ ID NO: 77)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF043a/B379-LamLib
	SCF043aPh (SEQ ID NO: 78)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF043aPh/B379-LamLib
	SCF056a (SEQ ID NO: 79)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF056a/B379-LamLib
	SCF056aPh (SEQ ID NO: 80)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF056aPh/B379-LamLib
	SCF057a (SEQ ID NO: 81)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF057a/B379-LamLib
	SCF057aPh (SEQ ID NO: 82)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF057aPh/B379-LamLib
	SCF059a (SEQ IDNO: 83)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF059a/B379-LamLib
	SCF059aPh (SEQ ID NO: 84)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF059aPh/B379-LamLib
	SCF060a (SEQ ID NO: 85)	Lamlib (SEQ ID NO: 63)	A551-SCF060a/B379-LamLib

(7-3) Отримання контрольних антитіл для порівняння агоністичної активності

Для порівняння агоністичної активності отримали антитіла (IC17HdK-MY201/IC17L-k0; IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0; IC17HdK-MY518/IC17L-k0; IC17HdK-MY518a/IC17L-k0; IC17HdK-P253/IC17L-k0; IC17HdK-P587/IC17L-k0; IC17HdK-TT16/IC17L-k0) з варіабельною ділянкою важкого ланцюга IC17HdK (SEQ ID NO: 152), які були отримані у Прикладі 7-1, як контрольне антитіло. Крім того, антитіло, що представляє інтерес (IC17HdK-G4d/IC17L-k0), експресували та очищували за відомими фахівцям у цій галузі методами, використовуючи поєднання гена легкого ланцюга антитіла IC17L-k0 (SEQ ID NO: 158, варіабельна ділянка; SEQ ID NO: 141, константна ділянка) з геном важкого ланцюга антитіла IC17HdK-G4d, отриманим шляхом поєднання гена варіабельної ділянки важкого ланцюга IC17HdK (SEQ ID NO: 152) з геном G4d (SEQ ID NO: 159), у якого видалили Gly та Lys з С-кінця константної ділянки важкого ланцюга IgG4 людини. Ці контрольні антитіла застосовували у Прикладі 5.

(7-4) Оцінювання зв'язування рецептором Fcγ людини варіантів з підвищеною pI шляхом амінокислотної модифікації константної ділянки

Biacore T200 (GE Healthcare) застосовували для оцінювання зв'язувальної активності стосовно відповідного рецептора Fcγ людини (далі у цьому описі позначається як FcγR).

Вимірювання виконували при 25 °C, застосовуючи як буфер 50 мМ фосфат, 150 мМ NaCl, 0,05 мас/об%-P20, pH 7,4. Приблизно 1000 RU (одиниць резонансу) антитіла захопили за допомогою сенсорного чипа, на якому був іммобілізований біотиновий кон'югат CaptureSelect™ Human Fab-lambda Kinetics Biotin Conjugate (Thermo Fisher Scientific) як молекула для захоплення ліганду. FcγR людини розвели у буфері вимірювання до 8 нМ для FcγRIa та до 1000 нМ для іншого FcγR, та ці розчини рецептора взаємодіяли із захопленим антитілом. Зв'язувальну активність кожного антитіла стосовно FcγR визначили шляхом розрахунку зв'язувальної кількості FcγR (RU) на одиницю кількості антитіла із застосуванням програмного забезпечення Biacore T200 Evaluation Software 2.0.

Позаклітинний домен FcγR отримали за описаними нижче методами. По-перше, синтез генів позаклітинного домену FcγR здійснювали за відомим фахівцям у цій галузі методом. У той час послідовності FcγR отримали, спираючись на зареєстровані в NCBI дані. Конкретно, послідовність FcγRI отримали на основі NCBI Accession No. NM_000566.3, послідовність FcγRIIa - на основі NCBI Accession No. NM_001136219.1, послідовність FcγRIIb – на основі NCBI Accession No. NM_004001.3 та послідовність FcγRIIIa – на основі NCBI Accession No. NM_001127593.1; a His-мітку додали до їхніх C-кінців. Поліморфний сайт FcγRIIa отримали, звернувшись до J. Exp. Med., 1990, 172, 19-25; FcγRIIIa отримали, звернувшись до [J. Clin. Invest., 1997, 100, 1059-1070]. Отримані фрагменти генів вставили у вектор експресії, що експресується в тваринній клітині, внаслідок чого отримали вектори експресії. Отримані вектори експресії транзієнтно ввели у клітини FreeStyle293 (Invitrogen), які походять від ембріональних клітин нирки людини, та експресували білки, що представляють інтерес. Культуральні надосадові рідини зібрали, а потім пропустили крізь 0,22 мкм фільтр та їх очистили за правилами за допомогою етапів, описаних нижче. Перший етап виконували шляхом катіонобмінної колонкової хроматографії (SP Sepharose FF), другий етап – шляхом афінної колонкової хроматографії (HisTrap HP) стосовно His-мітки, третій етап – шляхом гель-фільтрувальної колонкової хроматографії (Superdex200), а четвертий етап – шляхом стерилізувального фільтрування. Однак, для FcγRI на першому етапі застосовували аніонобмінну колонкову хроматографію із застосуванням Q Sepharose FF. Концентрацію очищених білків розрахували за допомогою вимірювання поглинання при 280 нм із застосуванням спектрофотометра та коефіцієнтів поглинання, розрахованих за отриманими значеннями згідно з методами PACE et al. [Protein Science, 1995, 4, 2411-2423].

У Таблиці 53 показано зв'язувальну кількість на одиницю кількості антитіла, а також значення кількості відносно зв'язувальної кількості A375-G1T3/B167-Lamlib. Усі антитіла у Таблиці 53 показали більшу зв'язувальну кількість для FcγRIIb на одиницю кількості антитіла, ніж A375-G1T3/B167-Lamlib, а відносне значення становило 2,85–14,26, коли зв'язувальна кількість A375-G1T3/B167-Lamlib стосовно FcγRIIb людини була узята за 1,0. Зв'язувальна кількість FcγRIIb людини на одиницю кількості антитіла та відносні значення зв'язувальної кількості були подібними за наявності або за відсутності амінокислотних модифікацій для підвищення pI константної ділянки. Також, зв'язувальна кількість антитіл, які мають модифікації L235W, з hFcgRIa була зниженою, як порівняти з A375-TT14/B167-Lamlib.

Таблиця 53

Зв'язувальна активність кожного FcγR людини

Скорочена назва	Зв'язувальна кількість на 1 RU антитіла (RU)						Відносне значення зв'язувальної кількості					
	hFcgRIa	hFcgRIIaH	hFcgRJIaR	hFcgRIIb	hFcgRIIaF	hFcgRIIaV	hFcgRIa	hFcgRIIaH	hFcgRIIaR	hFcgRIIb	hFcqRIIaF	hFcgRIIaV
A375-G1T3/B167-Lamlib	0,0813	0,0567	0,0463	0,0110	0,0213	0,0700	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
A375-MY201a/B167-Lamlib	0,0396	0,0534	0,0338	0,0401	0,0007	0,0024	0,49	0,94	0,73	3,66	0,04	0,03
A375-MY201aPh/R167-Lamlib	0,0040	0,0328	0,0335	0,0313	0,0007	0,0011	0,05	0,58	0,77	2,85	0,03	0,02
A375-MY518/B167-Lamlib	0,0020	0,0466	0,0460	0,0482	0,0009	0,0015	0,02	0,82	0,99	4,40	0,04	0,02
A375-MY518a/B167-Lamlib	0,0033	0,0479	0,0470	0,0489	0,0006	0,0009	0,04	0,84	1,01	4,46	0,03	0,01
A375-TT11/B167-Lamlib	0,0075	0,0020	0,0041	0,0477	-0,0009	-0,0010	0,09	0,03	0,09	4,35	-0,04	-0,01
A375-TT14/B167-Lamlib	0,0045	0,0042	0,0067	0,0805	0,0000	0,0003	0,05	0,07	0,14	7,34	0,00	0,00
A375-TT16/B167-Lamlib	0,0034	0,0126	0,0359	0,1090	0,0001	-0,0002	0,04	0,22	0,77	9,94	0,00	0,00
A375-P587/B167-Lamlib	0,0962	0,0029	0,0371	0,1427	0,0001	0,0001	1,18	0,05	0,80	13,02	0,00	0,00
A375-P253/B167-Lamlib	0,0937	0,0497	0,1678	0,1563	0,0056	0,0019	1,15	0,88	3,62	14,26	0,26	0,03
A375-SCF025/B167-Lamlib	0,0022	0,0514	0,0519	0,0512	0,0012	0,0014	0,03	0,91	1,12	4,67	0,06	0,02
A375-SCF025a/B167-Lamlib	0,0021	00514	0,0518	0,0511	0,0009	0,0016	0,03	0,91	1,12	4,67	0,04	0,02
A375-SCF027/B167-Lamlib	0,0044	0,0031	0,0058	0,0766	-0,0005	-0,0006	0,05	0,06	0,12	6,99	-0,02	-0,01
A375-SCF028/B167-Lamlib	0,0027	0,0101	0,0299	0,0995	-0,0009	-0,0010	0,03	0,18	0,64	9,08	-0,04	-0,01
A375-SCF030/B167-Lamlib	0,0020	0,0533	0,0532	0,0532	0,0017	0,0020	0,02	0,94	1,15	4,85	0,08	0,03
A375-SCF032/B167-Lamlib	0,0049	0,0030	-0,0004	0,0782	-0,0007	-0,0007	0,06	0,05	-0,01	7,14	-0,03	-0,01

Продовження таблиці 53

A375-SCF033/B167-Lamlib	0,0033	0,0103	0,0255	0,0979	0,0000	0,0002	0,04	0,18	0,55	8,94	0,00	0,00
A375-SCF039/B167-Lamlib	0,0018	0,0535	0,0542	0,0531	0,0008	0,0013	0,02	0,94	1,17	4,85	0,04	0,02
A375-SCF039a/B167-Lamtib	0,0018	0,0542	0,0554	0,0540	0,0012	0,0013	0,02	0,96	1,20	4,93	0,06	0,02
A375-SCF040/B167-Lamlib	0,0016	0,0454	0,0446	0,0465	0,0010	0,0013	0,02	0,80	0,96	4,24	0,05	0,02
A375-SCF041a/B167-Lamlib	0,0446	0,0571	0,0376	0,0433	0,0009	0,0022	0,55	1,01	0,81	3,95	0,04	0,03
A375-SCF042a/B167-Lamlib	0,0396	0,0522	0,0327	0,0393	0,0003	0,0014	0,49	0,92	0,71	3,59	0,01	0,02
A375-SCF043a/B167-Lamlib	0,0429	0,0552	0,0361	0,0419	0,0011	0,0025	0,53	0,97	0,78	3,82	0.05	0,04
A375-SCF056a/B167-Lamlib	0,0395	0,0529	0,0331	0,0399	0,0011	0,0023	0,49	0,93	0,71	3,64	0,05	0,03
A375-SCF057a/B167-Lamlib	0 0405	0,0525	0,0367	0,0412	0,0013	0,0025	0,50	0,93	070	3,76	0,06	0,04
A375-SCF059a/B167-Lamlib	0,0380	0,0502	0,0319	0,0358	0,0010	0,0021	0,47	0,88	0,69	3,27	0,05	0,03
A375-SCF060a/B167-Lamlib	0,0021	0,0463	0,0459	0,0472	0,0011	0,0008	0,03	0,82	0 99	4,31	0,05	0,01
A375-SCF041aPh/B167-Lamlib	0,0013	0.0371	0,0371	0,0350	0,0007	0,0005	0,02	0,65	0,80	3,20	0,03	0,01
A375-SCF043aPh/B167-Lamiib	0,0011	0,0349	0,0349	0,0339	0,0001	0,0001	0,01	0,62	0,75	3,10	0,00	0,00
A375-SCF056aPh/B167-Lamlib	0,0019	0,0314	0,0299	0,0292	0,0010	0,0010	0,02	0,55	0,64	2,67	0,05	0,01
A375-SCF057aPh/B167-Lamlib	0,0021	0,0365	0,0364	0,0345	-0,0003	0,0005	0,03	0,64	0,79	3,15	-0,02	0,01
A375-SCF059aPh/B167-Lamlib	0,0089	0,0332	0,0319	0,0291	0,0003	0,0028	0,11	0,59	0,69	2,66	0,01	0,04

(7-5) Оцінювання зв'язування з FcRn людини варіантів з pI, підвищеною внаслідок амінокислотної модифікації константної ділянки

Biacore T200 (GE Healthcare) застосовували для оцінювання зв'язувальної активності

стосовно FcRn людини. Вимірювання виконували при 25 °C, застосовуючи як буфер 150 мМ NaCl, 0,05 маса/об'єм %-P20, pH 6,0. Білки FcRn людини, що застосовувалися для цього визначення, отримали за процедурою, описаною у WO2010107110. Приблизно 400 RU антитіла захопилося при застосуванні сенсорного чипа, на якому був іммобілізований біотиновий кон'югат CaptureSelect™ Human Fab-lambda Kinetics Biotin Conjugate (Thermo Fisher Scientific) як молекула для захоплення ліганду, а потім відбулося зв'язування з розведеним у буфері вимірювання FcRn людини. Активність відповідних антитіл стосовно зв'язування з FcRn оцінили шляхом розрахунку KD (моль/л) за допомогою рівноважної моделі із застосуванням програмного забезпечення Biacore T200 Evaluation Software 2.0. Значення KD були схожими за наявності або відсутності амінокислотних модифікацій стосовно підвищення pI константної ділянки. У Таблиці 54 наведено KD (моль/л) відповідних антитіл стосовно FcRn людини.

Таблиця 54

Скорочена назва	K_D (моль/л)
A375-G1T3/B167-Lamlib	1,27E-06
A375-MY201a/B167-Lamlib	1,19E-06
A375-MY201aPh/B167-Lamlib	1,18E-06
A375-MY518/B167-Lamlib	1,27E-06
A375-MY518a/B167-Lamlib	1,32E-06
A375-TT11/B167-Lamlib	1,56E-06
A375-TT14/B167-Lamlib	1,77E-06
A375-TT16/B167-Lamlib	1,51E-06
A375-P587/B167-Lamlib	1,70E-06
A375-P253/B167-Lamlib	1,42E-06
A375-SCF025/B167-Lamlib	1,10E-06
A375-SCF025a/B167-Lamlib	1,13E-06
A375-SCF027/B167-Lamlib	1,33E-06
A375-SCF028/B167-Lamlib	1,27E-06
A375-SCF030/B167-Lamlib	8,63E-07
A375-SCF032/B167-Lamlib	9,66E-07
A375-SCF033/B167-Lamlib	8,74E-07
A375-SCF039/B167-Lamlib	1,09E-06
A375-SCF039a/B167-Lamlib	1,11E-06
A375-SCF040/B167-Lamlib	1,46E-06
A375-SCF041a/B167-Lamlib	1,10E-06
A375-SCF042a/B167-Lamlib	1,49E-06
A375-SCF043a/B167-Lamlib	1,18E-06
A375-SCF056a/B167-Lamlib	9,56E-07
A375-SCF057a/B167-Lamlib	9,28E-07
A375-SCF059a/B167-Lamlib	1,03E-06
A375-SCF060a/B167-Lamlib	1,01E-06
A375-SCF041aPh/B167-Lamlib	1,13E-06
A375-SCF043aPh/B167-Lamlib	1,21E-06
A375-SCF056aPh/B167-Lamlib	1,00E-06
A375-SCF057aPh/B167-Lamlib	9,09E-07
A375-SCF059aPh/B167-Lamlib	1,05E-06

Приклад 8: Отримання залежних від кінуреніну (Kyn) антитіл проти CD137

(8-1) Отримання антитіл із залежною від кінуреніну зв'язувальною активністю стосовно CD137 людини з раціонально побудованої бібліотеки антитіл

Антитіла, що демонструють зв'язувальну активність стосовно CD137 людини у присутності кінуреніну або не демонструють зв'язувальну активність за відсутності кінуреніну, отримали з раціонально побудованої бібліотеки фагового дисплея антитіл (кінуренінової бібліотеки) для отримання налагоджуваних кінуреніном свіч-антитіл, застосовуючи при цьому пенінг стосовно кінуреніну, при цьому бібліотеку побудували, як описано у міжнародній публікації WO2015/083764. Для одержання біотиніловані антигени, зв'язані фагами у присутності кінуреніну, захопили мікроносіями та одержали фаги, що презентують антитіла, які демонструють зв'язувальну активність стосовно антигенів у присутності кінуреніну. Фаги потім

зібрали з елюатів, елюйованих з мікроносіїв.

Фаги отримали за загальним методом від E. coli, що є носієм побудованого фагміду фагового дисплея. Конкретно, E. coli, що є носієм побудованого фагмідного вектора, інфікували M13KO7ΔpIII (позначається як "гіперфаг") (PROGEN Biotechnik) та фаги одержали з надосадових рідин, культивованих протягом ночі при 30 °C. Розчин фагової бібліотеки отримали шляхом розведення популяції фагів, преципітованих внаслідок додавання 2,5 M NaCl/10 % PEG до культури E. coli, у якій здійснювалося виробництво фагів з використанням Tris-забуференого сольового розчину (TBS). Потім до розчину фагової бібліотеки додали BSA до кінцевої концентрації 4 %. Пенінг здійснювали із застосуванням антигену, іммобілізованого на магнітних мікроносіях. Як магнітні мікроносії застосовували покриті нейтравідином мікроносії Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin (Thermo Fisher Scientific), мікроносії FG NeutrAvidin (Tamakawa Seminator), або покриті стрептавідином Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Life Technologies). Як антиген застосовували біотинілований hCD137-Fc (hCD137-Fc-Bio), отриманий, як описано у Прикладі 1-3 (отримання біотинілованого Fc-злитого CD137 людини).

Пенінг здійснювали з метою ефективного отримання від свіч-антитіл, які залежать від низькомолекулярної сполуки, яка спроможна відігравати роль налагоджувача у ракових тканинах. Конкретно, пенінг з метою збагачення антитіл, які зв'язуються з антигенами у присутності кінуреніну, який є низькомолекулярною сполукою, та які не зв'язуються з антигенами за відсутності кінуреніну, виконували з посиланням на методи, описані у попередньому патенті WO2015/083764. У Раунді 1 пенінг здійснювали на hCD137-Fc-Bio або біотинілований кінуренін (bio-Kyn) (Сполуки: 028 (представлена Формулою 28), 029 (представлена Формулою 29) та 036 (представлена Формулою 36), як описано у WO2015/083764). Пенінг на hCD137-Fc-Bio здійснювали шляхом додавання фагового розчину до антигену з подальшим одержанням фага, зв'язаного з антигеном, за допомогою магнітних мікроносіїв; та пенінг на bio-Kyn здійснювали за методом, під час якого додається приготовлений розчин фагової бібліотеки після першої іммобілізації біотинілованого антигену на магнітних мікроносіях. Для bio-Kyn пенінг для збагачення антитіл, спроможних зв'язуватися з антигеном за відсутності кінуреніну як низькомолекулярної сполуки, здійснювали з посиланням на методи, описані у вищезгаданому патенті WO2015/083764. Для hCD137-Fc-Bio 4 нмоль небіотинілованої Fc-ділянки IgG1 людини додали, щоб видалити антитіла, які зв'язуються з Fc-ділянкою. Одержані фаги додали до штаму E. coli ER2738, щоб інфікувати фагами E. coli, потім одержані E. coli інфікували гіперфагами та фаги одержали з надосадових рідин, культивованих протягом ночі при 30 °C.

Після Раунду 2, з метою збагачення антитіл, які зв'язуються з антигенами у присутності кінуреніну та не зв'язуються з антигенами за відсутності кінуреніну, виконували пенінг на hCD137-Fc-Bio з посиланням на методи, наведені у попередньому патенті WO2015/083764. В обох випадках для hCD137-Fc-Bio додали 4 нмоль небіотинілованої Fc-ділянки IgG1 людини, щоб видалити антитіла, які зв'язуються з Fc-ділянкою. Подібний пенінг повторювали до Раунду 5, щоб збагатити послідовності антитіл, які представляють інтерес.

(8-2) Отримання антитіл, які зв'язуються з hCD137 у присутності кінуреніну, з бібліотеки антитіл

(8-2-1) Отримання hCD137p12-FX-Fc-Bio

hCD137p12-FX-Fc-Bio отримали за методом, відомим фахівцям у цій галузі. Конкретно, фрагмент гена, який кодує послідовність розщеплення Фактора Xa, та фрагмент гена, який кодує константну ділянку антитіла, поєднали в прямому напрямку від фрагмента гена, який кодує ділянку позаклітинного домену CD137 людини. Фрагмент гена, що кодує білок (hCD137p12-FX-Fc-Bio, SEQ ID NO: 160), у якому з'єднані позаклітинна частина CD137 людини, послідовність розщеплення Фактора Xa та константна ділянка, включили у вектор експресії, що експресується в тваринній клітині. Побудований плазмідний вектор ввели у клітини FreeStyle293 (Invitrogen), застосовуючи 293-фектин (Invitrogen). Тоді ж одночасно ввели плазмідний вектор, що включає гени, які експресують BirA та EBNA1 (SEQ ID NO: 88). До культури додали біотин. Клітини, трансдуковані генами згідно з вищезгаданими процедурами, культивували при 37 °C та 8 % CO_2, і hCD137p12-FX-Fc-Bio секретувався у культуральну надосадову рідину. Цю культуральну надосадову рідину зібрали. Для очищення hCD137p12-FX-Fc-Bio від культуральної надосадової рідини застосовували білок A.

Завдяки застосуванню раціонально побудованої бібліотеки вважали, що внаслідок пенінгу антитіл, які демонструють антигензв'язувальну активність у присутності низькомолекулярної сполуки, можна отримати свіч-антитіла, які демонструють антигензв'язувальну активність у присутності низькомолекулярної сполуки. Тобто, з кінуренінової бібліотеки, побудованої за методом, описаним у міжнародній публікації WO2015/083764, одержали фаги, що

представляють антитіла, які у присутності кінуреніну демонструють зв'язувальну активність стосовно hCD137, захопленого мікроносіями. У цьому методі одержання як антиген застосовували біотинілований hCD137-Fc (hCD137-Fc-Bio), отриманий, як описано у Прикладі 1-3 (отримання міченого біотином Fc-злитого CD137 людини), або hCD137p12-FX-Fc-Bio.

E. coli, що є носієм фагмідного вектора фагового дисплея, побудованого, як описано у міжнародній публікації WO2015/083764, інфікували M13KO7ΔpIII (гіперфаг) (PROGEN Biotechnik) та фаги одержали з надосадових рідин після культивування протягом ночі при 30 °C. Розчин бібліотеки антитіл багатовалентного фагового дисплея отримали внаслідок розведення TBS популяції фагів, преципітованих шляхом додавання 2,5 M NaCl /10 % PEG до культури E. coli, у якій здійснювалося виробництво фагів. Потім BSA додали до розчину фагової бібліотеки з кінцевою концентрацією 4 %. Виконували пенінг з антигеном, іммобілізованим на магнітних мікроносіях. Як магнітні мікроносії застосовували мікроносії FG NeutrAvidin (Tamakawa Seminator) або Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Life Technologies).

У Раунді 1 пенінгу здійснювали збагачення фагів, спроможних зв'язуватися з антигеном у присутності кінуреніну. Конкретно, здійснювали контактування фагової бібліотеки з антигеном та кінуреніном протягом однієї години при кімнатній температурі шляхом додавання до 0,8 мл отриманого розчину фагової бібліотеки розчину кінуреніну у кінцевій концентрації 500 мкМ та небіотинілованої Fc-ділянки IgG1 людини (hFC) у кінцевій концентрації 4 нмоль з 125 пмоль міченого біотином антигену. Додали блоковані за допомогою BSA магнітні мікроносії (мікроносії FG NeutrAvidin) та комплексам антиген-фаг дозволили зв'язуватися з магнітними мікроносіями протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Мікроносії промили двічі 0,5 мл кінуреніну/TBST та один раз кінуреніном/TBS. Після цього до суміші додали 0,5 мл розчину трипсину, 1 мг/мл. Після суспендування суміші протягом 15 хвилин при кімнатній температурі одержали розчин фагів з мікроносіїв, які одразу відокремили за допомогою магнітної підставки. Одержані фаги додали до 20 мл штаму E. coli ER2738 у фазі логарифмічного зростання (OD600 0,4-0,7 (оптична густина)). E. coli інфікували фагами за допомогою культивування E. coli при 37 °C протягом однієї години з помірним струшуванням. Інфіковані E. coli посіяли у планшети при 225 мм x 225 мм. Фагові бібліотеки, які презентують одновалентні антитіла, потім отримали шляхом інфікування культур розсіяних E. coli M13KO7TC (WO2015046554A1) (фаг-хелпером) (Takara) та збирання фагів з надосадових рідин, культивованих протягом ночі при 30 °C.

Для Раунду 2 пенінгу здійснювали контактування фагової бібліотеки з антигеном та кінуреніном протягом однієї години при кімнатній температурі шляхом додавання до 0,8 мл приготовленого розчину фагової бібліотеки розчину кінуреніну у кінцевій концентрації 500 мкМ та міченої біотином Fc-ділянки IgG1 людини у кінцевій концентрації 4 ммоль разом з 40 пмоль міченого біотином антигену. Додали блоковані за допомогою BSA магнітні мікроносії (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) та комплексам антиген-фаг дозволили зв'язуватися з магнітними мікроносіями протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Мікроносії промили двічі 0,5 мл кінуреніну/TBST та один раз кінуреніном/TBS. Після цього до суміші додали 0,5 мл розчину трипсину, 1 мг/мл. Після суспендування суміші протягом 15 хвилин при кімнатній температурі одержали розчин фагів з мікроносіїв, які одразу відокремили за допомогою магнітної підставки. Потім розчин бібліотеки фагового дисплея одновалентного антитіла приготували за таким самим методом, як у вищеописаному Раунді 1.

Для Раунду 3 пенінгу здійснювали контактування фагової бібліотеки з антигеном та кінуреніном протягом однієї години при кімнатній температурі шляхом додавання до 0,8 мл приготовленого розчину бібліотеки фагів розчину кінуреніну у кінцевій концентрації 500 мкМ та міченої біотином Fc-ділянки IgG1 людини у кінцевій концентрації 4 ммоль разом з 10 пмоль міченого біотином антигену. Додали блоковані за допомогою BSA магнітні мікроносії (мікроносії FG NeutrAvidin) та комплексам антиген-фаг дозволили зв'язуватися з магнітними мікроносіями протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Мікроносії промили тричі 0,5 мл кінуреніну/TBST та двічі кінуреніном/TBS. Після цього до суміші додали 0,5 мл розчину трипсину, 1 мг/мл. Після суспендування суміші протягом 15 хвилин при кімнатній температурі одержали розчин фагів з мікроносіїв, які одразу відокремили за допомогою магнітної підставки. Потім розчин бібліотеки фагового дисплея одновалентного антитіла приготували за таким самим методом, як у вищеописаному Раунді 1. Для Раунду 4 пенінгу пенінг здійснювали за умов, схожих з умовами пенінгу у Раунді 3. Проте, як магнітні мікроносії застосовували Dynabeads MyOne Streptavidin T1.

(8-3) Отримання антитіл, які зв'язуються з CD137 людини у присутності кінуреніну з бібліотек антитіл із застосуванням SS-біотинілованих антигенів та методів негативного відбору

(8-3-1) Отримання hCD137p12-FX-Fc

hCD137p12-FX-Fc отримали за методом, відомим фахівцям у цій галузі. Конкретно, фрагмент гена, який кодує послідовність розщеплення Фактора Xa, та фрагмент гена, який

кодує константну ділянку антитіла, поєднали в прямому напрямку від фрагмента гена, який кодує ділянку позаклітинного домену CD137 людини. Фрагмент гена, що кодує білок, у якому з'єднані позаклітинна частина CD137 людини, послідовність розщеплення Фактора Ха та константна ділянка антитіла (hCD137p12-FX-Fc, SEQ ID NO: 160), включили у вектор експресії, що експресується в тваринній клітині. Побудований плазмідний вектор ввели у клітини FreeStyle293 (Invitrogen), застосовуючи 293-фектин (Invitrogen). Тоді ж одночасно ввели плазмідний вектор, що включає гени, які експресують EBNA1 (SEQ ID NO: 88). До культури додали біотин. Клітини, трансдуковані генами згідно з вищезгаданими процедурами, культивували при 37 °C та 8 % CO_2, та hCD137p12-FX-Fc-Bio секретувався у культуральну надосадову рідину. Для очищення hCD137p12-FX-Fc-Bio від цієї клітинної культуральної надосадової рідини застосовували білок A.

(8-3-2) Отримання антитіл, які зв'язуються з CD137 людини у присутності кінуреніну, з бібліотеки антитіл із застосуванням SS-біотинілованих антигенів та методу негативного відбору

Коли отримують свіч-антитіла, які налагоджуються низькомолекулярною сполукою та які демонструють антигензв'язувальну активність у присутності низькомолекулярної сполуки, вважали, що після того, як фаги дисплея антитіл, які зв'язуються з антигеном з магнітними мікроносіями, захоплюються із застосуванням антигену, біотинілованого (SS-біотинілованого) через лінкер з дисульфідним зв'язком (SS-зв'язок), тільки зв'язані з антигеном фаги дисплея антитіла можна елюювати з мікроносіїв, застосовуючи дитіотреїтол (DTT) або йому подібне, щоб розщепити SS-зв'язки за відновлювальних умов. Кінуренінову бібліотеку, побудовану, як описано у міжнародній публікації WO2015/083764, піддали скринінгу на антитіла, які демонструють зв'язувальну активність стосовно антигенів у присутності кінуреніну. Для здійснення скринінгу бібліотеку фагового дисплея антитіла, по-перше, піддали контактуванню з магнітними мікроносіями міченого біотином антигену за відсутності кінуреніну та видалили фаги, які демонструють антитіла, які мають зв'язувальну активність стосовно антигену навіть за відсутності кінуреніну. Наступний скринінг на антитіла із зв'язувальною активністю стосовно антигенів виконували тільки у присутності кінуреніну за допомогою пенінгу, подібному пенінгу за умови присутності кінуреніну. У цьому методі мічений біотином антиген (SS-біотинілований антиген) застосовували як антиген згідно з доданими протоколами із застосуванням hCD137-Fc, отриманого, як описано у Прикладі 1-4, або hCD137p12-FX-Fc, отриманого у (8-3-1), та набору EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotinylation (Thermo Fisher Scientific). Зауважте, що hCD137-Fc-Bio, отриманий за методами з Прикладу 1-3, або hCD137p12-FX-Fc-Bio, отриманий у (8-2-1), застосовували для негативного відбору.

E. coli, що є носієм фагмідного вектора фагового дисплея, побудованого, як описано у міжнародній публікації WO2015/083764, інфікували M13KO7ΔpIII (гіперфаг) (PROGEN Biotechnik) та фаги одержали з надосадових рідин після культивування протягом ночі при 30 °C. Бібліотеки фагового дисплея багатовалентного антитіла приготували шляхом розведення TBS популяції фагів, преципітованих внаслідок додавання 2,5 M NaCl /10 % PEG до культури E. coli, у якій здійснювалося виробництво фагів. Потім до розчину фагової бібліотеки додали BSA до кінцевої концентрації 4 %. Виконали пенінг з антигеном, іммобілізованим на магнітних мікроносіях. Як магнітні мікроносії застосовували покриті нейтравідином мікроносії Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin (Thermo Fisher Scientific), мікроносії FG NeutrAvidin (Tamakawa Seminator) або покриті стрептавідином Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Life Technologies).

У Раунді 1 пенінгу збагачення фагів, спроможних зв'язуватися з антигеном у присутності кінуреніну, здійснювали із застосуванням методу негативного відбору. Конкретно, 800 пмоль hCD137-Fc-Bio або hCD137p12-FX-Fc-Bio додали до покритих нейтравідином мікроносів Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin, блокованих знежиреним молоком, попередньо інкубованим зі Streptavidin (Roche), та залишили зв'язуватися протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Мікроносії промили тричі TBST та додали 0,8 мл блокованого за допомогою BSA розчину фагової бібліотеки та залишили зв'язуватися протягом однієї години при кімнатній температурі. Внаслідок відокремлення мікроносіїв із застосуванням магнітної підставки зібрали антигени та фаги, що не зв'язалися з мікроносіями.

Потім 225 пмоль SS-біотинілованого hCD137-Fc або 450 пмоль SS-біотинілованого hCD137p12-FX-Fc-Bio додали до мікроносіїв FG NeutrAvidin, блокованих знежиреним молоком, попередньо інкубованим зі Streptavidin (Roche), та залишили зв'язуватися протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Мікроносії промили тричі TBST, та кінуренін у кінцевій концентрації 0,2 мМ та hFc у кінцевій концентрації 4 нмоль додали разом з одержаними фагами, та здійснювали контактування фагової бібліотеки з антигеном, а також кінуреніном протягом однієї години при кімнатній температурі. Мікроносії промили двічі 0,5 мл кінуреніну/TBST (0,2 мМ кінуренін, 0,1 % Tween20, TBS, pH 7,4) та один раз кінуреніном/TBS (0,2 мМ кінуренін, TBS, pH

7,4). Після цього додали 500 мкл розчину TBS, що містив DTT у кінцевій концентрації 25 мМ, та через п'ять хвилин після збовтування при кімнатній температурі одержали фаги з відокремлених за допомогою магнітної підставки мікроносіїв. Потім до сумішей додали трипсин до фінальної концентрації 1 мг/мл. Суміш збовтували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин перед тим, як фаги одержали з відокремлених за допомогою магнітної підставки мікроносіїв. Одержані фаги додали до 20 мл штаму ER2738 E. coli у фазі логарифмічного зростання (OD600 0,4-0,7). E. coli інфікували фагами шляхом культивування E. coli при 37 °C протягом однієї години при помірному збовтуванні. Інфіковані E. coli посіяли у планшети при 225 мм x 225 мм. Бібліотеку фагового дисплея багатовалентного антитіла потім отримали внаслідок інфікування культур посіяних E. coli гіперфагами та одержання фагів з надосадових рідин, культивованих протягом ночі при 30 °C.

Для Раунду 2 пенінгу 400 пмоль hCD137-Fc-Bio або hCD137p12-FX-Fc-Bio додали до покритих нейтравідином мікроносів Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin, блокованих знежиреним молоком, попередньо інкубованим із Streptavidin (Roche), та залишили зв'язуватися протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. До мікроносіїв, тричі промитих TBST, додали 0,4 мл блокованого за допомогою BSA розчину бібліотеки фагів та залишили зв'язуватися протягом однієї години при кімнатній температурі. Внаслідок відокремлення мікроносіїв із застосуванням магнітної підставки одержали антиген та фаги, що не зв'язалися з мікроносіями. Одержані фаги знов інкубували з покритими нейтравідином мікроносіями Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin, які були інкубувані з 400 пмоль hCD137-Fc-Bio або hCD137p12-FX-Fc-Bio за подібним методом, а потім антигени та фаги, що не зв'язалися з мікроносіями, зібрали з використанням магнітної підставки.

56,3 пмоль SS-біотинілованого hCD137-Fc або 113 пмоль SS-біотинілованого hCD137p12-FX-Fc додали до мікроносіїв FG NeutrAvidin, блокованих знежиреним молоком, попередньо інкубованим зі Streptavidin (Roche), та залишили зв'язуватися протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Мікроносії промили тричі TBST, та додали кінуренін у кінцевій концентрації 0,2 мМ та Fc-ділянку небіотинілованого IgG1 людини у кінцевій концентрації 4 нмоль разом з одержаними фагами, та здійснювали контактування фагової бібліотеки з антигеном, а також кінуреніном протягом однієї години при кімнатній температурі. Мікроносії промили тричі 0,5 мл кінуреніну/TBST (0,2 мМ кінуренін, 0,1 % Tween20, TBS, pH 7,4) та двічі кінуреніном/TBS (0,2 мМ кінуренін, TBS, pH 7,4). Після цього додали 500 мкл розчину TBS, що містив DTT у кінцевій концентрації 25 мМ, та через п'ять хвилин після збовтування при кімнатній температурі одержали фаги з відокремлених за допомогою магнітної підставки мікроносіїв. Після цього розчин бібліотеки фагового дисплея багатовалентного антитіла приготували за таким же самим методом, як описано вище у Раунді 1.

Для Раунду 3 пенінгу 200 пмоль hCD137-Fc-Bio або hCD137p12-FX-Fc-Bio додали до покритих нейтравідином мікроносіїв Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin, блокованих знежиреним молоком, попередньо інкубованим зі Streptavidin (Roche), та залишили зв'язуватися протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Мікроносії тричі промили TBST, та додали 0,2 мл блокованого за допомогою BSA розчину бібліотеки фагів, та залишили зв'язуватися протягом однієї години при кімнатній температурі. Внаслідок відокремлення мікроносіїв із застосуванням магнітної підставки одержали антигени та фаги, що не зв'язалися з мікроносіями. Одержані фаги знов інкубували з покритими нейтравідином мікроносіями Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin, які були інкубувані з 200 пмоль hCD137-Fc-Bio або hCD137p12-FX-Fc-Bio за подібним методом, а потім антигени та фаги, що не зв'язалися з мікроносіями, зібрали за допомогою магнітної підставки.

12,5 пмоль SS-біотинілованого hCD137-Fc або 25 пмоль SS-біотинілованого hCD137p12-FX-Fc додали до мікроносіїв FG NeutrAvidin, блокованих знежиреним молоком, попередньо інкубованим зі Streptavidin (Roche), та залишили зв'язуватися протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Мікроносії промили тричі TBST, та додали кінуренін у кінцевій концентрації 0,2 мМ та Fc-ділянку небіотинілованого IgG1 людини у кінцевій концентрації 4 нмоль разом з одержаними фагами; та здійснювали контактування фагової бібліотеки з антигеном, а також кінуреніном протягом однієї години при кімнатній температурі.

Мікроносії промили п'ять разів 0,5 мл кінуреніну TBST (0,2 мМ кінуренін, 0,1 % Tween20, TBS, pH 7,4) та п'ять разів кінуреніном/TBS (0,2 мМ кінуренін, TBS, pH 7,4). Після цього додали 500 мкл розчину TBS, що містив DTT у кінцевій концентрації 25 мМ, та через п'ять хвилин після збовтування при кімнатній температурі одержали фаги з відокремлених за допомогою магнітної підставки мікроносіїв. Після цього розчин бібліотеки фагового дисплея багатовалентного антитіла приготували за таким же самим методом, як описано вище у Раунді 1. Для Раунду 4 пенінгу пенінг виконували за умов, схожих з умовами Раунду 3 пенінгу. Однак як магнітні

мікроносії застосовували Dynabeads MyOne Streptavidin T1 замість мікроносіїв FG NeutrAvidin. Для Раунду 5 пенінгу пенінг виконували за умов, схожих з умовами Раунду 3 пенінгу.

(8-4) Оцінювання залежних від кінуреніну антитіл проти CD137, ідентифікованих за допомогою фагового дисплея

(8-4-1) Експресія та очищення свіч-антитіл, які змінюють своє зв'язування з антигенами внаслідок присутності/відсутності кінуреніну

Гени, що кодують варіабельні ділянки антитіл, отриманих з описаних у цьому описі кінуренінових бібліотек, вставили у плазміди експресії, які експресуються в тваринній клітині та які мають IgG1 людини або модифікований IgG1 людини (P253) та каппа-ланцюги. Назви клонів та номери послідовностей наведено у Таблиці 55.

Таблиця 55

Оцінені клони

Назва клону	SEQ ID NO важкого ланцюга (повнорозмірний)	SEQ ID NO легкого ланцюга (повнорозмірний)	Приклад
dBBK026-P253	161	169	8-1
dBBK051-P253	162	170	8-1
dBBK054-P253	163	171	8-1
dBBK060-P253	164	172	8-1
dBBK070-P253	165	173	8-1
dBBK101-P253	166	174	8-2
dBBK102-P253	167	175	8-2
dBBK143-P253	168	176	8-2

Антитіла експресували та очищували, застосовуючи відомі фахівцям у цій галузі методи. Спектрофотометри застосовували для вимірювання поглинання розчину очищеного антитіла при 280 нм. З отриманих виміряних значень концентрацію очищених антитіл розрахували, застосовуючи коефіцієнти екстинкції, розраховані за методом PACE [Protein Science (1995) 4, 2411-2423].

(8-4-2) Оцінювання впливу кінуреніну на зв'язування з CD137 людини за допомогою поверхневого плазмонного резонансу

Biacore T200 (GE Healthcare) застосовували для аналізу взаємодії антиген-антитіло між антитілом проти CD137 та hCD137-His-BAP (SEQ ID NO: 87). Сенсорний чип CM3 (GE Healthcare), на якому була іммобілізована відповідна кількість білку Sure Protein A (GE Healthcare) за методом амінного зчеплення, захопився антитілом проти CD137, щоб взаємодіяти з hCD137-His-BAP, отриманим у Прикладі 1-1. Як буфер прогону застосовували TBS, а як регенераційний розчин застосовували 10 мМ гліцин-HCl (pH 1,5) та 25 мМ NaOH.

Після захоплення антитіла проти CD137, суспендованого у TBS, впорскували 500 нМ hCD137-His-BAP у кожну проточну комірку з витратою потоку 10 мкл/хв протягом 3 хвилин. Цей трихвилинний період був фазою зв'язування для hCD137-His-BAP, а після припинення фази зв'язування 5-хвилинний період перемикання на буфер прогону був фазою дисоціації для hCD137-His-BAP. Після завершення фази дисоціації впорскували регенераційний розчин з витратою потоку 30 мкл/хв протягом 10 секунд. Вищевказане було циклом вимірювання зв'язувальної активності антитіл проти CD137. Зв'язувальну кількість hCD137-His-BAP, яка вступила у взаємодію з антитілом проти CD137 у фазі зв'язування, проаналізували за допомогою програмного забезпечення Biacore T200 Evaluation Software Version 2.0, та результати наведені у Таблиці 56.

Таблиця, у якій наведено значення зв'язування антигену у присутності кінуреніну.

Таблиця 56

Назва клону	Без низькомолекулярної сполуки	500 мкМ кінуренін
dBBK026-P253	18,2	60
dBBK047-P253	-2	10,4
dBBK051-P253	-2,3	30
dBBK054-P253	-2,2	3,6
dBBK060-P253	2,8	38,5
dBBK070-P253	-1,4	2,6
dBBK101-P253	-3,6	21,2
dBBK102-P253	-2,5	9,9
dBBK143-P253	-1,9	44,3

(8-4-3) Оцінювання зв'язувальної активності отриманих антитіл стосовно часткових послідовностей CD137

(8-4-3-1) Отримання антигенів з частковими послідовностями CD137

Антигени з частковими послідовностями CD137 отримали за методами, відомими фахівцям у цій галузі. Конкретно, фрагмент гена, що кодує константну ділянку антитіла, приєднали у прямому напрямку від фрагмента гена, що кодує частину позаклітинної ділянки CD137 людини. Фрагмент гена, що кодує білок (Таблиця 57), у якому зшиті частина позаклітинного домену CD137 людини та константна ділянка антитіла, включили у вектор експресії, що експресується в тваринній клітині. Побудований плазмідний вектор ввели у клітини Expi293 (Invitrogen), застосовуючи ExpiFectamine293 (Invitrogen), та білок, що представляє інтерес, секретувався у культуральну надосадову рідину. Білок А з культуральної надосадової рідини застосовували для очищення білка, що представляє інтерес.

Таблиця 57

Антигени з частковими послідовностями CD137

Назва антигену, що має часткову послідовність CD137	SEQ ID NO
hCD137.1-F-G1d	177
hCD137.1.2-F.G1d	178
hCD137.2.4-F.G1d	179
hCD137.2.3-F.G1d	180
hCD137.3.4-F.G1d	181

(8-4-3-2) Підтвердження зв'язування

За допомогою ELISA визначили, чи зв'язуються отримані антитіла з антигенами, що мають часткові послідовності CD137. По-перше, різні антигени, отримані у Прикладі 1 або Прикладі 8-4-3-1, іммобілізували на мікротитраційних планшетах Maxisorp 384. Після того, як незв'язані антигени видалили з планшетів шляхом промивання кожної лунки планшетів буфером для промивання, лунки блокували 50 мкл блокувального буфера (TBS, що містив BlockAce) протягом однієї години або довше. До кожної з лунок, з яких видалили блокувальний буфер, додали 10 мкл очищених антитіл, приготовлених при 10 мкг/мл у TBS з L-кінуреніном у кінцевій концентрації 500 мкМ або у TBS з кінуреніном у кінцевій концентрації 500 мкМ, та залишили на одну годину. Кон'юговані з лужною фосфатазою (AP) антитіла проти каппа людини (BIOSOURCE), розведені у TBS з кінуреніном у кінцевій концентрації 500 мкМ, додали до кожної лунки після промивання буфером промивання, що містив кінуренін у кінцевій концентрації 500 мкМ (TBS з 0,1 % Tween20). Після інкубування протягом однієї години фосфатний субстрат BluePhos (KPL) додали після промивання буфером промивання, що містив 500 мкМ кінуренін. Розвиток кольору розчину у кожній лунці вимірювали за допомогою поглинання при 620 нм після того, як реакцію розвитку кольору розчину у кожній лунці припинили шляхом додавання стоп-розчину BluePhos. Наведено відношення поглинання при прийнятті за 1 значення поглинання лунки з антитілом у концентрації 0 мкг/мл. Якщо оцінювати зв'язування за відношенням поглинання, яке перебільшує або дорівнює 2, то можна припустити, що оцінені клони включають антитіла, які демонструють відмінні властивості зв'язування.

Таблиця 58

Назва клону	hCD137.1-F.G1d	hCD137.1.2-F.G1d	hCD137.2.4-F.G1d	hCD137.2.3-F.G1d	hCD137.3.4-F.G1d	hCD137-Fc	cyCD137-Fc-BAP
dBBK026-P253	1,0	1,2	1,2	1,1	4,2	5,7	8,3
dBBK047-P253	1,2	1,2	2,1	4,0	4,8	2,4	1,2
dBBK051-P253	1,2	1,2	1,2	1,2	3,3	3,7	5,9
dBBK054-P253	3,3	1,1	1,3	1,1	1,3	8,6	1,1
dBBK060-P253	1,2	1,4	1,4	1,2	1,2	4,9	1,0
dBBK070-P253	1,8	2,0	1,3	1,1	1,2	9,2	3,1
dBBK101-P253	1,3	1,2	1,1	1,0	1,1	3,7	5,3
dBBK102-P253	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1	2,8	4,3

(8-5) Оцінювання активності in vitro отриманих антитіл

Клітинну лінію GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat (Promega) застосовували для вимірювання in vitro активності антитіла. До кожної лунки планшетів з 384 лунками додали 10 мкл клітин FcγRIIB CHO-K1 Cells, приготовлених зі щільністю $2x10^6$ клітин/мл з середовищем для аналізу (99 % RPMI, 1 % FBS). Розчини антитіла з кінуреніном або без кінуреніну додали у кожну лунку по 10 мкл. Потім до кожної лунки додали 10 мкл клітинної лінії GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat, приготовленої зі щільністю $2x10^6$ клітин/мл з середовищем для аналізу (99 % RPMI, 1 % FBS). Кінцева концентрація кінуреніну становила 500 мкМ. Планшети залишили стояти протягом шести годин при 37 °C в інкубаторі з 5 % CO_2, а потім протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та до кожної лунки додали 30 мкл реагенту Bio-Glo. Систему для аналізу люциферази Bio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate) застосовували як реагент Bio-Glo. Після цього люмінесценцію кожної лунки вимірювали за допомогою планшет-ридера. Значення люмінесценції кожної лунки, поділене на значення люмінесценції лунки без додавання антитіла, відповідало кратності люмінесценції та слугувало показником для оцінювання активності кожного антитіла.

Отримані результати наведені на Фіг. 57.

Кратність люмінесценції була вищою, коли концентрація L-кінуреніну становила 500 мкМ, ніж коли вона становила 0 мкМ, що вказує на те, що агоністична активність змінилася за концентрацією кінуреніну або завдяки його присутності.

Приклад 9: Отримання залежних від ATP та AMP антитіл, що зв'язуються з CD137, шляхом відбору у два раунди

(9-1) Отримання антитіл, які зв'язуються з антигенами у присутності ATP та AMP, відповідно, з раціонально побудованої бібліотеки із застосуванням методу відбору у два раунди

Були отримані антитіла, які демонструють зв'язувальну активність стосовно антигену у присутності конкретної низькомолекулярної сполуки, але ніколи не повідомлялося про отримання антитіл, які демонструють зв'язувальну активність стосовно антигену у присутності численних різних низькомолекулярних сполук. Один із способів для розв'язання цієї проблеми – це розгляд змінювального пенінгу, при якому змінюють низькомолекулярну сполуку, яка застосовується для кожного раунду пенінгу, наприклад, ATP та AMP. Однак, у цьому випадку, існує проблема, що тиск під час відбору застосовується для відносно низькомолекулярної сполуки на кожному раунді, та, як наслідок, тиск під час відбору не може однаково діяти на обидві невеликі молекули одночасно. Для розв'язання цієї проблеми втілювали метод відбору з подвійним раундом. Метод відбору з подвійним раундом – це метод, у якому два цикли пенінгу виконуються на єдиному антигені у єдиному раунді пенінгу [J Mol Biol. 1992 Aug 5;226(3):889-96.]. Тут, наприклад, у випадку методу фагового дисплея один раунд є етапом одержання фагів з E. coli для повторного інфікування E. coli фагами після пенінгу; та у випадку методу рибосомного дисплея один раунд є етапом від транскрипції in vitro до ампліфікації генів за допомогою ПЛР. Хоча повідомлялося про відбір з подвійним раундом для одного типу антигену, не існує повідомлень щодо його застосування для отримання залежних від низькомолекулярної сполуки антитіл, та, природно, не існує повідомлень щодо його застосування для отримання антитіл, які демонструють залежність від множинних відмінних низькомолекулярних сполук. Модифікуючи метод відбору з подвійним раундом та застосовуючи вибірковий тиск на як ATP, так і AMP в одному раунді, автори винаходу вважають, що можна ефективніше отримати антитіла, які демонструють зв'язувальну активність стосовно антигену у залежний від ATP та AMP спосіб.

Антитіла, що демонструють зв'язувальну активність стосовно антигену у присутності ATP та

AMP, отримали з раціонально побудованої бібліотеки фагового дисплея антитіла, побудованої у попередньому патенті WO2015/083764. Умови пенінгу наведено у Таблиці 59. Умови 1 та 2 застосовували до умови традиційного пенінгу та вищезгаданої змінювальної умови; при цьому Умову 3 застосовували до вищезгаданого методу відбору подвійного раунду. Тут, відбір подвійного раунду виконували у Раунді 2 та Раунді 3. Як антиген застосовували біотинілований hCD137-Fc.

У Таблиці 59 ATP вказує на пенінг із застосуванням ATP, AMP вказує на пенінг із застосуванням AMP, та подвійний вказує на пенінг із застосуванням відбору з подвійним раундом.

Таблиця 59

Умова	Раунд 1	Раунд 2	Раунд 3
1	ATP	ATP	ATP
2	ATP	AMP	ATP
3	ATP	Подвійний	Подвійний

Фаги отримали за загальним методом від E. coli, яка є носієм побудованого фагміду фагового дисплея. Конкретно, E. coli, яка є носієм побудованого фагмідного вектора, інфікували M13KO7TC (WO2015046554A1) або M13KO7ΔpIII (гіперфаг) (PROGEN Biotechnik) та фаги одержали з надосадових рідин, культивованих протягом ночі при 30 °C. Бібліотеки фагового дисплея антитіл отримали шляхом розведення TBS популяції фагів, преципітованих шляхом додавання 2,5 M NaCl/10 % PEG до культури E. coli, у якій здійснювалося виробництво фагів.

Потім додали BSA до розчину бібліотеки фагів у кінцевій концентрації 4 %. Пенінг виконували, застосовуючи антиген, іммобілізований на магнітних мікроносіях. Як магнітні мікроносії застосовували мікроносії NeutrAvidin (TAMAGAWA SEIKI) або Dynabeads MyOne StreptAvidin T1 (Thermo Fisher Scientific).

До отриманого розчину бібліотеки фагів додали біотинілований hCD137-Fc та ATP у кінцевій концентрації 1 мМ та залишили реагувати при кімнатній температурі протягом 60 хвилин. До реакційного розчину фага та антигену додали блоковані магнітні мікроносії, та вони реагували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин. Мікроносії промили двічі або тричі буфером TBS/0,1 % Tween20, що містив 1 мМ ATP, та один раз або двічі TBS, що містив 1 мМ ATP. Мікроносії, до яких потім додали TBS, суспендували при кімнатній температурі, та розчин фагів одержали з мікроносіїв, відокремлених із застосуванням магнітної підставки. Після двох повторів цієї процедури елюйований розчин фагів змішали. Одержані фаги додали до 20 мл штаму ER2738 E. coli у фазі логарифмічного зростання (OD600 0,4-0,7). E. coli інфікували фагами шляхом культивування E. coli протягом однієї години при 37 °C. E. coli посіяли у планшети при 225 мм x 225 мм. E. coli інфікували M13KO7TC (WO2015046554A1) або M13KO7ΔpIII (називається гіперфагом) (PROGEN Biotechnik), та культивували протягом ночі при 30 °C, та одержали фаги з надосадових рідин. За умовою 1 цю процедуру повторювали тричі. За умовою 2 після того, як вищезгадану процедуру здійснили один раз, ATP замінили на AMP та вищезгадану процедуру виконали знов (Раунд 2), а після цього вищезгадану процедуру виконали знов з ATP (Раунд 3).

З іншого боку, за умовою 3, після того як вищезгадану процедуру виконали один раз, відбір з подвійним раундом виконали у Раунді 2 та Раунді 3. Конкретно, до приготовленого розчину бібліотеки фагів спочатку додали біотинілований hCD137-Fc та AMP у кінцевій концентрації 1мМ, та вони реагували при кімнатній температурі протягом 60 хвилин. Блоковані магнітні мікроносії додали до реакційного розчину фага та антигену, та вони реагували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин. Мікроносії промили двічі або тричі буфером TBS/0,1 % Tween20, що містив 1 мМ AMP. Мікроносії, до яких потім додали TBS, суспендували при кімнатній температурі, та розчин фагів одержали з мікроносіїв, відокремлених за допомогою магнітної підставки. Після двох повторів цієї процедури змішали елюйований розчин фагів. Крім того, до одержаного розчину бібліотеки фагів потім додали біотинілований hCD137-Fc та AMP у кінцевій концентрації 1 мМ, та вони реагували при кімнатній температурі протягом 60 хвилин. Блоковані магнітні мікроносії додали до реакційного розчину фага та антигену, та вони реагували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин. Мікроносії промили двічі або тричі буфером TBS/0,1 % Tween20, що містив 1 мМ AMP, та один раз або двічі TBS, що містив 1 мМ ATP. Мікроносії, до яких потім додали TBS, суспендували при кімнатній температурі, та розчин фагів одержали з мікроносіїв, відокремлених за допомогою магнітної підставки. Після двох повторів цієї процедури змішали елюйований розчин фагів. Трипсин у кінцевій концентрації 1

мг/мл додали до одержаного фагового розчину. Одержані фаги додали до 20 мл штаму ER2738 E. coli у фазі логарифмічного зростання (OD600 0,4-0,7). E. coli інфікували фагами шляхом культивування E. coli зі струшуванням протягом однієї години при 37 °C. E. coli посіяли у планшети при 225 мм x 225 мм. E. coli інфікували M13KO7TC (WO2015046554A1) або M13KO7ΔpIII (називається гіперфагом) (PROGEN Biotechnik), та культивували протягом ночі при 30 °C, та одержали фаги з надосадових рідин.

(9-2) Оцінювання зв'язувальної активності у присутності та за відсутності ATP або AMP за допомогою фагового ELISA

3 єдиних колоній E. coli, отриманих згідно з вищеописаними методами, культуральні надосадові рідини, що містили фаги, зібрали із застосуванням традиційних методів (Methods Mol. Biol. (2002) 178,133-145). NucleoFast 96 (MACHEREY-NAGEL) застосовували для здійснення ультрафільтрації зібраної культуральної надосадової рідини. Фільтрат видалили шляхом центрифугування (4500 g, 45 хвилин) NucleoFast 96, у якому у кожну лунку було внесено 100 мкл культуральної надосадової рідини. NucleoFast 96, у якому до кожної лунки було додано 100 мкл H_2O, промили знов шляхом центрифугування (4500 g, 30 хвилин). Нарешті додали 100 мкл TBS та одержали розчин фагів, що містився у надосадових рідинах лунок NucleoFast 96, які залишили стояти при кімнатній температурі протягом 5 хвилин.

TBS, 1 мМ AMP/TBS або 1 мМ ATP/TBS додали до очищених фагів, які потім піддали ELISA за нижчеописаною процедурою. У покриті стрептавідином мікропланшети з 384 лунками (greiner, 781990) внесли на ніч 100 мкл TBS, що містив біотинілований hCD137-Fc, отриманий у Прикладі 1. Після того, як незв'язані антигени видалили з планшетів шляхом промивання кожної лунки планшетів за допомогою TBST, лунки блокували 250 мкл 0,4 % Block Ace, 1 % BSA, 0,02 % Tween, 0,05 % ProClin 300-TBS протягом ночі або довше. Фагам, що презентують антитіло, потім дозволили зв'язуватися з антигеном, присутнім у кожній лунці за відсутності та у присутності ATP або AMP, витримуючи планшети з доданими до кожної лунки приготовленими очищеними фагами при 37 °C протягом однієї години. Кожну лунку промили за допомогою TBST, 1 мМ ATP/TBST або 1 мМ AMP/TBST, та до неї додали HRP-кон'юговане антитіло проти M13 (Amersham Pharmacia Biotech), розведене у TBS, 1 мМ AMP/TBS або 1 мМ ATP/TBS, та інкубували протягом однієї години. Після промивання за допомогою TBST, 1 мМ ATP/TBST або 1 мМ AMP/TBST розвиток кольору розчину у кожній лунці, до якої додали єдиний розчин TMB (ZYMED), припинили шляхом додавання сірчаної кислоти, а потім розвиток кольору виміряли за допомогою поглинання при 450 нм.

Результати фагового ELISA наведено у Таблиці 60.

Тут, клони, у яких відношення сигнал-шум поглинання перебільшувало 2 у присутності ATP (відношення поглинання у присутності антигену до поглинання за відсутності антигену), вважали позитивними стосовно зв'язування, а ті клони, у яких відношення поглинання становило 3 або більше у присутності/відсутності ATP або AMP, вважали клонами з антигензв'язувальною активністю, яка залежить від ATP або AMP (свіч-клони). Як наслідок, для hCD137-Fc більшість клонів, отриманих при умові 1, показали зв'язування у присутності ATP, але не показали зв'язування у присутності AMP. Серед клонів, які показали зв'язування у присутності ATP та не показали зв'язування за відсутності AMP та які отримали при умові 2, були численні антитіла, які показали зв'язування навіть у присутності AMP, однак їх процентний вміст становив 50 % або менше. З іншого боку, при умові 3, де здійснювався відбір з подвійним раундом, 65 % або більше клонів, що показали зв'язування у присутності ATP та не показали зв'язування за відсутності ATP, були спроможні показати зв'язування навіть у присутності AMP.

Для отриманих клонів ампліфіковані гени важкого ланцюга секвенували, застосовуючи специфічні праймери pBAD-F, G1seq-R.

Як наслідок, при умові 3, за якої здійснювали відбір з подвійним раундом, отриманих послідовностей важкого ланцюга антитіла, які демонструють залежне від ATP та AMP зв'язування з CD137 людини, було втричі більше, ніж при умові 1, яку виконували тільки з ATP, та приблизно у 1,5 разів більше, ніж при умові 2, де альтернативно застосовувалися ATP та AMP. Це вказує на те, що відбір з подвійним раундом є більш цінним підходом до отримання антитіл, які демонструють зв'язувальну активність стосовно антигену, яка залежить від набору відмінних низькомолекулярних сполук.

Таблиця 60

	Умова 1	Умова 2	Умова 3
Кількість клонів, яких піддали ELISA	96	96	96
Кількість позитивних клонів (відношення сигнал-шум > 2, ATP)	69	88	91
Кількість ATP-свіч-клонів (відношення +/-ATP >= 3)	65	84	82
Кількість ATP-, AMP-свіч-клонів (відношення +/-ATP >= 3 та відношення +/-AMP >= 3)	13	40	54
Пропорція ATP-, AMP-свіч-клонів	20,0 %	47,6 %	65,9 %
Кількість послідовностей ATP-, AMP-свіч-клонів (відношення +/- ATP >= 3 та відношення +/-AMP >= 3)	13	25	38

Приклад 10: Отримання залежних від ATP антитіл, що зв'язуються з CTLA4 миші, з наївної бібліотеки

(10-1) Отримання антитіл, що зв'язуються з мишачим CTLA4 у присутності низькомолекулярних сполук, з наївної бібліотеки антитіл людини шляхом пенінгу з мікроносіями

Бібліотеку фагового дисплея антитіл людини, яка складається з набору фагів, які презентують домени Fab різних послідовностей антитіл людини, побудували згідно з відомими фахівцям у цій галузі методами, застосовуючи як матрицю РНК poly(A), отриману з PBMC (мононуклеарів периферійної крові) людини, комерційно доступну РНК poly(A) людини.

З побудованої наївної бібліотеки фагового дисплея антитіл людини піддали скринінгу антитіла, які демонструють зв'язувальну активність стосовно позаклітинного домену CTLA4 миші (mCTLA4) у присутності низькомолекулярних сполук. Тобто, зібрали фаги, що презентують антитіла, які демонструють зв'язувальну активність стосовно mCTLA4, захопленого мікроносіями, у присутності низькомолекулярних сполук. Фаги одержали з фагових елюатів, елюйованих з мікроносіїв за відсутності низькомолекулярних сполук. Біотинілований mCTLA4 (mCTLA4-His-Biotin) застосовували як антиген у цьому методі. mCTLA4-His-Biotin отримали шляхом біотинілування [PIERCE Cat. No. 21329) mCTLA4-His Sino Biologics Inc. 50503-M08H, Accession No. NP_033973.2] за методом амінного зчеплення, який виконували шляхом злиття His-мітки з позаклітинним доменом mCTLA4.

Звичайними методами очистили фаги, отримані з E. coli, яка є носієм побудованих фагмідів фагового дисплея. Потім розчин бібліотеки фагів піддали діалізу за допомогою TBS, та його отримали. Виконали пенінг з антигеном, іммобілізованим на магнітних мікроносіях. Як магнітні мікроносії застосовували покриті нейтравідином мікроносії [Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated] або покриті стрептавідином мікроносії (Dynabeads M-280 Streptavidin).

Для того, щоб ефективно отримати свіч-антитіла, що налагоджуються низькомолекулярною сполукою, які залежать від низькомолекулярної сполуки, яка може відігравати роль налагоджувача у ракових тканинах, пенінг для збагачення антитіл, які зв'язуються з антигенами у присутності аденозинтрифосфату (аденозин 5'-трифосфат; ATP) та метаболітів ATP та не зв'язуються з антигенами за відсутності ATP, виконували з посиланням на методи, описані у попередньому патенті WO2013/180200.

Конкретно, до приготовленого розчину бібліотеки фагів додали біотинілований mCTLA4 та ATP та метаболіти ATP у кінцевій концентрації 1 мМ та залишили їх реагувати при кімнатній температурі протягом 60 хвилин. Блоковані магнітні мікроносії додали до реакційного розчину фага та антигену, та вони реагували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин. Мікроносії промили двічі або тричі буфером TBS/0,1 % Tween20, що містив 1 мМ ATP, та один раз або двічі TBS, що містив 1 мМ ATP. Мікроносії, до яких потім додали TBS, суспендували при кімнатній температурі і одержали розчин фагів з мікроносіїв, відокремлених за допомогою магнітної підставки. Потім до мікроносіїв додали трипсин у кінцевій концентрації 1 мг/мл у Раунді 1 та TBS у Раунді 2 і далі, та їх суспендували при кімнатній температурі, та одержали фагові розчини з мікроносіїв, відокремлених за допомогою магнітної підставки. Якщо застосовували TBS, цю процедуру повторювали двічі, а потім змішували елюйовані фагові розчини та до одержаного фагового розчину додавали трипсин у кінцевій концентрації 1 мг/мл. Одержані фаги додали до 10 мл штаму ER2738 E. coli у фазі логарифмічного зростання (OD600 0,4-0,7). E. coli інфікували фагами за допомогою культивування E. coli зі струшуванням протягом однієї години при 37 °C. E. coli посіяли у планшети при 225 мм x 225 мм. E. coli інфікували M13KO7TC (WO2015046554A1) або M13KO7ΔpIII (називається гіперфагом) (PROGEN

Biotechnik), та культивували протягом ночі при 30 °C, та фаги одержали з надосадових рідин. Під час культивування умову додавання 100 мкМ IPTG та умову без додавання IPTG застосовували для того, щоб індукувати експресію генів Fab з промотору lac. Цю процедуру повторювали чотири рази.

(10-2) Оцінювання зв'язувальної активності у присутності та за відсутності низькомолекулярних сполук за допомогою фагового ELISA

З єдиних колоній E. coli, отриманих у Прикладі 10-1, культуральні надосадові рідини, що містили фаги, зібрали із застосуванням традиційних методів (Methods Mol. Biol. (2002) 178,133-145). NucleoFast 96 (MACHEREY-NAGEL) застосовували для здійснення ультрафільтрації зібраних культуральних надосадових рідин. 100 мкл кожної культуральної надосадової рідини внесли у кожну лунку NucleoFast 96 та здійснювали центрифугування при 4500 g протягом 45 хвилин, щоб видалити фільтрат. Додали 100 мкл H_2O та знов виконали промивання шляхом центрифугування (4500 g, 30 хвилин). Нарешті додали 100 мкл TBS, залишили стояти при кімнатній температурі протягом 5 хвилин, та одержали фаговий розчин, що містився у надосадових рідинах.

TBS додали до очищених фагів, які потім піддали ELISA за процедурою, описаною нижче. У мікротитраційні планшети StreptaWell 96 (Roche) внесли на ніч 100 мкл TBS, що містив mCTLA4-His-Biotin. Після того, як незв'язаний mCTLA4-His-Biotin видалили з планшетів шляхом промивання кожної лунки планшетів за допомогою TBST, лунки блокували 250 мкл 2 % знежиреного молока-TBS протягом більше однієї години. Фагам, що презентують антитіло, потім дозволили зв'язуватися з mCTLA4-His-Biotin, присутнім у кожній лунці, за відсутності та у присутності ATP, видаливши 2 % знежирене молоко-TBS, а потім зберігали планшети з приготовленими очищеними фагами, доданими до кожної лунки, при кімнатній температурі протягом однієї години. Кожну лунку промили за допомогою TBST або ATP/TBST та додали HRP-кон'юговане антитіло проти M13 (Amersham Pharmacia Biotech), розведене у TBS або ATP/TBS, та інкубували протягом однієї години. Після промивання за допомогою TBST або ATP/TBST розвиток кольору розчину у кожній лунці, до якої додали єдиний розчин TMB (ZYMED), припинили шляхом додавання сірчаної кислоти та потім вимірювали розвиток кольору за допомогою поглинання при 450 нм. Як наслідок, підтвердили декілька антитіл, які зв'язуються з mCTLA4 тільки у присутності ATP.

Результати фагового ELISA наведено у Таблиці 61.

Тут клони з поглинанням, що перевищувало 0,2 у присутності ATP, вважали позитивними, а клони з відношенням поглинання вище ніж 2 у присутності/відсутності ATP вважали клонами із залежною від ATP антигензв'язувальною активністю (свіч-клонами).

Таблиця 61

Фаг-хелпер, що застосовувався під час пенінгу	M13KO7TC	M13KO7TC	M13KO7ΔpIII
Концентрація IPTG під час культивування для пенінгу	0 мкМ	100 мкМ	0 мкМ
Кількість клонів, що піддали ELISA	96	96	96
Кількість позитивних клонів (поглинання > 0,2)	20	41	62
Кількість свіч-клонів (SM+/- відношення > 2)	0	12	16

Вищезгаданий винахід описано докладно з прикладами та ілюстративним матеріалом з метою сприяти чіткому розумінню, та опис та ілюстративний матеріал в цьому описі не слід розглядати як такі, що обмежують обсяг винаходу. Усі описи патентів та наукової літератури, процитовані усюди у цьому описі винаходу, повністю включені до нього шляхом посилання.

Приклад 11: Оцінювання in vitro залежної від ATP та ADP агоністичної активності CD137 модифікованих антитіл проти CD137 людини за допомогою аналізу з використанням репортерного гена клітин 4-1BB Jurkat

Клітинну лінію GloResponse™ NF-κB Luc2/4-1BB Jurkat (Promega, CS196004) застосовували для вимірювання in vitro активності варіантів, отриманих у Прикладі 7-2 (Таблиця 52). До кожної лунки планшетів з 384 лунками додали 10 мкл клітин FcγRIIB CHO-K1 Cells (Promega), приготовлених зі щільністю 4×10^5 клітин/мл у аналітичному середовищі (99 % RPMI, 1 % FBS). Після цього до кожної лунки додали 10 мкл розчину антитіла, що містив ADP, або розчину антитіла, що містив ATP, або розчину антитіла без ATP або ADP. Потім, до кожної лунки додали

10 мкл клітинної лінії GloResponseTM NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat, приготовленої зі щільністю 2x10^6/мл у аналітичному середовищі (99 % RPMI, 1 % FBS). Кінцева концентрація ADP становила 10 мкМ, та кінцева концентрація ATP становила 10 мкМ. Планшети залишили стояти протягом 6 годин при 37 °C в інкубаторі з 5 % CO_2 та протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та до кожної лунки додали 30 мкл реагенту Bio-Glo. Bio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate) застосовували як реагент Bio-Glo. Після цього, значення люмінесценції кожної лунки виміряли за допомогою планшет-ридера. Значення люмінесценції кожної лунки, поділене на значення люмінесценції лунки без додавання антитіла, визначили як "відносну світлову одиницею" (кратність індукції), та воно застосовувалося як показник для оцінювання агоністичної активності CD137 кожного антитіла.

Результати показані на Фігурі 58. За допомогою Фігури 58 було підтверджено, що A375-P587/B167-LamLib, A551-P587/B256-LamLib, A551-P587/B379-LamLib, A375-SCF041aPh/B167-LamLib, A551-SCF041aPh/B256-LamLib, A551-SCF041aPh/B379-LamLib, A375-SCF043aPh/B167-LamLib, A551-SCF043aPh/B256-LamLib, A551-SCF043aPh/B379-LamLib, A375-SCF057aPh/B167-LamLib, A551-SCF057aPh/B256-LamLib та A551-SCF057aPh/B379-LamLib демонструють агоністичну активність стосовно CD137 людини у залежний від ATP та ADP спосіб.

Приклад 12: Вимірювання рівня позаклітинного ATP у ділянках пухлини

Свіч-антитіло, що налагоджується ATP, зв'язується з молекулою-мішенню у присутності ATP та демонструє ефективність як лікарський засіб. Оцінювання позаклітинного рівня ATP у ділянках пухлинної тканини виконували із застосуванням клітин P2Y11 split-Luc/HEK293. Клітини були виготовлені компанією ProbeX із застосуванням технології розщепленої люциферази. Клітини експресують C-кінцевий білок люциферази, зв'язаний з пуринергічним рецептором P2Y11 (Accession No. AF030335) з ATP як лігандом, та N-кінцевий білок люциферази, зв'язаний з ізоформою 1 β-арестину-2 (Accession No. NM_004313). Активна люцифераза утворюється шляхом поєднання двох фрагментів люциферази, які окремо присутні у клітинах, шляхом стимуляції за допомогою ATP, та можна отримати люмінесценцію, застосовуючи люциферин як субстрат.

(12-1) Реактивність клітин P2Y11 split-Luc/HEK293 на ATP

Клітини P2Y11 split-Luc/HEK293 культивували та зберігали у середовищі Ігла, модифікованому за Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose: D5796/Sigma-Aldrich), що містило 10 % зародкову бичачу сироватку, 0,8 мг/мл G418 (Geneticin™) та 0,05 мг/мл флеоміцин D1 (Zeocin™) для пасажу. Клітини P2Y11 split-Luc/HEK293 внесли у мікропланшет з 96 лунками (μCLEAR™, WHITE, CELLSTAR™/Greiner Bio-One) по 30000 клітин/лунку, культивували протягом ночі, а потім культуральний розчин видалили з кожної лунки та замінили 0,18 мл культурального розчину, що містив 0,5 мг/мл люциферин (VivoGlo™ Luciferin, In Vivo Grade /Promega). Для досягнення кінцевої концентрації у 0, 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 та 2,0 мМ додали 0,02 мл розчину аденозину, AMP, ADP або ATP та значення люмінесценції вимірювали на планшет-ридері EnVision (Perkin Elmer) через 30 хвилин після інкубації в інкубаторі з CO_2 (37 °C, 5 % CO_2).

Результати наведені на Фігурі 59. Клітини P2Y11 split-Luc/HEK293 підвищили свою люмінесценцію у специфічний від ATP спосіб в залежності від концентрації ліганду.

(12-2) Оцінювання концентрації позаклітинного ATP у ділянках пухлинних тканин

Клітини P2Y11 split-Luc/HEK293 відокремили від колб з культурою за допомогою буфера дисоціації клітин, вільного від ферментів, та PBS (Thermo Fisher Scientific), промили збалансованим сольовим розчином Хенка (HBSS), а потім створили суспензію клітин за допомогою HBSS, яку застосовували для вимірювання in vivo рівня позаклітинного ATP

(12-2-1) Створення in vivo калібрувальної кривої ATP

0,2 мл клітинної суспензії, що містила ATP у фіксованій концентрації, 1 мг/мл люциферин (VivoGlo, Promega) та 1,0x10^7 клітин/мл клітин P2Y11 split-Luc/HEK293, трансплантували підшкірно у черевну ділянку мишей C3H/HeN та через 20 хвилин здійснили вимірювання візуалізованої люмінесценції при анестезії ізофлураном із застосуванням пристрою для візуалізації in vivo, IVIS spectrum CT. Отримані за допомогою візуалізації зображення проаналізували за допомогою програмного забезпечення Living Image Software та отримали калібрувальну криву ATP з розрахованих значень люмінесценції та концентрації доданого ATP за умови вимірювання in vivo.

Фіг. 60 демонструє ці результати. Клітини P2Y11 split-Luc/HEK293 демонстрували залежну від концентрації ATP люмінесценцію навіть за умов in vivo, коли їх трансплантували підшкірно мишам C3H/HeN, що можна перетворити на калібрувальну криву для оцінювання рівнів ATP in vivo.

(12-2-2) Оцінювання рівня позаклітинного ATP у ділянках пухлинних тканин

0,2 мл клітинної суспензії, що містила 1 мг/мл люциферин (VivoGlo, Promega) та $1,0x10^7$ клітин/мл клітин P2Y11 split-Luc/HEK293, трансплантували підшкірно у ділянку пухлини мишей FM3A, які є носіями пухлини (об'єм пухлини 200-300 $мм^3$), та вимірювання візуалізованої люмінесценції виконували через 20 хвилин потому при анестезії ізофлураном за допомогою пристрою для візуалізації in vivo, IVIS spectrum CT. Отримані за допомогою візуалізації зображення проаналізували за допомогою програмного забезпечення Living Image Software, рівень ATP розрахували за значенням люмінесценції ділянки пухлини, застосовуючи калібрувальну криву ATP in vivo, та це визначили, як рівень позаклітинного ATP на ділянці пухлини.

Результати вимірювання візуалізованої люмінесценції наведено на Фіг. 61, а рівні позаклітинного ATP на ділянці пухлини, розраховані з калібрувальної кривої ATP, наведено у Таблиці 62. Рівень люмінесценції на ділянці пухлинної тканини (миша FM3A, що є носієм пухлини) був вищим, як порівняти з рівнем на первинній ділянці (здорова ділянка), і рівень позаклітинного ATP на ділянці пухлинної тканини трансплантаційної моделі FM3A розрахували, та у середньому він становив 1,31 мМ на отриманій калібрувальній кривій ATP in vivo.

Таблиця 62

Миша FM3A, що є носієм пухлини	1	2	3	Середнє ± стандартне відхилення
Позаклітинний ATP (мМ)	0,81	1,26	1,86	1,31±0,53

Приклад 13: Залежна від ATP протипухлинна активність антитіл проти hIL6R, які мають залежні від ATP властивості зв'язування

(13-1) Отримання антитіл проти hIL6R, які мають залежні від ATP властивості зв'язування

Посилаючись на методи, описані у WO2015/083764 та WO2013/180200, отримані антитіла оптимізували, щоб отримати антитіла проти рецептора інтерлейкіну 6 людини (hIL6R), які мають залежні від ATP властивості зв'язування. Важкі ланцюги та легкі ланцюги поєднали, як показано у Таблиці 63, щоб експресувати та очистити антитіла проти hIL6R за методом, відомим фахівцям у цій галузі.

Таблиця 63

Комбінації важких ланцюгів та легких ланцюгів антитіл

Назва антитіла	VH	CH	VL	CL
MRAH-G4T1/ MRAL-k0	MRAH SEQ ID NO: 190	G4T1 SEQ ID NO: 198	MRAL SEQ ID NO: 191	k0 SEQ ID NO: 199
H0002-G4T1/ L1058-lam1	H0002 SEQ ID NO: 192		L1058 SEQ ID NO: 193	lam1 SEQ ID NO: 189
H0041-G4T1/ L1088-lam1	H0041 SEQ ID NO: 194		L1088 SEQ ID NO: 195	
H0052-G4T1/ L1083-lam1	H0052 SEQ ID NO: 196		L1083 SEQ ID NO: 197	

hIL6R (SEQ ID NO: 200) генетично синтезували як антиген та вставили у плазміду, яка експресується тваринній клітині, а потім її ввели у клітини CHO, та, як наслідок, клонували стабільну експресувальну лінію (hIL6R-CHO), яка конститутивно експресує антиген. Антигенний білок експресували та очистили, застосовуючи метод, описаний нижче. Лінію hIL6R-CHO суспендували при відповідній щільності клітин, посіяли та культивували у колбах, а антиген очистили від культуральної надосадової рідини за методом, відомим фахівцям у цій галузі. Спектрофотометри застосовували для вимірювання поглинання при 280 нм розчину очищених антигенів. Концентрації очищених антигенів розрахували з отриманих значень вимірювання, застосовуючи коефіцієнти поглинання, розраховані за допомогою методу PACE [Protein Science (1995) 4, 2411-2423)].

(13-2) Розрахунок залежних від концентрації ATP значень KD антитіл проти hIL6R

Аналіз афінності стосовно hIL6R у присутності ATP при кожній з концентрацій у 0, 1, 10 та 100 мкМ здійснювали на Biacore T200, застосовуючи антитіла, наведені у Таблиці 63. Вимірювання виконували з витратою потоку 10 мкл/хв, тривалістю взаємодії у 1 хвилину, тривалістю дисоціації у 1 хвилину та кінетикою єдиного циклу при 37 °C. Як буфер

застосовували 20 мМ ACES, 150 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$ та 0,05 % Tween20, pH 7,4, який містив ATP у різних концентраціях (0, 1, 10 та 100 мкМ). Допоміжне програмне забезпечення Biacore Evaluation Software від Biacore T200 застосовували для аналізу та модель зв'язування 1:1 за Ленгмюром застосовували для моделі узгодження. Результати аналізу наведені у Таблиці 64 та на Фіг. 62.

Таблиця 64

Розрахунок залежних від концентрації ATP значень KD (M) антитіл проти hIL6R

Назва антитіла		Концентрація ATP (мкМ)			
		0	1	10	100
MRAH-G4T1/ MRAL-k0	Середнє	1,70E-08	1,88E-08	1,79E-08	1,80E-08
	Стандартне відхилення	3,81E-09	4,07E-09	4,08E-09	4,00E-09
H0002-G4T1/ L1058-lam1	Середнє	N.A.*	N.A.*	N.A.*	1,16E-06
	Стандартне відхилення	N.A.*	N.A.*	N.A.*	4,23E-07
H0041-G4T1/ L1088-lam1	Середнє	N.A.*	2,38E-06	3,20E-07	4,83E-08
	Стандартне відхилення	N.A.*	6,00E-07	7,45E-08	1,16E-08
H0052-G4T1/ L1083-lam1	Середнє	N.A.*	1,45E-06	5,05E-08	8,31E-09
	Стандартне відхилення	N.A.*	1,17E-06	1,41E-08	2,84E-09

* Зразки з коментарем "Кінетичні константи не можна визначити однозначно" в аналізі Biacore вважали непридатними, та результати позначені як "N.A."

Результати показали, що на KD антитіла MRAH-G4T1/MRAL-k0 стосовно hIL6R не впливала концентрація ATP в аналізі, однак KD антитіл H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1 H0052-G4T1/L1083-lam1 стосовно hIL6R стали меншими з підвищенням концентрації ATP в аналізі. Тобто, чим вищою була концентрація ATP в аналізі, тим сильнішою ставала зв'язувальна активність. Результати підтвердили, що H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1 та H0052-G4T1/L1083-lam1 мають залежну від ATP зв'язувальну активність стосовно hIL6R.

Далі у цьому описі антитіло, активність зв'язування якого з антигеном не залежить від концентрації ATP, таке як MRAH-G4T1/MRAL-k0, можна назвати антитілом, що не є свіч-антитілом, а антитіло, активність зв'язування якого з антигеном залежить від концентрації ATP, таке як H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1 та H0052-G4T1/L1083-lam1, можна назвати свіч-антитілом.

(13-3) Розрахунок залежних від концентрації ADP та AMP значень KD антитіл проти hIL6R

Антитіла, наведені у Таблиці 63, потім застосовували для здійснення аналізу афінності стосовно hIL6R у присутності 10 та 100 мкМ ADP або AMP, замість ATP, за допомогою Biacore T200 за умов, описаних вище. Результати аналізу вимірювання із застосуванням ADP наведено у Таблиці 65 та на Фіг. 63, а результати аналізу вимірювання із застосуванням AMP наведено у Таблиці 66 та на Фіг. 64. Антитіла з реакцією 10 RU або менше під час вимірювання вважали такими, які не можна проаналізувати, та вони позначені як N.D.

Таблиця 65

Розрахунок залежних від концентрації ADP значень KD (M) антитіл проти hIL6R

Назва антитіла	Концентрація ADP (мкМ)	
	10	100
MRAH-G4T1/MRAL-lam1	5,64E-09	5,96E-09
H0002-G4T1/L1058-lam1	N.D.	N.D.
H0041-G4T1/L1088-lam1	1,03E-05	2,96E-07
H0052-G4T1/L1083-lam1	5,81E-08	1,01E-08

Таблиця 66

Розрахунок залежних від концентрації AMP значень KD (M) антитіл проти hIL6R

Назва антитіла	Концентрація AMP (мкМ)	
	10	100
MRAH-G4T1/MRAL-lam1	5,33E-09	5,46E-09
H0002-G4T1/L1058-lam1	N.D.	N.D.
H0041-G4T1/L1088-lam1	N.D.	1,81E-06
H0052-G4T1/L1083-lam1	6,64E-06	1,18E-07

Результати показали, що на KD антитіла MRAH-G4T1/MRAL-k0 стосовно hIL6R не впливали концентрації ADP та AMP в аналізі, але, подібно до випадку із ATP, вищі концентрації ADP або AMP в аналізі супроводжувалися меншим KD антитіл H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1 та H0052-G4T1/L1083-lam1 стосовно hIL6R, тобто, сильнішою зв'язувальною активністю. Результати підтвердили, що H0002-G4T1/L1058-lam1, H0041-G4T1/L1088-lam1 та H0052-G4T1/L1083-lam1 мають залежну від ADP або AMP зв'язувальну активність стосовно hIL6R.

(13-4) Оцінювання залежної від концентрації ATP активності ADCC антитіл проти hIL6R

Антитіла отримали за способом, відомим фахівцям у цій галузі, шляхом заміни константних ділянок важкого ланцюга вищезазначених антитіл на mFa55 (SEQ ID NO: 184), у якій активність ADCC підсилена шляхом внесення модифікацій, що підсилюють зв'язування FcγRIV з mIgG2a, та заміни константної ділянки легкого ланцюга від людини на ділянку миші, як наведено у Таблиці 67. Крім того, як негативне контрольне антитіло отримали KLH-mFa55 (IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1).

Таблиця 67

Комбінації важких ланцюгів та легких ланцюгів антитіл

Назва антитіла	VH	CH	VL	CL
IC17HdK-mFa55/ IC17L-mk1	IC17HdK SEQ ID NO: 187	mFa55 SEQ ID NO: 184	IC17L SEQ ID NO: 188	mk1 SEQ ID NO: 185
MRAH-mFa55/ MRAL-mk0	MRAH SEQ ID NO: 190		MRAL SEQ ID NO: 191	mk0 SEQ ID NO: 211
H0002-mFa55/ L1058-ml0	H0002 SEQ ID NO: 192		L1058 SEQ ID NO: 193	ml0 SEQ ID NO: 212
H0041-mFa55/ L1088-ml0	H0041 SEQ ID NO: 194		L1088 SEQ ID NO: 195	
H0052-mFa55/ L1083-ml0	H0052 SEQ ID NO: 196		L1083 SEQ ID NO: 197	

Ці антитіла застосовували для оцінювання ADCC проти Hepa1-6 (hIL6R-Hepa1-6), мишачої лінії гепатоми, яка експресує повнорозмірний hIL6R (SEQ ID NO: 213), який отриманий за методами, відомими фахівцям у цій галузі, згідно з методами, описаними нижче.

Набір mFcγRIV ADCC Reporter Bioassay, Core Kit (Promega) застосовували для нижчеописаних вимірювань. До кожної лунки планшета з 96 лунками додали 100 мкл розчину hIL6R-Hepa1-6, приготовленого у середовищі зі щільністю $2x10^5$/мл, та планшет залишили стояти при 37 °C протягом 21 години. Як культуральне середовище застосовували 90 % DMEM, 10 % FBS, 600 мкг генетицину (Geneticin) та 500 мкг Зеоцину (Zeocin). Після того, як планшет центрифугували протягом 5 хвилин при 200 x g, 4 °C, відсмоктали надосадову рідину з кожної лунки. Розчин антитіл, наведених у Таблиці 67, розведених в аналітичному буфері до кінцевої концентрації 0,2 мкг/мл, розчин ATP, розведений в аналітичному буфері до кінцевої концентрації у 0, 1, 10 та 100 мкМ, та 25 мкл розчину, приготовленого шляхом додавання 0,69 мл допоміжних клітин-ефекторів з набору до 3,82 мл аналітичного буфера, змішали загалом до 75 мкл, та суміші додали до кожної лунки, та залишили стояти при 37 °C протягом 6 годин. Як аналітичний буфер застосовували 1,5 мл сироватки з низьким вмістом допоміжного IgG набору, до якої додали RPMI 1640 до 36 мл. Планшет потім залишили стояти при кімнатній температурі протягом 15 хвилин та до кожної лунки додали 75 мкл реагенту Bio-Glo. Bio-glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate) застосовували як реагент Bio-Glo. Люмінесценцію кожної лунки

потім вимірювали за допомогою планшет-ридера. Значення люмінесценції у кожній лунці, поділене на значення люмінесценції у лунці без додавання антитіла, відповідало кратності індукції, та воно застосовувалося як показник для оцінювання ADCC кожного антитіла.

Отримані результати наведені на Фіг. 65. На фігурі кратність індукції позначається як відносна світлова одиниця (RLU).

Результати цього аналізу показали, що на ADCC нон-свіч-антитіла MRAH-mFa55/MRAL-mk0 стосовно клітин, що експресують hIL6R, не впливає концентрація ATP, але ADCC свіч-антитіл H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0 ставала сильнішою з підвищенням концентрації ATP в аналізі. Результати підтвердили, що H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0 мають залежну від ATP цитотоксичну активність стосовно hIL6R.

(13-5) Оцінювання протипухлинної активності in vivo антитіл проти hIL6R

Коли підтвердили ADCC кожного антитіла, виконували тест для оцінювання протипухлинної активності цих антитіл in vivo, застосовуючи мишачу модель, що є носієм пухлини, мишей C57BL/6 з hIL6R-Hepa1-6 згідно з методами, описаними нижче.

Антитіло проти asialo GM1(anti-asialo GM1 antibody) (Wako Pure Chemical Industries) розчинили в 1 мл дистильованої води (Otsuka Pharmaceutical Factory) та потім розвели 4 мл PBS. Антитіло проти asialo GM1, приготовлене у такий спосіб, ввели інтраперитонеально 100 мишам C57BL/6 у дозі 0,1 мл на мишу. Через один день приготували змішаний розчин, у якому такий самий об'єм Matrigel Matrix (Corning) додали до клітинної суспензії hIL6R-Hepa1-6, суспендованої до $1x10^8$ клітин/мл у збалансованому сольовому розчині Хенка (Hanks' Balanced Salt) (Sigma). Змішаний розчин ввели підшкірно 100 мишам C57BL/6 у дозі 0,2 мл на мишу, та клітини були імплантовані. Діаметр пухлин вимірювали циркулями та об'єм пухлин визначили як: (головна вісь) x (мала вісь) x (мала вісь) x (1/2). Вимірювання діаметру пухлин виконували, не знаючи конкретний вміст розчину ліків, що вводився кожній миші. Діаметри пухлин та масу тіла 100 вищезгаданих мишей C57BL/6 вимірювали на 11-й день після трансплантації клітин. На основі цього значення здійснили рандомізацію мишей та мишей розділили загалом на п'ять груп: чотири групи по 10 тварин у кожній та одна група з 8 тварин; та кожна група отримала розчин антитіл, наведених у Таблиці 67, через хвостову вену. При цьому, група з 8 тварин отримала H0002-mFa55/L1058-ml0. Дозування (мл) введеного розчину антитіла становило (0,01 (мл/г)) x (маса тіла (г) кожної миші). Діаметри пухлин та маса тіла мишей C57BL/6, згрупованих, як описано вище, вимірювали у такий самий спосіб на 14-й, 18-й, 21-й та 25-й день після трансплантації. На 18-й день після трансплантації розчини антитіл, наведених у Таблиці 67, ввели відповідній групі через хвостову вену у дозі, визначеній за такою самою формулою розрахунку, як описано вище, на основі виміряних даних маси тіла. Розрахували середній об'єм пухлин у кожній групі, якій вводили антитіло, на кожний день вимірювання, та його застосовували як показник для оцінювання протипухлинної активності in vivo кожного антитіла.

Отримані результати наведені на Фіг. 66.

Згідно з вищеописаними результатами серед свіч-антитіл, для яких було підтверджено залежну від ATP ADCC, було підтверджено, що H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0 демонструють протипухлинну активність стосовно клітин, що експресують hIL6R, у такому самому ступені, що й MRAH-mFa55/MRAL-mk0, яке є нон-свіч-антитілом. Результати дозволяють припустити, що позаклітинний ATP біля пухлин був присутнім у концентрації на такому рівні, що дозволяв H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0 функціонувати подібно до MRAH-mFa55/MRAL-mk0.

Приклад 14: Оцінювання системних ефектів від антитіл проти hIL6R, які мають залежні від ATP властивості зв'язування

Для того, щоб оцінити ефекти від антитіл проти hIL6R, які мають залежні від ATP властивості зв'язування, в здорових тканинах звичайних мишей (C57BL/6) та трансгенних мишей, які системно надмірно експресують hIL6R (hIL6R-tgm) [Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1995 May 23; 92(11):4862-4866], застосовували для оцінювання кінетики антитіл у плазмі. Для цього оцінювання антитіла, наведені у Таблиці 67, ввели звичайним мишам (C57BL/6) та hIL6R-tgm та порівняли їхню кінетику у плазмі. Стосовно hIL6R-tgm повідомлялось, що звичайні антитіла, які зв'язуються з hIL6R, зникають через hIL6R мембранного типу шляхом зв'язування з hIL6R мембранного типу, що експресується системно [Nature Biotechnology volume 28, pages 1203-1207 (2010)].

2 мг/мл MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0 або H0052-mFa55/L1083-ml0 ввели внутрішньовенно звичайним мишам та hIL6R-tgm у єдиній дозі 10 мл/кг. У звичайних мишей кров узяли через 5 хвилин, 7, 24, 48, 72 та 168 годин після введення в усіх групах: в групі MRAH-mFa55/MRAL-mk0, групі H0002-mFa55/L1058-ml0, групі

H0041-mFa55/L1088-ml0 та групі H0052-mFa55/L1083-ml0. Для hIL6R-tgm кров узяли через 5 хвилин, 7, 24, 48, 52, 55, 72 та 168 годин після введення у групі MRAH-mFa55/MRAL-mk0 та через 5 хвилин, 7, 24, 48, 72 та 168 годин після введення в групі H0002-mFa55/L1058-ml0, групі H0041-mFa55/L1088-ml0 та групі H0052-mFa55/L1083-ml0. Отриману кров швидко центрифугували при 4 °C та 12000 обертів за хвилину протягом 10 хвилин та відокремили плазму. До початку вимірювання плазму зберігали у морозильнику, налаштованому на -20 °C або нижче.

Концентрацію кожного антитіла у плазмі вимірювали за методом електрохемілюмінесценції (ECL). Розчин hIL6R додали до планшета MULTI-ARRAY PR Plate [Meso Scale Diagnostics, LLCs], залишили стояти при 37 °C протягом однієї години, та hIL6R іммобілізувалися на планшеті. Для калібрувальної кривої MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0 приготували з концентрацією у плазмі у 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 та 0,125 мкг/мл; а H0002-mFa55/L1058-ml0 приготували з концентрацією у плазмі у 64, 32, 16, 8, 4, 2 та 1 мкг/мл. Після додавання розчину 1 M Tris-HCl, pH 8,0, що містив 0,05 % Tween20 та 1 % BSA, до планшета з іммобілізованим hIL6R швидко додали зразки плазми, розведені у 250 разів у 0,3 M розчині оцтової кислоти, а також зразки для калібрувальної кривої, а потім додали розчин ATP та перемішали. Після того, як планшет залишили стояти протягом години при кімнатній температурі, додали мічене біотином антитіло проти IgG миші (Southern Biotechnology Associates, Inc) та залишили стояти при кімнатній температурі протягом однієї години. Після цього додали стрептавідин, мічений міткою SULFO-TAG (SULFO-TAG Labeled Streptavidin) (Meso Scale Diagnostics, LLCs), залишили стояти при кімнатній температурі протягом однієї години, а потім додали буфер зчитування Read buffer T [Meso Scale Diagnostics, LLC] та реакцію вимірювали за допомогою пристрою для електрохімічної люмінесценції, SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics, LLC). SOFTmax PRO (Molecular Devices) застосовували для розрахунку концентрації кожного антитіла у плазмі мишей.

Концентрацію розчинного антигену у плазмі вимірювали за допомогою ECL. Зразки мишачої плазми, розведені у 50 разів, змішали з міченим SULFO-TAG (Meso Scale Diagnostics, LLC) антитілом проти IL6R людини (R&D Systems), міченим біотином антитілом проти IL6R людини (R&D Systems) та надмірною кількістю тоцилізумабу, антитілом проти IL6R людини (продукт власного виробництва), та суміш інкубували протягом ночі при 37 °C. Після того, як суміш додали до блокованого покритого стрептавідином стандартного планшета з 96 лунками (Meso Scale Diagnostics, LLC), а потім додали буфер зчитування, реакцію виміряли на SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics, LLC). SOFTmax PRO (Molecular Devices) застосовували, щоб розрахувати концентрації розчинного антигену у мишачій плазмі.

Результати порівняння рівнів MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0 у крові звичайних мишей та hIL6R-tgm наведені на Фіг. 67, Фіг. 68, Фіг. 69 та Фіг. 70, відповідно.

MRAH-mFa55/MRAL-mk0, нон-свіч антитіло, демонструвало швидшу елімінацію у hIL6R-tgm, у якій hIL6R системно експресується, як порівняти з елімінацією у звичайних мишей (Фіг. 67). Здається, що цей результат є наслідком того факту, що нон-свіч антитіло зв'язалося з hIL6R мембранного типу, який експресується у нормальних тканинах усього організму та зникає через hIL6R.

З іншого боку, помітно швидку втрату концентрації антитіла, таку як для нон-свіч-антитіла, як порівняти з втратою концентрації у звичайних мишей, не спостерігали для свіч-антитіл H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0 у hIL6R-tgm. Результати дозволяють припустити, що, на відміну від результату для нон-свіч-антитіла, свіч-антитіла не зв'язуються з hIL6R мембранного типу, що експресується системно, та вони не спричиняють опосередковану hIL6R елімінацію.

Якщо зробити порівняння для свіч-антитіл H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0, то тільки H0052-mFa55/L1083-ml0, що демонструє сильніше зв'язування при низьких концентрацій ATP, спричинило пришвидшену втрату антитіла у hIL6R-tgm, як порівняти зі звичайними мишами.

Результати дозволяють припустити, що концентрації позаклітинного ATP у нормальних тканинах є занадто низькими, щоб свіч-антитіла зв'язувалися з hIL6R.

Потім концентрації розчинного hIL6R у плазмі hIL6R-tgm порівняли після того, як ввели відповідні антитіла. Результати наведені на Фіг. 71.

Як порівняти з концентраціями розчинного hIL6R у мишей, що отримували ізотипне контрольне IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1, спостерігали, що концентрації розчинного hIL6R у мишей, що отримували нон-свіч антитіло MRAH-mFa55/MRAL-mk0, накопичувалися. Вважали, що це є наслідком зв'язування нон-свіч-антитіла з розчинною формою hIL6R, перешкоджаючи

при цьому нормальним метаболічним шляхам.

З іншого боку, ніякого суттєвого накопичення антигену, подібного до накопичення у випадку нон-свіч-антитіла, не спостерігали у мишей, що отримували свіч-антитіла H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0. Коли свіч-антитіла H0002-mFa55/L1058-ml0, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0 порівняли, то спостерігали тенденцію накопичення антигену для антитіл, які демонстрували сильніше зв'язування при низьких концентраціях ATP.

Результати дозволяють припустити, що концентрація позаклітинного ATP у нормальних тканинах та крові є занадто низькою для того, щоб свіч-антитіла зв'язувалися з мембранною та розчинною формами hIL6R.

Приклад 15: Одночасне оцінювання протипухлинних ефектів та системних ефектів антитіл проти hIL6R, які мають залежні від ATP властивості зв'язування

Протипухлинні ефекти та системні ефекти визначали одночасно, щоб при наявності пухлини оцінити системні ефекти антитіл проти hIL6R, які мають залежні від ATP властивості зв'язування. Для цього оцінювання застосовували модель hIL6R-tgm з трансплантованою hIL6R-Hepa1-6 та вводили антитіла, наведені у Таблиці 67.

Антитіло проти asialo GM1 (Wako Pure Chemical Industries) розчинили в 1 мл дистильованої води (Otsuka Pharmaceutical Factory), а потім розвели 4 мл PBS. Антитіло проти asialo GM1, приготовлене у такий спосіб, ввели інтраперитонеально 83 мишам hIL6R-tgm у дозі 0,1 мл на мишу. Через день після цього приготували змішаний розчин, у якому такий самий об'єм Matrigel Matrix (Corning) додали до клітинної суспензії hIL6R-Hepa1-6, суспендованих до $1x10^8$ клітин/мл у збалансованому сольовому розчині Хенка (Hanks' Balanced Salt) (Sigma). Змішаний розчин ввели підшкірно 83 мишам hIL6R-tgm у дозі 0,2 мл на мишу, та клітини були імплантовані. Діаметр пухлин мишей вимірювали циркулями, та об'єм пухлин визначили як: (головна вісь) x (мала вісь) x (мала вісь) x (1/2). Вимірювання діаметру пухлин виконували, не знаючи конкретний вміст розчину ліків, що вводився кожній миші. Діаметри пухлин та маси тіла 83 вищезгаданих мишей hIL6R-tgm вимірювали на 10-й день після трансплантації клітин. На основі цього значення здійснили рандомізацію мишей, та мишей розділили загалом на чотири групи по 10 тварин, при цьому кожна група отримала через хвостову вену розчин відповідного антитіла з чотирьох розчинів антитіл, наведених у Таблиці 67, за виключенням H0052-mFa55/L1083-ml0. Дозування (мл) введеного розчину антитіла становило (0,01 (мл/г)) x (маса тіла (г) кожної миші). Після цього діаметри пухлин та масу тіла мишей hIL6R-tgm, згрупованих, як описано вище, вимірювали у такий самий спосіб на 13-й, 17-й та 20-й день після трансплантації. На 17-й день після трансплантації розчини чотирьох антитіл з антитіл, наведених у Таблиці 67, за виключенням H0052-mFa55/L1083-ml0, ввели відповідним групам через хвостову вену у дозі, визначеній за такою самою формулою розрахунку, як описано вище, на основі виміряних даних маси тіла. Розрахували середній об'єм пухлин у кожній групі, якій вводили антитіло, на кожний день вимірювання, та його застосовували як показник для оцінювання протипухлинної активності in vivo кожного антитіла.

У вищеописаних експериментах кров збирали шляхом орбітального забору крові від hIL6R-tgm, розподілених на вищеописані групи, при анестезії ізофлураном, через одну годину, 1, 2, 3 та 7 днів після початкового введення розчинів антитіл. Зібрану кров перенесли до набору з 8 пробірок для окремого номера та залишили стояти на льоду. Після центрифугування наборів з восьми пробірок при 1900 x g протягом 10 хвилин при 4 °C надосадову рідину, що утворилася після центрифугування, отримали як компонент плазми та перенесли до іншого набору з восьми пробірок для окремого номера та зберігали при -30 °C.

Концентрацію кожного антитіла у плазмі вимірювали за методом електрохемілюмінесценції (ECL). Розчин hIL6R додали до планшета MULTI-ARRAY PR Plate [Meso Scale Diagnostics, LLCs], залишили стояти при 37 °C протягом однієї години, та hIL6R іммобілізувалися на планшеті. Для калібрувальної кривої MRAH-mFa55/MRAL-mk0 та H0041-mFa55/L1088-ml0 приготували з концентрацією у плазмі у 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 та 0,125 мкг/мл; а H0002-mFa55/L1058-ml0 приготували з концентрацією у плазмі 64, 32, 16, 8, 4, 2 та 1 мкг/мл. Після додавання розчину 1 M Tris-HCl, pH 8,0, що містив 0,05 % Tween20 та 1 % BSA, до планшета з іммобілізованим hIL6R швидко додали зразки плазми, розведені у 250 разів у 0,3 M розчині оцтової кислоти, а також зразки для калібрувальної кривої, а потім додали розчин ATP та перемішали. Після того, як планшет залишили стояти протягом години при кімнатній температурі, додали мічене біотином антитілом проти IgG миші (Southern Biotechnology Associates, Inc) та залишили стояти при кімнатній температурі протягом однієї години. Після цього додали стрептавідин, мічений міткою SULFO-TAG (SULFO-TAG Labeled Streptavidin) (Meso Scale Diagnostics, LLCs), та планшет залишили стояти при кімнатній температурі

протягом однієї години, а потім додали буфер Read buffer T (Meso Scale Diagnostics, LLC) та реакцію вимірювали за допомогою SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics, LLC). SOFTmax PRO (Molecular Devices) застосовували для розрахунку рівнів кожного антитіла у плазмі мишей.

Подібно до цього антитіло до asialo GM1 (Wako Pure Chemical Industries) розчинили в 1 мл дистильованої води (Otsuka Pharmaceutical Factory), а потім розвели 4 мл PBS. Антитіло проти asialo GM1, приготовлене у такий спосіб, ввели інтраперитонеально 91 миші hIL6R-tgm у дозі 0,1 мл на мишу. Через день після цього приготували змішаний розчин, у якому такий же об'єм Matrigel Matrix (Corning) швидко додали до клітин суспензії hIL6R-Hepa1-6, суспендованих при $1x10^8$ клітин/мл у збалансованому сольовому розчині Хенка (Hanks' Balanced Salt) (Sigma). Змішаний розчин ввели підшкірно 91 миші hIL6R-tgm у дозі 0,2 мл на мишу, та клітини були імплантовані. Діаметр пухлин мишей вимірювали циркулями, та об'єм пухлин визначили як: (головна вісь) x (мала вісь) x (мала вісь) x (1/2). Вимірювання діаметру пухлин виконували, не знаючи конкретний вміст розчину ліків, що вводився кожній миші. Діаметри пухлин та маси тіла 91 вищезгаданої миші hIL6R-tgm вимірювали на 10-й день після трансплантації клітин. На основі цього значення здійснили рандомізацію мишей, та мишей розділили загалом на чотири групи по 6 тварин, при цьому кожна група отримала через хвостову вену розчин відповідного антитіла з чотирьох розчинів антитіл, наведених у Таблиці 67, за виключенням H0002-mFa55/L1058-m10. Дозування (мл) введеного розчину антитіла розрахували як (0,01 (мл/г)) x (маса тіла (г) кожної миші). Після цього діаметри пухлин та масу тіла мишей hIL6R-tgm, згрупованих, як описується вище, вимірювали у такий самий спосіб на 13-й, 17-й та 20-й день після трансплантації. На 17-й день після трансплантації розчини чотирьох антитіл з антитіл, наведених у Таблиці 67, за виключенням H0002-mFa55/L1058-ml0, ввели відповідним групам через хвостову вену у дозі, визначеній за такою самою формулою розрахунку, як описано вище, на основі виміряних даних маси тіла. Розрахували середній об'єм пухлин у кожній групі, якій вводили антитіло, на кожний день вимірювання, та його застосовували як показник для оцінювання протипухлинної активності in vivo кожного антитіла.

У вищеописаних експериментах кров збирали шляхом орбітального забору крові від hIL6R-tgm, розподілених на вищеописані групи, при анестезії ізофлураном, через одну годину, 3 та 7 днів після початкового введення розчинів антитіл. Зібрану кров перенесли до набору з 8 пробірок для окремого номера та залишили стояти на льоду. Після центрифугування наборів з восьми пробірок при 1900 x g протягом 10 хвилин при 4 °C надосадову рідину, що утворилася після центрифугування, отримали як компонент плазми та перенесли до іншого набору з восьми пробірок для окремого номера та зберігали при -30 °C.

Концентрацію кожного антитіла у плазмі вимірювали за методом електрохемілюмінесценції (ECL). Розчин hIL6R додали до планшета MULTI-ARRAY PR Plate (Meso Scale Diagnostics, LLCs), залишили стояти при 37 °C протягом однієї години, та hIL6R іммобілізувалися на планшеті. Для калібрувальної кривої MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0 приготували з концентрацією у плазмі у 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 та 0,125 мкг/мл. Після додавання розчину 1 M Tris-HCl, pH 8,0, що містив 0,05 % Tween20 та 1 % BSA, до планшета з іммобілізованим hIL6R швидко додали зразки плазми, розведені у 250 разів у 0,3 M розчині оцтової кислоти, а також зразки для калібрувальної кривої, а потім додали розчин ATP та перемішали. Після того, як планшет залишили стояти протягом години при кімнатній температурі, додали мічене біотином антитіло проти IgG миші [Southern Biotechnology Associates, Inc] та залишили стояти при кімнатній температурі протягом однієї години. Після цього додали стрептавідин, мічений міткою SULFO-TAG (SULFO-TAG Labeled Streptavidin) (Meso Scale Diagnostics, LLCs), та планшет залишили стояти при кімнатній температурі протягом однієї години, а потім додали буфер Read buffer T (Meso Scale Diagnostics, LLC) та реакцію вимірювали за допомогою SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics, LLC). SOFTmax PRO (Molecular Devices) застосовували для розрахунку рівнів антитіла у плазмі мишей.

Концентрацію розчинного антигену у плазмі вимірювали шляхом ECL. Зразки мишачої плазми, розведені у 50 разів, змішали з міченим SULFO-TAG (Meso Scale Diagnostics, LLC) антитілом до IL6R людини (R&D Systems), міченим біотином антитілом проти IL6R людини (R&D Systems) та надмірною кількістю тоцилізумабу, антитілом до IL6R людини (продукт власного виробництва), та суміш інкубували протягом ночі при 37 °C. Після того, як суміш додали до блокованого покритого стрептавідином стандартного планшета з 96 лунками (Meso Scale Diagnostics, LLC), а потім додали буфер зчитування, реакцію виміряли на SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics, LLC). SOFTmax PRO (Molecular Devices) застосовували, щоб розрахувати концентрації розчинного антигену у мишачій плазмі.

Спочатку порівняли протипухлинні ефекти, концентрації антитіла у плазмі та концентрації антигену у плазмі для IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1, MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0002-mFa55/L1058-ml0 та H0041-mFa55/L1088-ml0. Результати наведено на Фіг. 72, 73 та 74, відповідно.

У цьому дослідженні, як порівняти з групою, яка отримувала ізотипне контрольне IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1, групи, що отримували MRAH-mFa55/MRAL-mk0 та H0002-mFa55/L1058-ml0, не демонстрували вищі швидкості інгібування росту пухлини (TGI). З іншого боку більше інгібування росту пухлини (TGI) спостерігалося у групі, що отримувала свіч-антитіло H0041-mFa55/L1088-ml0 (Фігура 72). Слабшу лікувальну ефективність спостерігали у групі мишей, що отримувала MRAH-mFa55/MRAL-mk0, як порівняти з групою, що отримувала H0041-mFa55/L1088-ml0, що дозволяє припустити, що MRAH-mFa55/MRAL-mk0 виводилося швидше, ніж H0041-mFa55/L1088-ml0, та воно було не спроможним підтримувати концентрацію на рівні, достатньому для демонстрації ефективності лікарського засобу (Фіг. 73).

Крім того, накопичення розчинного hIL6R не спостерігали у групі, яка отримувала H0002-mFa55/L1058-ml0. У групі, яка отримувала H0041-mFa55/L1083-ml0, накопичення розчинного hIL6R відбувалося у меншій кількості, ніж у групі, що отримувала MRAH-mFa55/MRAL-mk0 (Фіг. 74).

Далі, порівняли протипухлинні ефекти, концентрації антитіла у плазмі та концентрації антигену у плазмі для IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1, MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0. Результати наведено на Фіг. 75, 76 та 77, відповідно.

У цьому дослідженні, як порівняти з групою, яка отримувала ізотипне контрольне антитіло IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1, групи, що отримували MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0041-mFa55/L1088-ml0 та H0052-mFa55/L1083-ml0, демонстрували вищі швидкості інгібування росту пухлини (TGI) (Фігура 75). З іншого боку, при порівнянні їх концентрацій у плазмі, MRAH-mFa55/MRAL-mk0 демонструвало швидшу елімінацію, як порівняти з H0052-mFa55/L1083-ml0, та спостерігалися нижчі концентрації у крові (Фіг. 76).

Також, як порівняти з MRAH-mFa55/MRAL-mk0, H0052-mFa55/L1083-ml0 накопичувало тільки меншу кількість розчинного hIL6R (Фіг. 77).

Ці результати дозволяють припустити, що у мишей, які є носіями пухлин, свіч-антитіла мають подібні або сильніші протипухлинні ефекти, ніж нон-свіч-антитіла; але на відміну від нон-свіч-антитіл, свіч-антитіла не зв'язуються з hIL6R в здорових тканинах. Результати дозволяють припустити, що навіть при наявності раку концентрації позаклітинного ATP в здорових тканинах та крові недостатньо підвищені для того, щоб стимулювати зв'язування свіч-антитіл.

Приклад 16: Залежна від ATP нейтралізуюча активність антитіл проти PD1, що мають залежні від ATP властивості зв'язування

Важкі ланцюги та легкі ланцюги поєднали так, як показано у Таблиці 68, щоб експресувати та очищувати антитіла проти PD1 методами, відомими фахівцям у цій галузі.

Таблиця 68

Комбінації важких ланцюгів та легких ланцюгів антитіл

Назва антитіла	VH	CH	VL	CL
mPD1F2VH-mF18/ mPD1F2VL-mk1	mPD1F2VH SEQ ID NO: 201	mF18 SEQ ID NO: 203	mPD1F2VL SEQ ID NO: 202	mk1 SEQ ID NO: 185
H5029-mFa31/ L3021-ml0	H5029 SEQ ID NO: 204	mFa31 SEQ ID NO: 208	L3021 SEQ ID NO: 205	ml0 SEQ ID NO: 212
H5041-mFa31/ L3023-ml0	H5041 SEQ ID NO: 206		L3023 SEQ ID NO: 207	

Нейтралізуючу активність антитіл, наведених у Таблиці 68, стосовно взаємодії PDL1-PD1 оцінювали за методами, описаними нижче.

Спочатку для антигенів mPD1-G1CH2 (SEQ ID NO: 209) та mPDL1-G1dCH2His (SEQ ID NO: 210) генетично синтезували та вставили у плазміди, які експресуються у тваринних клітинах. Білки антигенів експресували та очищували за методами, описаними нижче. Отримані плазміди ввели за методом ліпофекції у лінію FreeStyle 293-F (Invitrogen), яка походить від клітин зародкової нирки людини, та яку суспендували у середовищі FreeStyle 293 Expression Medium (Invitrogen) з відповідною щільністю і посіяли у колбах. Антигени очищували від культуральних

надосадових рідин клітин, культивованих в інкубаторі з CO_2 (37 °C, 8 % CO_2, 125 обертів за хвилину) протягом чотирьох днів за способом, відомим фахівцям у цій галузі. Спектрофотометри застосовували для вимірювання поглинання при 280 нм розчинами очищених антигенів. Концентрації очищених антигенів розрахували із застосуванням коефіцієнтів поглинання, розрахованих за методом PACE [Protein Science (1995) 4, 2411-2423] з отриманих з вимірювань значень.

mPD1-G1CH2 (SEQ ID NO: 209), який є Fc-злитим мишачим PD1, розвели до 5 мкг/мл (55 нМ) за допомогою 0,1 М $NaHCO_3$, 0,05 % NaN_3 та додали 100 мкл розведеного розчину до планшета з 96 лунками, залишили стояти протягом ночі при 4 °C та іммобілізували на поверхнях планшета. Після того, як лунки промили тричі за допомогою TBS та 0,1 % Tween20, додали 250 мкл розчину BSA, розведеного TBS до 2 %, до кожної лунки, щоб блокувати поверхні планшета. Промивання потім виконували тричі. Змішали mPDL1-G1dCH2His (SEQ ID NO: 210), що є мишачим PDL1, злитим з Fc антитіла та His-міткою та розведеним у TBS до кінцевої концентрації 55 нМ; розчин антитіл, наведених у Таблиці 68 та розведених до кінцевих концентрацій 6,25, 1,56, 0,390, 0,0977, 0,0061 та 0 ммкг/мл; та розчин ATP, розведений до кінцевої концентрації 0, 1, 10 та 100 мкМ, загальний об'єм суміші становив 100 мкл. Суміш потім додали до кожної лунки та залишили стояти при 37 °C протягом однієї години. Кожну лунку потім промили тричі 0,1 % Tween20 та TBS, який приготували так, що він містив ATP у такій самій концентрації, що і концентрація ATP у розчинах, доданих до кожної лунки. mAb-HRP-Direct проти His-мітки (MBL Life Science) розвели у 10000 разів у блокувальному буфері, так щоб його розчин містил ATP у такій самій концентрації, що і концентрації ATP у розчинах, доданих до кожної лунки, при цьому по 100 мкл цього розчину додали до кожної лунки та залишили стояти при 37 °C протягом однієї години. Кожну лунку потім промили тричі 0,1 % Tween20 та TBS, який приготували так, що він містив ATP у такій самій концентрації, що і концентрація ATP у розчинах, доданих до кожної лунки. Потім 100 мкл розчину TMB додали до кожної лунки та планшет залишили стояти при 37 °C протягом однієї години, та додали 50 мкл 1М H_2SO_4 до кожної лунки, щоб припинити реакцію. Потім визначили поглинання для кожної лунки при 450 нм на ридері поглинання мікропланшетами (Wako Sunrise).

Значення поглинання лунки без антитіла при таких же концентраціях ATP визначили як 100 % зв'язування PD1-PDL1 та оцінили ступінь, до якої внаслідок додавання антитіла знизився відсоток зв'язування. Результати наведені на Фіг. 78 та 79.

Результати показали, що на нейтралізуючу активність mPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1 стосовно взаємодії PD1/PDL-1 не впливали концентрації ATP, у той час, як нейтралізуюча активність H5029-mFa31/L3021-ml0 та H5041-mFa31/L3021-ml0 ставала сильнішою за вищої концентрації ATP в аналізах. Результати підтвердили, що H5029-mFa31/L3021-ml0 та H5041-mFa31/L3021-ml0 мають залежну від ATP зв'язувальну активність та нейтралізуючу активність.

Систему аналізу люциферази (Promega) застосовували для вимірювання нейтралізуючої активності in vitro. Як ефекторну клітину застосовували hPDL1-CHO, що входять до набору PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay, Core Kit (Promega). Як клітини-мішені застосовували клітини Jurkat-NFAT-Luc2-mPD1 власного виробництва. По-перше, ген злитого білка позаклітинного mPD1 та внутрішньоклітинного hPD1 (SEQ ID NO: 214) ввели у клітини Jurkat-NFAT-Luc2 (Promega) за способом, відомим фахівцям у цій галузі, внаслідок чого отримали клітини Jurkat-NFAT-Luc2-mPD1. Взаємодію hPDL1 на hPDL1-CHO зі злитим білком позаклітинного mPD1 та внутрішньоклітинного hPD1 у Jurkat-NFAT-Luc2-mPD1 застосовували як взаємодію PD-1/PDL-1 для оцінювання нейтралізуючої активності in vitro.

До кожної лунки планшета з 96 лунками додали 100 мкл розчину hPDL1-CHO з набору, який приготували зі щільністю $4x10^5$ клітин/мл з використанням середовища, та планшет залишили стояти при 37 °C протягом ночі. Як культуральне середовище застосовували 90 % Ham's F-12, 10 % FBS, 250 мкг генетицину та 200 мкг гігроміцину. Відсмоктали надосадові рідини з кожної лунки та 20 мкл розчину антитіл, наведених у Таблиці 68 та розведених буфером для аналізу до кінцевої концентрації 7,5 мкг/мл, змішали з 20 мкл розчину AMP, розведеного буфером для аналізу до кінцевих концентрацій у 0, 10 та 100 мкМ, та 40 мкл розчину клітин NFAT-Luc2-hPD1-mPD1-Jurkat, приготовленого з використанням буфера для аналізу, так щоб досягти кількості клітин у 5×10^4 клітин/лунку. Суміш додали до кожної лунки та залишили стояти при 37 °C протягом чотирьох годин. Як буфер для аналізу застосовували 98 % RPMI 1640 та 2 % FBS. Планшети потім залишили стояти при кімнатній температурі протягом 10 хвилин та до кожної лунки додали 80 мкл реагенту Bio-Glo. Систему аналізу активності люциферази Bio-glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate) застосовували як реагент Bio-Glo. Люмінесценцію кожної лунки потім вимірювали за допомогою планшет-ридера.

Значення люмінесценції кожної лунки при кожній концентрації AMP, поділене на значення

люмінесценції лунки без антитіла, відповідало кратності індукції, та його застосовували як показник для оцінювання активності кожного антитіла стосовно нейтралізації взаємодії PD-1/PDL-1. Результати наведені на Фігурі 80. На Фігурі кратність індукції позначено як відносна світлова одиниця (RLU).

ATP також випробували у такий самий спосіб, що і AMP, та 100 мл hPDL1-CHO, приготовленого зі щільністю $4x10^5$ клітин/мл з використанням середовища, додали до кожної лунки планшета з 96 лунками, та планшет залишили на ніч при 37 °C. Як культуральне середовище застосовували 90 % Ham's F-12, 10 % FBS, 250 мкг генетицину та 200 мкг гігроміцину. Відсмоктали надосадові рідини з кожної лунки, та 20 мкл розчину антитіл, наведених у Таблиці 68 та розведених буфером для аналізу до кінцевої концентрації у 10 мкг/мл, змішали з 20 мкл розчину ATP, розведеного буфером для аналізу до кінцевих концентрацій 0, 12,5 та 125 мкМ, та 40 мкл розчину клітин NFAT-Luc2-hPD1-mPD1-Jurkat, приготовленого з використанням буфера для аналізу, так щоб досягти кількості клітин 5 x 10^4 клітин/лунку, та суміш додали до кожної лунки та залишили стояти при 37 °C протягом чотирьох годин. Як буфер для аналізу застосовували 98 % RPMI 1640, 2 % FBS. Планшети потім залишили при кімнатній температурі на 10 хвилин та до кожної лунки додали 80 мкл реагенту Bio-Glo. Bio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate) застосовували як реагент Bio-Glo. Люмінесценцію кожної лунки потім вимірювали за допомогою планшет-ридера.

Значення люмінесценції кожної лунки при кожній концентрації AMP, поділене на значення люмінесценції лунки без антитіла, відповідало кратності індукції, та його застосовували як показник для оцінювання активності кожного антитіла стосовно нейтралізації взаємодії PD-1/PDL-1. Результати наведені на Фіг. 81. На Фіг. кратність індукції позначено як відносна світлова одиниця (RLU).

Приклад 17: Залежна від ATP опосередкована ADCC протипухлинна активність антитіл проти PD1, які мають залежні від ATP властивості зв'язування

Важкі ланцюги та легкі ланцюги поєднали, як показано у Таблиці 69, щоб експресувати та очистити антитіла проти PD-1 за методами, відомими фахівцям у цій галузі.

Таблиця 69

Комбінації важких ланцюгів та легких ланцюгів антитіл

Назва антитіла	VH	CH	VL	CL
IC17HdK-mFa55/ IC17L-mk1	IC17HdK SEQ ID NO: 187	mFa55 SEQ ID NO: 184	IC17L SEQ ID NO: 188	mk1 SEQ ID NO: 185
mPD1F2VH-mFa55/ mPD1F2VL-mk1	mPD1F2VH SEQ ID NO: 201		mPD1F2VL SEQ ID NO: 202	
H5041-mFa55/ L3023-ml0	H5041 SEQ ID NO: 206		L3023 SEQ ID NO: 207	ml0 SEQ ID NO: 212

Константні ділянки важкого ланцюга цих антитіл модифікували до mFa55, яке мало підвищену ADCC активність шляхом внесення до mIgG2a модифікацій, що підвищують зв'язування з FcγRIV. Тому вважають за можливе застосувати ADCC активність до клітин, що експресують PD-1, та видалити клітини, що експресують PD-1. Антитіла застосовували для оцінювання протипухлинної активності in vivo та для аналізу елімінації клітин, що експресують PD-1, згідно з методами, описаними нижче.

Лінію раку прямої кишки мишей Colon38 (NCI) імплантували при $5x10^6$ з Matrigel (Corning) підшкірно у праву частину живота мишей C57BL/6J (Japan Charles River), внаслідок чого утворилися тверді пухлини. На чотирнадцятий день після імплантації ввели IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1 внутрівенно (i.v.) у дозі 15 мг/кг, mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1 у дозі 1,5, 5 та 15 мг/кг та H5041-mFa55/L3023-ml0 у дозі 25,5 та 100 мг/кг, відповідно (n=7 на групу). Крім того, на 17-й день після трансплантації група H5041-mFa55/L3023-ml0 отримала такі ж самі антитіла внутрішньовенно (i.v.) у дозі 25,5 та 100 мг/кг, відповідно. Як наслідок, спостерігали протипухлинний ефект в усіх групах, яким вводили антитіла, за виключенням негативної контрольної групи (Фігура 82).

Елімінацію клітин, що експресують PD1, у пухлинній тканині після введення відповідних антитіл оцінювали шляхом потокової цитометрії. Твердим пухлинам Colon38 дозволили утворитися, як описується вище, та на 14-й день після імплантації ввели IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1 (ізотипне, контрольне) внутрішньовенно (i.v.) у дозі 15 мг/кг, mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-

mk1 у дозі 1,5, 5 та 15 мг/кг та H5041-mFa55/L3023-ml0 у дозі 25,5 та 100 мг/кг, відповідно (n=3 на групу). Селезінку та пухлинні тканини кожної миші узяли через три дні після введення антитіла. Селезінки подрібнили за допомогою пінцетів, додали RPMI 1640 з доданим 10 % FBS та центрифугували при 400 x g протягом 5 хвилин, після чого видалили надосадову рідину. Додали 2 мл буфера для лізису ACK Lysing Buffer [Thermo Fisher Scientific] та після того, як суміш залишили стояти при кімнатній температурі протягом 2,5 хвилини, гемолізований зразок застосовували як клітини селезінки для аналізу за допомогою потокової цитометрії. Пухлинну тканину подрібнили за допомогою ножиців з наступним додаванням ферментів згідно з протоколом Tumor Dissociation Kit (Miltenyi) та далі подрібнили за допомогою помірного гомогенізатора MACS Dissociator (Miltenyi Biotec). З доданим RPMI-1640, до якого була додана 10 % FBS, її центрифугували при 400 x g протягом 5 хвилин, та видалили надосадову рідину, та застосовували для аналізу за допомогою потокової цитометрії як клітини пухлини. Клітини селезінки та клітини пухлини перенесли до чашки з V-подібним дном (Corning), центрифугували при 400xg протягом 5 хвилин та видалили надосадову рідину. Клітини знов суспендували у 100 мкл блокувального реагенту FcR (Miltenyi Biotec), розведеного у 10 разів у PBS (буфер FACS), що містив 1 % FBS та 2 мМ EDTA (Sigma). Після інкубування клітин при кімнатній температурі протягом 10 хвилин додали до кожної лунки 0,4 мкл BUV737 Anti-Mouse CD3e (BD), 0,1 мкл Zombie Aqua (Biolegend), 0,4 мкл PerCP/Cy5.5 Anti-Mouse CD8a (Biolegend), 0,4 мкл PE/Cy7 Anti-Mouse CD4 (Biolegend), 0,2 мкл APC-R700 Anti-mouse CD45 (BD), 0,4 мкл FITC anti-human/mouse/rat CD278 (Biolegend), 0,4 мкл APC/Fire™ 750 anti-mouse CD25 (Biolegend) та 0,4 мкл APC anti-mouse CD279 (Biolegend), про які було підтверджено, що вони не конкурують з кожним з введених антитіл проти PD1, та додали буфер FACS по 20 мкл/лунку. Після інкубування протягом 30 хвилин при 4 °C додали 100 мкл буфера FACS, центрифугували при 400 x g протягом 5 хвилин та видалили надосадову рідину. На основі протоколу з набору Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) змішали концентрат для фіксації/пермеабілізації (Fixation/Permeabilization Concentrate) та розріджувач для фіксації/пермеабілізації (Fixation/Permeabilization Diluent) та до кожної лунки додали 200 мкл суміші. Після інкубування при 4 °C протягом 30 хвилин та центрифугування при 400 x g протягом 5 хвилин видалили надосадову рідину. Додали 200 мкл буфера для пермеабілізації та після центрифугування при 400 x g протягом 5 хвилин видалили надосадову рідину. Процедуру промивання здійснювали іще раз. До кожної лунки додали 0,4 мкл eFluor450 Anti-Mouse/Rat Foxp3(eBioscience) та 0,4 мкл PE Anti-Mouse CD152 (BD), а буфер FACS додали по 20 мкл/лунку. Після інкубування при 4 °C протягом 30 хвилин додали 100 мкл буфера FACS та після центрифугування при 400 x g протягом 5 хвилин видалили надосадову рідину. До кожної лунки додали по 200 мкл буфера для пермеабілізації та після центрифугування при 400 x g протягом 5 хвилин видалили надосадову рідину. Зразки знов суспендували з 200 мкл буфера FACS та виміряли на потоковому цитометрі FACS Fortessa (BD). Для аналізу експресії застосовували програмне забезпечення FlowJo. CD4-позитивні клітини піддали сортуванню на популяцію клітин, які слід проаналізувати, щоб проаналізувати експресію Foxp3 та PD1. Рівень експресії PD1 у популяції клітин $CD4^{+}Foxp3^{-}$ розрахували з інтенсивності флюоресценції. Як наслідок, рівень експресії PD1 як у клітинах селезінки, так і у клітинах пухлини мав тенденцію знижуватися у групах, яким вводили 5 та 15 мг/кг mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1, але у групах, яким вводили 25,5 та 100 мг/кг H5041-mFa55/L3023-ml0, рівень експресії PD1 мав тенденцію знижуватися тільки у клітинах пухлини (Фіг. 83A та B). Було підтверджено, що усі свіч-антитіла, які зв'язуються з PD1 у залежний від ATP спосіб, демонстрували лікарську ефективність проти пухлини, при цьому системна реакція (зниження рівня експресії PD1) не відбувалася, та було підтверджено, що свіч-антитіла мали властивість демонструвати специфічну активність у пухлинній ділянці.

Приклад 18: Аналіз кристалічної структури антитіл, які зв'язуються з hIL6R та які мають залежні від ATP властивості зв'язування

Виконали рентгенівський кристалографічний аналіз комплексу ATP, позаклітинного домену hIL6R (shIL6R) та фрагмента Fab отриманого у Прикладі 13 антитіла H0041L1088, що зв'язується з рецептором IL6 людини (hIL6R) (є налагоджуваним за допомогою ATP).

(18-1) Отримання повнорозмірних антитіл H0041L1088

Отримання та очищення повнорозмірних антитіл H0041L1088 (VH: SEQ ID NO: 194; CH: SEQ ID NO: 217, VL: SEQ ID NO: 195, CL: SEQ ID NO: 189), які мають формат IgG1 людини, виконували за методами, відомими фахівцям у галузі.

(18-2) Отримання фрагментів H0041L1088 Fab

Зразок повнорозміного антитіла H0041L1088 фрагментували на Fab та Fc, застосовуючи папаїн (SIGMA-ALDRICH, 10108014001) за умови 35 °C, приблизно 18 годин, а потім піддали

очищенню на колонці на 1 мл HiTrap SP HP (GE Healthcare) та 1 мл HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare), та очищенню шляхом SEC (ексклюзійна хроматографія за розміром) із застосуванням 200 пг HiLoad 16/600 Superdex (GE Healthcare), внаслідок чого отримали зразки Fab.

(18-3) Отримання shIL6R

На основі амінокислотної послідовності UniProtKB: P08887 (IL6RA_HUMAN) (SEQ ID NO: 213) її домени 2 та 3 (амінокислоти 111-320) генетично синтезували та включили у вектори експресії. Для генного синтезу сигнальну послідовність для експресії секреції додали на N-кінці, мітку FLAG tag+His x 8 міток додали на C-кінці для очищення та внесли модифікацію C193S для усунення недосконалості пар Cys-Cys, яка стала результатом видалення домену 1. Експресію білка із застосуванням Expi293™ Expression System (Thermo Fisher Scientific) здійснювали у присутності Kifunensine (Santa Cruz Biotechnology) із застосуванням отриманих плазмід експресії та отримали надосадову рідину культурального середовища експресії, яка містила білок, що представляє інтерес. З цього отримали зразок shIL6R шляхом афінного очищення із застосуванням 5 мл колонки cOmplete™ His-Tag Purification Column (SIGMA-ALDRICH), а також шляхом очищення SEC із застосуванням 200 пг HiLoad 16/600 Superdex (GE Healthcare).

(18-4) Отримання потрійного комплексу H0041L1088 Fab-shIL6R-ATP

До зразка shIL6R додали ендоглікозидазу (Endoglycosidase) F1(EndoF1) для розщеплення цукрового ланцюга N-типу та ентерокіназу (Enterokinase) (SIGMA-ALDRICH, 11334115001) для розщеплення His x 8 tag, та після цього залишили стояти при кімнатній температурі протягом одного дня, здійснили обробку за допомогою 1 мл HisTrap EXCEL 1 (GE Healthcare) та очищення за допомогою SEC із застосуванням Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare). Після додавання зразка H0041L1088 Fab отриману очищену фракцію збагатили шляхом ультрафільтрації та очищення за допомогою SEC з використанням Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) із застосуванням як буфера 20 мМ HEPES, pH 7,3, 100 мМ NaCl, 0,5 мМ ATP, внаслідок чого отримали зразки комплексу (Complex). Зразки комплексу для кристалізації отримали шляхом збагачення ультрафільтрацією отриманих очищених фракцій.

(18-5) Отримання кристалів потрійного комплексу H0041L1088 Fab-shIL6R-ATP

Кристалізацію за методом дифузії пари у сидячій краплі здійснювали за умови 21 °C, застосовуючи зразки комплексу для кристалізації, та отримали кристали, придатні для рентгенівського кристалографічного аналізу, за умов резервуару: 20 мМ Tris, pH 7,5, 12,0 % мас/об поліетиленгліколь 1500 (Polyethylene glycol 1500), 60 мМ амонію сульфат.

(18-6) Вимірювання даних рентгенівської дифракції з кристалів потрійного комплексу H0041L1088 Fab-shIL6R-ATP та визначення структур кристалів

Отримані кристали занурили у розчин 68 мМ Tris, pH 7,5, 13,6 % мас/об поліетиленгліколь 1500 [Polyethylene glycol 1500], 68 мМ амонію сульфат, 14,6 % етиленгліколь (Ethylen Glycol) та 0,375 мМ ATP, а потім заморозили у рідкому азоті. Дані рентгенівської дифрактометрії вимірювали в установці радіаційного опромінювання Photon Factory BL-17A Науково-дослідної організації прискорювачів високих енергій (High Energy Accelerator Research Organization). Під час вимірювання кристали постійно розташовували під потоком азоту з температурою -178 °C, щоб підтримувати їх у замороженому стані. Отримані дифракційні зображення обробили із застосуванням autoPROC [Acta Cryst. D67:293-302 (2011)] та отримали дані інтенсивності дифракції при розділенні аж до 2,76 ангстрема.

Застосовуючи отримані дані інтенсивності рентгенівської дифракції початкову структуру визначили за методом молекулярного заміщення, застосовуючи Phaser [J. Appl. Cryst. (2007) 40,658-674], застосовуючи як моделі пошуку кристалічні структури відомого Fab та shIL6R PDB ID=1N26. Після цього повторили побудову моделі та уточнення за coot [Acta Cryst. D66: 486-501 (2010)] та refmac5 [Acta Cryst. D67: 355-367 (2011)], а також phenix.refine [Acta Cryst. D68: 352-367 (2012)], внаслідок чого отримали кінцеві уточнені координати. Статистику кристалографії наведено у Таблиці 70. Зауважте, що серед координат кристалічної структури, номери залишків амінокислот у Fab наведені згідно зі схемою номенклатури Кебота, а номери залишків амінокислот в антигені, shIL6R, наведені так, що вони відповідають номерам залишків амінокислот UniProtKB: P08887 (IL6RA_HUMAN). Хоча в асиметричних одиницях цього кристалу існують два комплекси, спеціалізовану димеризацію, яка називається обмін доменами, спостерігали у домені 2 shIL6R. Такі димери не виявили у кристалічних структурах shIL6R PDB ID=1N26, що робить їх унікальними для конструкцій shIL6R, які застосовуються у цьому винаході.

Таблиця 70

< Дані вимірювання >

Довжина хвилі вимірювання (ангстрем)	0,98
Кількість виміряних кристалів	1
Просторова група	C222
Константа комірки	
a b c (ангстрем)	103,043 185,612 52,085
$\alpha\ \beta\ \gamma$ (°)	90,00 90,00 90,00
Кількість комплексів в асиметричній одиниці	2
Розділення (ангстрем)	90,09 – 2,757 (2,86 – 2,76)
Кількість відображень, що спостерігаються / Кількість унікальних відображень	508114 / 38008
Надмірність	13,37 (13,66)
Повнота (завершеність) (%)	99,99 (100,00)
Відношення сигнал-шум інтенсивності дифракції	18,9 (3,1)
Rзлиття	0,106 (0,868)
< Уточнення >	
Rробоче / Rвільне	0,1923 / 0,2656
Кількість атомів	9244
Інші, відмінні від води молекули	9181
Молекули води	63
RMSD (середнє квадратичне відхилення) від теоретичного значення	
Відстань зв'язку (ангстрем)	0,008
Кут зв'язку (°)	1,05
Карта Рамачандрана	
Переважна ділянка (%)	95,95
Дозволена ділянка (%)	3,72
Недозволена ділянка (%)	0,34
Значення у дужках – це значення при граничному розділенні	

(18-7) Взаємодія між H0041L1088 та ATP

Як показано на Фіг. 84, ATP розпізнається здебільшого важким ланцюгом антитіла. Конкретно, складова аденінового кільця ATP розпізнається кожним бічним ланцюгом CDR1 важкого ланцюга антитіла: T33, CDR3 важкого ланцюга антитіла: Y95, L98, N100B та W100C, та кожним основним ланцюгом G96, L100A та W100C. Зокрема, водневі зв'язки утворюються між карбонільним киснем остову G96 та L100A та NH_2 позиції-6 ATP, та між амідною групою NH остову W100C та N позиції 1 ATP; та взаємодії, такі як CH-pi (π) та π-π, утворюються між бічними ланцюгами Y95, L98 та W100C і складовою аденінового кільця. Антитіло впевнено розпізнає складову аденінового кільця ATP. Рибозна складова розпізнається ван-дер-ваальсовими взаємодіями відповідними бічними ланцюгами CDR1 важкого ланцюга: T33, та CDR2 важкого ланцюга: H56 та Y58. Складова трифосфорної групи розпізнається бічними ланцюгами CDR2 важкого ланцюга: S52, S52A, Y55 та H56, та основним ланцюгом S52A та Q53. Зокрема, бічний ланцюг S52 та бічний ланцюг S52A, а також група NH основного ланцюга та група NH основного ланцюга Q53 утворюють щільну мережу водневого зв'язку зі складовою трифосфорної групи, яка відіграє ключові ролі у розпізнаванні складової трифосфорної групи.

(18-8) Взаємодія між H0041L1088 та hIL6R

На основі цієї кристалічної структури амінокислотні залишки shIL6R, що містили один або більше атомів, які не є воднем та які розташовані на відстані у межах 4,2 ангстрема від або H0041L1088 Fab, або ATP, вибрали як епітопні залишки, та вони показані на амінокислотній послідовності shIL6R (Фіг. 85). Деталі взаємодій цих епітопних залишків з антитілом показані на Фіг. 86 та 87. Ці епітопні залишки утворюють ван-дер-ваальсові взаємодії, водневий зв'язок, електростатичні взаємодії тощо із залишками CDR1 легкого ланцюга: D27B, G28, D29, A31 та Y32, та CDR3 легкого ланцюга: R91, S92, P93, G94 та P95, та CDR2 важкого ланцюга: H56 та Y58, та CDR3 важкого ланцюга: L98, Y99, N100B та W100C антитіла; та вони щільно зв'язані з антитілом.

(18-9) Механізм залежного від ATP зв'язування з антигеном

Крім того, у зв'язуванні Fab антитіла H0041L1088 з shIL6R, як показано на Фігурах 86 та 87, великий міжмолекулярний контакт утворюється між F298 shIL6R та ATP, який зв'язується з Fab антитіла H0041L1088. Оскільки ця взаємодія втрачається, коли ATP знаходиться у незв'язаному стані, передбачають, що ця пряма взаємодія між антигеном та ATP, який зв'язується з Fab антитіла H0041L1088, є головним фактором у залежному від ATP зв'язуванні. Стосовно структурних аспектів вважають, що ATP сприяє структурній стабілізації CDR3 важкого ланцюга через водневий зв'язок та ван-дер-ваальсові взаємодії із залишками CDR3 важкого ланцюга. Вважають, що внаслідок стабілізації структури CDR3 важкого ланцюга у його зв'язаній з антигеном формі внаслідок зв'язування аденозинтрифосфатом відбувається значне зміцнення прямої взаємодії CDR3 важкого ланцюга: L98 або Y99, з shIL6R, що, у свою чергу, сприяє залежному від ATP зв'язуванню.

Приклад 19: Підсилення агоністичної активності модифікованими антитілами проти CD137

(19-1) Отримання антитіл для оцінювання

Стосовно випадку, коли різні амінокислотні модифікації для підвищення pI були внесені у константну ділянку важкого ланцюга з підвищеною активністю зв'язування з FcγRIIb, оцінили вплив таких амінокислотних модифікацій на агоністичну активність стосовно CD137 та на кінетику у плазмі і на лікувальну ефективність у мишей hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90. По-перше, як описано у Прикладі 7-1, Прикладі 7-2 та Прикладі 7-3, приготували антитіла A375-MY201aPh/B167-Lamlib, A375-SCF041aPh/B167-Lamlib, A375-SCF057aPh/B167-Lamlib та IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0.

(19-2) Оцінювання in vitro залежної від ATP агоністичної активності стосовно CD137 модифікованих антитіл проти CD137 людини шляхом аналізу з використанням репортерного гена 4-1BB Jurkat

Стосовно випадку, коли різні амінокислотні модифікації для підвищення pI були внесені у константну ділянку важкого ланцюга з підвищеною активністю зв'язування з FcγRIIb, з метою визначити вплив таких амінокислотних модифікацій на агоністичну активність CD137, оцінили агоністичну активність стосовно CD137 антитіл A375-MY201aPh/B167-Lamlib, A375-SCF041aPh/B167-Lamlib, A375-SCF057aPh/B167-Lamlib та IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0.

Лінію клітин GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat (Promega, CS196004) застосовували для вимірювання активності in vitro отриманих антитіл. До кожної лунки планшета з 96 лунками додали 200 мкл FcγRIIB CHO-K1 Cells (Promega), приготовлених зі щільністю $5x10^4$ клітин/мл з культуральним середовищем, та планшет залишили стояти протягом ночі в інкубаторі з 5 % CO_2 при 37 °C. Культуральне середовище CHO (90 % Ham's F12, 10 % FBS) застосовували як культуральне середовище. Далі, усе культуральне середовище видалили шляхом всмоктування, а потім до кожної лунки додали 25 мкл лінії клітин GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat, приготовлених зі щільністю 2 x 10^6 клітин/мл з середовищем для аналізу (99 % RPMI, 1 % FBS). Далі, 25 мкл розчину кожного антитіла, розведеного у середовищі для аналізу, додали при кінцевій концентрації 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 та 10 мкг/мл. Нарешті додали 25 мкл розчину ATP, розведеного середовищем для аналізу до кінцевої концентрації 250 мкМ. Планшет залишили стояти протягом 6 годин в інкубаторі з 5 % CO_2 при 37 °C, а потім залишили стояти протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та до кожної лунки додали 75 мкл реагенту Bio-Glo. Систему Bio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate) застосовували як реагент Bio-Glo. Після цього відносну світлову одиницю кожної лунки визначили за допомогою планшет-ридера. Значення люмінесценції кожної лунки, поділене на значення люмінесценції лунки без додавання антитіла, визначили як "відносну світлову одиницею" та її застосовували як показник для оцінювання агоністичної активності стосовно CD137 кожного антитіла.

Отримані результати наведені на Фігурі 88. Результати показали, що агоністична активність стосовно CD137 підвищується внаслідок внесення різних амінокислотних модифікацій для підвищення pI.

(19-3) Дослідження фармакокінетики модифікованих антитіл проти CD137 людини у мишей

(19-3-1) Отримання миші hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90

По-перше, отримали мишей з нокіном CD137 людини, у яких ген CD137 миші замінили геном CD137 людини шляхом введення вектора заміщення гена CD137 людини у мишачі ембріональні стовбурові клітини (клітини ES) разом з Zinc Finger Nuclease (ZFN), яка уражає CD137 миші. Далі, мРНК ZFN, яка уражає ген Fcgr2b миші, ввели шляхом мікроін'єкції у запліднені яйцеклітини та мишей з нокіном Fcgr2b миші отримали шляхом відбору тих мишей, яким внесли мутацію у ділянку-мішень. Далі, вектор BAC, у якому клонували ген FCGR2B людини, ввели шляхом мікроін'єкції у мишачі запліднені яйцеклітини та внаслідок відбору з отриманих мишей

тих мишей, яким ввели геномну ділянку гена FCGR2B людини, отримали трансгенну мишу з геном FCGR2B людини [Iwayanagi. et al., J Immunol, 2015, 195, 3198-3205].

Шляхом схрещування вищезгаданих трьох ліній отримали "трансгенну мишу з геном FCGR2B людини, з нокаутом Fcgr2b і з нокіном CD137 людини". Цю мишу позначили як миша hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90.

(19-3-2) Вимірювання концентрації антитіла проти CD137 людини у плазмі у мишачій моделі hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90

Відповідні антитіла проти CD137 людини ввели внутрівенно у єдиній дозі мишам CD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90, як показано у Таблиці 71. Кров брали неодноразово протягом часу від 5 хвилин до 28 днів після введення. Отриману кров центрифугували, щоб отримати плазму. До вимірювання плазму зберігали у морозильнику, налаштованому на нижче -20 °C.

Таблиця 71

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза [мг/кг]
1	3	A375-MY201aPh/ B167-Lamlib	7,5 Єдине введення
2	3	A375-SCF041aPh/ B167-Lamlib	7,5 Єдине введення

Концентрацію кожного антитіла проти CD137 людини вимірювали за методом електрохемілюмінесценції (ECL). hCD137 (Sino Biological Inc.) розвели PBS(-) та додали до планшета з 96 лунками MULTI-ARRAY (Meso Scale Diagnostics, LLC). Планшет, до якого додали hCD137, струшували протягом 1 години при кімнатній температурі, та hCD137 іммобілізувався на планшеті. Для блокування потім додали розчин PBS, що містив 1 мМ ADP, 1 % BSA та 0,05 % Tween-20, та планшет струшували протягом 1 години при кімнатній температурі. Калібрувальні криві для відповідних антитіл проти CD137 людини приготували при концентраціях у плазмі у 640, 320, 160, 80, 40, 20 та 10 нг/мл. Зразки плазми, розведені у розчині PBS, що містив 1 мМ ADP, 1 % BSA та 0,05 % Tween-20, та зразки для калібрувальних кривих додали до планшета з іммобілізованим hCD137. Планшет потім струшували протягом 1 години при кімнатній температурі, а потім як вторинне антитіло додали антитіло, яке описано у WO 2019112027 та яке специфічно розпізнає константні ділянки антитіл проти CD137 людини. Планшет далі струшували протягом 1 години при кімнатній температурі, а потім до нього додали мічене міткою SULFO-TAG антитіло козла проти кроля [SULFO-TAG Labeled Goat Anti-Rabbit Antibody] [Meso Scale Diagnostics, LLC]. Планшет далі струшували протягом 1 години при кімнатній температурі, а потім до нього додали буфер Read buffer T [Meso Scale Diagnostics, LLC], який розвели удвічі та який містив 1 мМ ADP. Концентрацію кожного антитіла у мишачій плазмі вимірювали шляхом виявлення SULFO-TAG за допомогою SECTOR Imager [Meso Scale Diagnostics, LLC]. Концентрацію кожного антитіла у мишачій плазмі розрахували, застосовуючи SOFTmax PRO (Molecular Devices).

Результати наведені на Фіг. 89. A375-SCF041aPh/B167-Lamlib показало швидшу елімінацію, ніж A375-MY201aPh/B167-Lamlib. Вважають, що це є наслідком того, що у константну ділянку важкого ланцюга A375-SCF041aPh/B167-Lamlib внесені амінокислотні модифікації, які підвищують pI.

(19-4) Оцінювання лікувальної ефективності модифікованих антитіл проти CD137 людини у миші

(19-4-1) Отримання клітинних ліній та сингенної пухлинної мишачої моделі з трансплантованою лінією

Як клітини застосовували клітинну лінію клону C5 LLC1/OVA/GPC3 (LLC1/OVA/GPC3), отриману шляхом введення плазмід експресії для овальбуміну курча (OVA) та Glypican-3 (GPC3) людини у клітинну лінію LLC1, що походить від клітин раку легеня мишей [LL/2 (alias: LLC1), дистриб'ютор: ATCC, номер за каталогом: CRL-1642]. Як мишу застосовували мишу hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90 (віком 11 тижнів, самка), описану вище у (19-3-1). Клітинну лінію LLC1/OVA/GPC3 зберігали та піддали пасажу у середовищі RPMI1640 (Sigma-Aldrich, Co. LLC.), що містило 9,8 % Fetal Bovine Serum (зародкову бичачу сироватку) (Sigma-Aldrich, Co. LLC.), 0,44 мг/мл G418 (Nacalai Tesque, Inc.) та 0,88 мг/мл Zeocin (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Клітинну лінію LLC1/OVA/GPC3 трансплантували підшкірно у живот миші та вважали, що модель утворилася, коли об'єм пухлини досягнув приблизно 250-500 мм^3. Після того, як утворилася модель, мишей, яким трансплантували клітинну лінію LLC1/OVA/GPC3, розподілили

по групах та потім їм ввели носій та відповідні антитіла проти CD137 людини.

(19-4-2) Отримання та введення призначених для введення фармацевтичних агентів та вимірювання пухлини

A375-MY201aPh/B167-Lamlib або A375-SCF041aPh /B167-Lamlib, які були приготовлені у дозах, наведених у Таблиці 72, з PBS, що містив 0,05 % Tween-20, ввели у модель, якій трансплантували клітинну лінію LLC1/OVA/GPC3, на 11-й день та на 14-й день після трансплантації пухлини. PBS, що містив 0,05 % Tween-20, ввели групі з носієм. Отриману рідину для введення ввели у дозі 10 мл/кг через хвостову вену.

Таблиця 72

Вимірювання протипухлинного ефекту у моделі, якій трансплантували клітинну лінію LLC1/OVA/GPC3

Група	Кількість тварин	Фармацевтичний агент	Доза	Спосіб введення	День введення
1	5	PBS, що містив 0,05 % Tween-20	-	Хвостова вена	11-й день та 14-й день після трансплантації
2	5	A375-MY201aPh/ B167-Lamlib	2,50 мг/кг	Хвостова вена	11-й день та 14-й день після трансплантації
3	5	A375-SCF041aPh/ B167-Lamlib	2,50 мг/кг	Хвостова вена	11-й день та 14-й день після трансплантації

Для оцінювання протипухлинного ефекту об'єм пухлини вимірювали з частотою від 1 до 2 разів на тиждень. Об'єм пухлини розрахували за наступним рівнянням.

Об'єм пухлини ($мм^3$) = довжина (мм) x ширина (мм) x ширина (мм)/2

Як наслідок, результати Прикладу (19-3-2) показали, що зміна концентрації у крові у мишей, яким ввели A375-SCF041aPh/B167-Lamlib, була меншою, як порівняти з концентрацією A375-MY201aPh/B167-Lamlib; але A375-SCF041aPh/B167-Lamlib демонструвало сильніший протипухлинний ефект, ніж A375-MY201aPh/B167-Lamlib (Фіг. 90).

На основі вищеописаних результатів щодо цієї мишачої моделі вважають, що протипухлинний ефект антитіла проти CD137 людини підвищився внаслідок внесення до константної ділянки важкого ланцюга амінокислотних модифікацій, які підвищують pI.

Приклад 20: Підсилення агоністичної активності модифікованими антитілами проти CD137 людини

Досліджували підвищення агоністичної активності антитіла проти CD3 шляхом поєднання амінокислотних модифікацій для підвищення pI та константної ділянки важкого ланцюга з підвищеною зв'язувальною активністю стосовно FcγRIIb.

Застосовували SCF057aPh, що отримали шляхом внесення амінокислотної модифікації Q311R/P343R для підвищення pI до MY201aPh, та MY201aPh, які є константними ділянками важкого ланцюга з підвищеною активністю зв'язування стосовно FcγRIIb, отриманими у Прикладі 7-1. Крім того, як константну ділянку нативного IgG1 людини застосовували G1T6 (SEQ ID NO: 223). Відповідні антитіла проти CD3 людини отримали шляхом застосування TR01H113 (SEQ ID NO: 224) як варіабельної ділянки важкого ланцюга; MY201aPh, SCF057aPh або G1T6 як константних ділянок важкого ланцюга та L0011-k0 (SEQ ID NO: 225) як легкого ланцюга антитіл проти CD3 людини. IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0 застосовували як негативне контрольне.

Аналіз активації Т-клітин Bioassay (NFAT) (Promega, CS176401) застосовували для вимірювання активності in vitro отриманих антитіл. До кожної лунки планшета з 96 лунками додали 200 мкл клітин FcγRIIB CHO-K1 (Promega), приготовлених зі щільністю $5x10^4$ клітин/мл з культуральним середовищем, та планшет залишили стояти протягом ночі в інкубаторі з 5 % CO_2 при 37 °C. Культуральне середовище CHO (90 % Ham's F12, 10 % FBS) застосовували як культуральне середовище. Далі, усе культуральне середовище видалили шляхом всмоктування, а потім до кожної лунки додали 25 мкл клітин NFAT-RE-Luc2, приготовлених зі щільністю $2x10^6$ клітин/мл з середовищем для аналізу (99 % RPMI, 1 % FBS). Далі 25 мкл розчину кожного антитіла, розведеного середовищем для аналізу, додали при кінцевій концентрації 0, 0,0001, 0,001, 0,01, 1 та 10 мкг/мл. Планшет залишили стояти протягом 6 годин в

інкубаторі з 5 % CO_2 при 37 °C, а потім залишили стояти протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та до кожної лунки додали 75 мкл реагенту Bio-Glo. Систему Bio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate) застосовували як реагент Bio-Glo. Після цього відносну світлову одиницею кожної лунки визначили за допомогою планшет-ридера. Значення люмінесценції кожної лунки, поділене на значення люмінесценції лунки без додавання антитіла, визначили як "відносну світлову одиницею" та її застосовували як показник для оцінювання агоністичної активності стосовно CD3 кожного антитіла.

Результати наведені на Фіг. 91. Як порівняти з TR01H113-G1T6/L0011-k0, що має константну ділянку нативного IgG1 людини, то TR01H113-MY201aPh/L0011-k0, яке має підсилене зв'язування з FcγRIIb, продемонструвало вищу агоністичну активність стосовно CD3. TR01H113-SCF057aPh/L0011-k0, в яке були внесені амінокислотні модифікації, що підвищують pI, продемонструвало вищу агоністичну активність стосовно CD3, як порівняти з TR01H113-MY201aPh/L0011-k0, яким воно було перед внесенням амінокислотних модифікацій.

Промислова придатність

Описані антигензв'язувальні молекули проти CD137 та методи їх застосування можна використовувати для розробки, виробництва, постачання та застосування фармацевтичних препаратів, яким притаманний ефект активації імунних клітин, цитотоксичний ефект або протипухлинний ефект, але які мають низький вплив на непухлинні тканини, такі як здорові тканини, та незначні побічні ефекти.

Джерела інформації:

Перелік цитувань

Патентні документи

Патентний документ 1-WO2013/180200

Непатентні документи

Непатентний документ 1-Hanahan, Cell, 2011, 144, 646-74
Непатентний документ 2-Prieto, Clin Cancer Res. 2012, 18, 2039-47
Непатентний документ 3-Hamid, Expert Opin. Biol. Ther., 2013, 6, 847-61
Непатентний документ 4-Summers, Nat Rev Immunol, 2012, 12, 339-51
Непатентний документ 5-Vinay, Cellular & Molecular Immunology, 2011, 8, 281-284
Непатентний документ 6-Houot, Blood, 2009, 114, 3431-8
Непатентний документ 7-Ascierto, Semin Oncol, 2010, 37, 508-16
Непатентний документ 8-Dubrot, Cancer Immunol Immunother, 2010, 59, 1223-33
Непатентний документ 9-Schabowsky, Vaccine, 2009, 28, 512-22
Непатентний документ 10-Li, Proc Natl Acad Sci U S A. 2013, 110(48), 19501-6.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ЧУГАІ СЕЙЯКУ КАБУСІКІ КАЙСЯ (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)

<120> АНТИГЕНЗВ'ЯЗУВАЛЬНА МОЛЕКУЛА ПРОТИ CD137 ТА ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> C1-A1821P

<150> JP 2018-152126
<151> 2018-08-10

<160> 225

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 255
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

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

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

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

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250 255

<210> 2
<211> 164
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp
1 5 10 15

Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser
20 25 30

Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly
35 40 45

Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys
50 55 60

Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys
65 70 75 80

Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys
85 90 95

Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg
100 105 110

Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly
115 120 125

Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser
130 135 140

Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly
145 150 155 160

His Ser Pro Gln

<210> 3
<211> 256
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3

Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val
1 5 10 15

Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln
20 25 30

Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro
35 40 45

Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys
50 55 60

Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr
65 70 75 80

His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro
85 90 95

Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr
100 105 110

Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn
115 120 125

Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg
130 135 140

Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro

145 150 155 160

Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu
165 170 175

Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala
180 185 190

Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe
195 200 205

Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln
210 215 220

Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser
225 230 235 240

Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Glu Leu
245 250 255

<210> 4
<211> 165
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln Pro Gly Thr Phe Cys Arg
1 5 10 15

Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro Pro Ser Thr Phe Ser Ser
20 25 30

Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys Arg Val Cys Ala Gly Tyr
35 40 45

Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr His Asn Ala Glu Cys Glu
50 55 60

Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro Gln Cys Thr Arg Cys Glu
65 70 75 80

Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr Lys Gln Gly Cys Lys Thr
85 90 95

Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn Gly Thr Gly Val Cys Arg
100 105 110

Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg Ser Val Leu Lys Thr Gly
115 120 125

Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro Pro Val Val Ser Phe Ser
130 135 140

Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu Gly Gly Pro Gly Gly His
145 150 155 160

Ser Leu Gln Val Leu
165

<210> 5
<211> 254
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 5

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Leu Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Ser Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

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

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly
85 90 95

Ala Glu Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Ala Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Phe Phe Leu Ala
180 185 190

Leu Thr Ser Thr Val Val Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Val Leu Arg
195 200 205

Phe Ser Val Val Lys Arg Ser Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
210 215 220

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
225 230 235 240

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250

<210> 6
<211> 165
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 6

Ser Leu Gln Asp Leu Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp
1 5 10 15

Asn Asn Arg Ser Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser
20 25 30

Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly
35 40 45

Val Phe Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys
50 55 60

Asp Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly Ala Glu Cys Ser Met Cys
65 70 75 80

Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys
85 90 95

Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg
100 105 110

Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly
115 120 125

Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser
130 135 140

Pro Gly Ala Ser Ser Ala Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly
145 150 155 160

His Ser Pro Gln Ile
165

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 7

Thr Phe Thr Met Asn
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 8

Ser Ile Ser Ser Lys Ser Thr Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe Lys
1 5 10 15

Val

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 9

Ser Ile Ser Ser His Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe Lys
1 5 10 15

Val

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 10

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 11

Ser Ile Ser Ser Lys Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe Lys
1 5 10 15

Val

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 12

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe Lys
1 5 10 15

Leu

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 13

Ser Ile Ser Ser Lys Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 14

Ser Ile Ser Ser Lys Gly Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Glu Gln Phe Lys
1 5 10 15

Val

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 15

Ser Ile Ser Ser Lys Gly Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Glu Ser Phe Lys
1 5 10 15

Val

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 16

Ser Ile Ser Ser Lys Gly Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe Lys
1 5 10 15

Val

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 17

Tyr Gly Ala Lys Asn Phe Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 18

Tyr Gly Pro Lys Asn Glu Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 19

Tyr Gly Lys Lys Asn Glu Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 20

Tyr Gly Ile Lys Asn Glu Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 21

Thr Gly Thr Arg Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Glu Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 22

Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 23

Thr Gly Thr Arg Thr Asp Val Gly Phe Tyr Glu Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 24

Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr Glu Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 25

Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Tyr Tyr Glu Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 26

Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser
1 5

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 27

Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu His Gln Val Ser
1 5 10

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 28

Ser Ser Tyr Arg Tyr Pro His Ile Val Ser
1 5 10

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 29

Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu Ala Gln Val Ser
1 5 10

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa може бути Lys, His або Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa може бути Ser або Gly

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa може бути Thr або Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa може бути Glu або Tyr

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Xaa може бути Asp або Glu

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> Xaa може бути Ser або Gln

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> Xaa може бути Val, Gly або Leu

<400> 30

Ser Ile Ser Ser Xaa Xaa Xaa Tyr Ile Xaa Tyr Ala Xaa Xaa Phe Lys
1 5 10 15

Xaa

<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa може бути Ala, Pro, Lys або Ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa може бути Phe або Glu

<400> 31

Tyr Gly Xaa Lys Asn Xaa Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa може бути Arg або Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa може бути Tyr або Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa може бути Tyr або Phe

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> Xaa може бути Glu або Asn

<400> 32

Thr Gly Thr Xaa Xaa Asp Val Gly Xaa Tyr Xaa Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa може бути Glu або Pro

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa може бути His або Ala

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa може бути Gln або Ile

<400> 33

Ser Ser Tyr Arg Tyr Xaa Xaa Xaa Val Ser
1 5 10

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 34

Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 35
<211> 30
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 35

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

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

<210> 36
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 36

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

<210> 37
<211> 32
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 37

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 38

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 39
<211> 22
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 39

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys
20

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 40

Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 41

<211> 32
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 41

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser
1 5 10 15

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

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 42

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 43
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 43

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Ser Thr Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe
50 55 60

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 44
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 44

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser His Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe
50 55 60

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

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

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

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

<210> 45
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 45

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe
50 55 60

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

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

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

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

<210> 46
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 46

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe
50 55 60

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

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

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

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

<210> 47
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 47

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Ser Thr Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe
50 55 60

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

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

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

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

<210> 48
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 48

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe
50 55 60

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

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

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

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

<210> 49
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 49

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Phe
50 55 60

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

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

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

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

<210> 50
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 50

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Gly Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Glu Gln Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Lys Lys Asn Glu Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 51
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 51

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Gly Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Glu Ser Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Ile Lys Asn Glu Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 52
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 52

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Gly Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe
50 55 60

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

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Ile Lys Asn Glu Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 53
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 53

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Lys Gly Ser Tyr Ile Glu Tyr Ala Glu Gln Phe
50 55 60

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

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

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

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

<210> 54
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 54

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

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

Glu Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
85 90 95

His Gln Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 55
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 55

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
85 90 95

His Gln Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 56
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 56

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

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

Glu Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

His Ile Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 57
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 57

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

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

Glu Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
85 90 95

Ala Gln Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 58
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 58

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Arg Thr Asp Val Gly Phe Tyr

20 25 30

Glu Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
85 90 95

His Gln Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 59
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 59

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

Glu Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
85 90 95

His Gln Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 60
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 60

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Tyr Tyr
20 25 30

Glu Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
85 90 95

His Gln Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 61
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 62
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 63
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

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

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

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 64
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 64

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Arg Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 65
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 66
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 66

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 67
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 67

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 68

<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 68

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 69
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 69

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 70
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 70

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

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

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

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

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

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

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

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

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

130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 71
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 71

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 72
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 72

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 73
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 73

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

245 250 255

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 74
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 74

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 75
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 75

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 76
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 76

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 77
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 77

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 78
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 78

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 79
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 79

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 80
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 81
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 81

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 82
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 82

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 83
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 84
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 84

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 85
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 85

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

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

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 86
<211> 15
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 86

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

<210> 87
<211> 212
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 87

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

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

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

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

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln His His His His His His
180 185 190

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile
195 200 205

Glu Trp His Glu
210

<210> 88
<211> 641

<212> PRT
<213> Людський гаммагерпесвірус типу 4

<400> 88

Met Ser Asp Glu Gly Pro Gly Thr Gly Pro Gly Asn Gly Leu Gly Glu
1 5 10 15

Lys Gly Asp Thr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Gln
20 25 30

Arg Arg Gly Gly Asp Asn His Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
35 40 45

Arg Gly Gly Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro
50 55 60

Arg His Arg Asp Gly Val Arg Arg Pro Gln Lys Arg Pro Ser Cys Ile
65 70 75 80

Gly Cys Lys Gly Thr His Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly
85 90 95

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly
100 105 110

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly
115 120 125

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala
130 135 140

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
145 150 155 160

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly
165 170 175

Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly
180 185 190

Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly
195 200 205

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala
210 215 220

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala
225 230 235 240

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
245 250 255

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
260 265 270

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly
275 280 285

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly

290 295 300

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly
305 310 315 320

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly
325 330 335

Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly
340 345 350

Arg Arg Gly Arg Gly Arg Glu Arg Ala Arg Gly Gly Ser Arg Glu Arg
355 360 365

Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Glu Lys Arg Pro Arg Ser Pro
370 375 380

Ser Ser Gln Ser Ser Ser Ser Gly Ser Pro Pro Arg Arg Pro Pro Pro
385 390 395 400

Gly Arg Arg Pro Phe Phe His Pro Val Gly Glu Ala Asp Tyr Phe Glu
405 410 415

Tyr His Gln Glu Gly Gly Pro Asp Gly Glu Pro Asp Val Pro Pro Gly
420 425 430

Ala Ile Glu Gln Gly Pro Ala Asp Asp Pro Gly Glu Gly Pro Ser Thr
435 440 445

Gly Pro Arg Gly Gln Gly Asp Gly Gly Arg Arg Lys Lys Gly Gly Trp
450 455 460

Phe Gly Lys His Arg Gly Gln Gly Gly Ser Asn Pro Lys Phe Glu Asn
465 470 475 480

Ile Ala Glu Gly Leu Arg Ala Leu Leu Ala Arg Ser His Val Glu Arg
485 490 495

Thr Thr Asp Glu Gly Thr Trp Val Ala Gly Val Phe Val Tyr Gly Gly
500 505 510

Ser Lys Thr Ser Leu Tyr Asn Leu Arg Arg Gly Thr Ala Leu Ala Ile
515 520 525

Pro Gln Cys Arg Leu Thr Pro Leu Ser Arg Leu Pro Phe Gly Met Ala
530 535 540

Pro Gly Pro Gly Pro Gln Pro Gly Pro Leu Arg Glu Ser Ile Val Cys
545 550 555 560

Tyr Phe Met Val Phe Leu Gln Thr His Ile Phe Ala Glu Val Leu Lys
565 570 575

Asp Ala Ile Lys Asp Leu Val Met Thr Lys Pro Ala Pro Thr Cys Asn
580 585 590

Ile Arg Val Thr Val Cys Ser Phe Asp Asp Gly Val Asp Leu Pro Pro
595 600 605

Trp Phe Pro Pro Met Val Glu Gly Ala Ala Ala Glu Gly Asp Asp Gly

610 615 620

Asp Asp Gly Asp Glu Gly Gly Asp Gly Asp Glu Gly Glu Glu Gly Gln
625 630 635 640

Glu

<210> 89
<211> 399
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 89

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys
165 170 175

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
180 185 190

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
195 200 205

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
210 215 220

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
225 230 235 240

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
245 250 255

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
260 265 270

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
275 280 285

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
290 295 300

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
305 310 315 320

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
325 330 335

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
340 345 350

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
355 360 365

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
385 390 395

<210> 90
<211> 442
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 90

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

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

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

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

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Asp Ile Glu Gly Arg Met
180 185 190

Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
195 200 205

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
210 215 220

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
225 230 235 240

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
245 250 255

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
260 265 270

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
275 280 285

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
290 295 300

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
305 310 315 320

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
325 330 335

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
340 345 350

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
355 360 365

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
370 375 380

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
385 390 395 400

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
405 410 415

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile
420 425 430

Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
435 440

<210> 91
<211> 347
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 91

Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Met Leu Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Lys Asp Asn Thr Val
20 25 30

Pro Leu Lys Leu Ile Ala Leu Leu Ala Asn Gly Glu Phe His Ser Gly
35 40 45

Glu Gln Leu Gly Glu Thr Leu Gly Met Ser Arg Ala Ala Ile Asn Lys
50 55 60

His Ile Gln Thr Leu Arg Asp Trp Gly Val Asp Val Phe Thr Val Pro
65 70 75 80

Gly Lys Gly Tyr Ser Leu Pro Glu Pro Ile Gln Leu Leu Asn Ala Lys
85 90 95

Gln Ile Leu Gly Gln Leu Asp Gly Gly Ser Val Ala Val Leu Pro Val
100 105 110

Ile Asp Ser Thr Asn Gln Tyr Leu Leu Asp Arg Ile Gly Glu Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Asp Ala Cys Ile Ala Glu Tyr Gln Gln Ala Gly Arg Gly Arg
130 135 140

Arg Gly Arg Lys Trp Phe Ser Pro Phe Gly Ala Asn Leu Tyr Leu Ser
145 150 155 160

Met Phe Trp Arg Leu Glu Gln Gly Pro Ala Ala Ala Ile Gly Leu Ser
165 170 175

Leu Val Ile Gly Ile Val Met Ala Glu Val Leu Arg Lys Leu Gly Ala
180 185 190

Asp Lys Val Arg Val Lys Trp Pro Asn Asp Leu Tyr Leu Gln Asp Arg
195 200 205

Lys Leu Ala Gly Ile Leu Val Glu Leu Thr Gly Lys Thr Gly Asp Ala
210 215 220

Ala Gln Ile Val Ile Gly Ala Gly Ile Asn Met Ala Met Arg Arg Val

225 230 235 240

Glu Glu Ser Val Val Asn Gln Gly Trp Ile Thr Leu Gln Glu Ala Gly
245 250 255

Ile Asn Leu Asp Arg Asn Thr Leu Ala Ala Met Leu Ile Arg Glu Leu
260 265 270

Arg Ala Ala Leu Glu Leu Phe Glu Gln Glu Gly Leu Ala Pro Tyr Leu
275 280 285

Ser Arg Trp Glu Lys Leu Asp Asn Phe Ile Asn Arg Pro Val Lys Leu
290 295 300

Ile Ile Gly Asp Lys Glu Ile Phe Gly Ile Ser Arg Gly Ile Asp Lys
305 310 315 320

Gln Gly Ala Leu Leu Leu Glu Gln Asp Gly Ile Ile Lys Pro Trp Met
325 330 335

Gly Gly Glu Ile Ser Leu Arg Ser Ala Glu Lys
340 345

<210> 92
<211> 442
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 92

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Leu Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Ser Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

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

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly
85 90 95

Ala Glu Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Ala Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Asp Ile Glu Gly Arg Met
180 185 190

Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
195 200 205

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
210 215 220

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
225 230 235 240

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
245 250 255

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
260 265 270

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
275 280 285

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
290 295 300

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
305 310 315 320

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
325 330 335

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
340 345 350

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
355 360 365

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
370 375 380

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
385 390 395 400

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
405 410 415

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile
420 425 430

Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
435 440

<210> 93
<211> 328
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 93

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 94
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 94

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ala His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Gly Leu Lys Asn Phe Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 95
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 95

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Gly Met Lys Asn Lys Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 96
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 96

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Thr Tyr Ala Thr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Leu Lys Asn Ser Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 97
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 97

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Thr Lys Asn Ser Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu

260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 98
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 98

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Gly Lys Lys Asn Tyr His Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 99
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 99

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Gly Ile Lys Asn His Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 100
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 100

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Thr Tyr Ala Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Lys Lys Asn Met Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 101
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 101

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Gly Leu Lys Asn Ser Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 102
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 102

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

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

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly His Lys Asn Met His Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 103
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 103

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

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

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Gly Leu Lys Asn Glu Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 104
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 104

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Ile Lys Asn Glu Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 105
<211> 452
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 105

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Arg Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Gly Lys Asn Ile Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 106
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 106

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

85 90 95

Ala Arg Phe Gly Lys Lys Asn Asp Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 107
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 107

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Gly Val Lys Asn Asn Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 108
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 108

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ala Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Ala Lys Asn Val Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 109
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 109

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Ala Lys Asn Phe Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys

450

<210> 110
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 110

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Gly Leu Lys Asn Glu Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 111
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 111

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Gly Gly Lys Asn Asn Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 112
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 112

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ala Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Ala Lys Asn Glu Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 113
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 113

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Gly Thr Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Ala Gln Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 114
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 114

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

Thr Val Asn Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Asn Leu Leu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 115
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 115

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

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

Glu Ser Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 116
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 116

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Lys Asn Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 117
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 117

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

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

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 118
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 118

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Thr Ile Val Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 119
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 119

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Tyr Arg Tyr Arg
85 90 95

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

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 120
<211> 216
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 120

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Ser Gly Ala
85 90 95

Ser Ile Leu Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 121
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 121

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Tyr Arg Tyr Asp
85 90 95

Gln Asn Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 122
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 122

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 123
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 123

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Leu Gly Val Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 124
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 124

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Thr His Val Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 125
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 125

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Glu Ser Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 126
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 126

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Glu Tyr Ile
85 90 95

Glu Ser Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 127
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 127

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Lys Asn Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 128
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 128

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

His Gln Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 129
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 129

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Ala Leu Leu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 130
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 130

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Glu Tyr Ile
85 90 95

Glu Ser Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 131
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 131

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Gln Gln Leu Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 132
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 132

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 133
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 133

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
85 90 95

His Gln Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 134
<211> 450
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 134

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Glu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro
450

<210> 135
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 135

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
85 90 95

His Gln Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 136
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 136

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Lys Glu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 137
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 137

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Thr Ser Lys Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Arg Tyr Glu
85 90 95

His Gln Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 138
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 138

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 139
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 139

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

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

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

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

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

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

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

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 140
<211> 109
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 140

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 141
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 141

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 142
<211> 116
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 142

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 143
<211> 108
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 143

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 144
<211> 324
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 144

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro
100 105 110

Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
115 120 125

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
130 135 140

Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
145 150 155 160

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
165 170 175

Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
180 185 190

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
210 215 220

Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
225 230 235 240

Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val
245 250 255

Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
260 265 270

Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
275 280 285

Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
290 295 300

Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 145
<211> 324
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 145

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro
100 105 110

Glu Val Ser Asp Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
115 120 125

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
130 135 140

Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
145 150 155 160

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
165 170 175

Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
180 185 190

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
210 215 220

Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
225 230 235 240

Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val
245 250 255

Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln

260 265 270

Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
275 280 285

Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
290 295 300

Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 146
<211> 324
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 146

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Glu Pro Asn
100 105 110

Glu Val Glu Asp Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
115 120 125

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
130 135 140

Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
145 150 155 160

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
165 170 175

Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
180 185 190

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asp Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
210 215 220

Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
225 230 235 240

Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val
245 250 255

Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
260 265 270

Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
275 280 285

Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
290 295 300

Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 147
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 147

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
100 105

<210> 148
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 148

Gly Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro
35 40 45

Val Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu
65 70 75 80

Arg His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val
85 90 95

Glu Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser
100 105

<210> 149
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 149

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Ile Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 150
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 150

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Tyr Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 151
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 151

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

325

<210> 152
<211> 116
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 152

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gln Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Tyr Ser Glu Thr Arg Leu 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

Ala Leu Tyr Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 153
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 153

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 154
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 154

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

325

<210> 155
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 155

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 156
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 156

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Leu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Thr Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 157
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 157

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Trp Asn Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Lys Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 158
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 158

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Ser Phe Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys
100 105

<210> 159
<211> 325
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 159

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu
325

<210> 160
<211> 319
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 160

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
65 70 75 80

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
85 90 95

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
100 105 110

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
115 120 125

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

130 135 140

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
145 150 155 160

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
165 170 175

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
180 185 190

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
195 200 205

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
210 215 220

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
225 230 235 240

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
245 250 255

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
260 265 270

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
275 280 285

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser
290 295 300

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
305 310 315

<210> 161
<211> 451
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 161

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Glu Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Phe Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Met Val His Pro Ile Glu Gly Trp Ala Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Pro Val Phe Cys Cys Pro Arg Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 162
<211> 451
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 162

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Gly Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Leu Phe Pro Ile Ser Ser Gln Ala Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Pro Val Asp Tyr Val Pro His Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 163
<211> 451
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 163

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Trp Phe Ser Tyr Tyr
20 25 30

Met Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile Val Pro Ile Asn Gly Ala Ala Gln Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Pro Val Trp Arg Thr Pro Arg Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala

325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 164
<211> 451
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 164

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Asp Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Phe Ile Asn Pro Ile Tyr Gly Ala Ala Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Glu Pro Val Ala Ser Leu Pro His Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 165
<211> 451
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 165

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Trp Phe Ser His Tyr
20 25 30

Ser Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Val Trp Pro Ile Arg Ser Phe Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Asn Pro Val Thr Ser Trp Pro His Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 166
<211> 451
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 166

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ala Phe Ser Tyr Tyr
20 25 30

Leu Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Phe Val Asp Pro Ile Arg Gly Gly Ala Phe Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Pro Val Asn Ala Ala Pro Arg Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 167
<211> 451
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 167

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ala Phe Ser Tyr Tyr
20 25 30

Leu Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Phe Val Asp Pro Ile Arg Gly Gly Ala Phe Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Pro Val Asn Ala Ala Pro Arg Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 168
<211> 451
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 168

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Trp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Ile Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Asn Pro Ile Tyr Gly Val Ala Leu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ala Pro Val Asn Asp Met Pro Arg Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 169
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 169

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Ser Pro
20 25 30

Gly Asp Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Glu Arg Arg Phe Tyr Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Ser Thr Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 170
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 170

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Ser Pro
20 25 30

Gly Asp Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Glu Arg Arg Phe Tyr Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Ser Thr Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 171
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 171

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asp Ser
20 25 30

Asn Met Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Gln His Arg Phe Tyr Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Met Gly Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 172
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 172

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asp Pro
20 25 30

Trp Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Ser Asn Arg Phe Tyr Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Lys Asp Phe Pro Arg Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 173

<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 173

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Arg Pro
20 25 30

Phe Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Ser Thr Arg Phe Tyr Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

His Gln Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 174
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 174

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Asp
20 25 30

Arg Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Gly Ser Ile Phe Tyr Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Ala Glu Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 175
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 175

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Trp Asn
20 25 30

Asp Arg Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Arg Lys Arg Phe Tyr Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Gln Asp Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 176
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 176

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asp Gly
20 25 30

Phe Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Arg Lys Arg Phe Tyr Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Phe Ala Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 177
<211> 258
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 177

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser
20 25 30

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
35 40 45

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
50 55 60

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
65 70 75 80

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
85 90 95

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
100 105 110

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
115 120 125

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
130 135 140

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
145 150 155 160

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
165 170 175

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
180 185 190

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
195 200 205

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
210 215 220

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
225 230 235 240

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
245 250 255

Ser Pro

<210> 178
<211> 299
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 178

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
65 70 75 80

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
85 90 95

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
100 105 110

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

115 120 125

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
130 135 140

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
145 150 155 160

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
165 170 175

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
180 185 190

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
195 200 205

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
210 215 220

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
225 230 235 240

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
245 250 255

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
260 265 270

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
275 280 285

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
290 295

<210> 179
<211> 377
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 179

Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr
1 5 10 15

Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu
20 25 30

Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His
35 40 45

Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly
50 55 60

Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe
65 70 75 80

Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu
85 90 95

Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val
100 105 110

Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr
115 120 125

Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Asp Ile Glu
130 135 140

Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
145 150 155 160

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
165 170 175

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
180 185 190

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
195 200 205

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
210 215 220

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
225 230 235 240

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
245 250 255

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
260 265 270

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
275 280 285

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
290 295 300

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
305 310 315 320

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
325 330 335

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
340 345 350

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
355 360 365

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
370 375

<210> 180
<211> 308
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 180

Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr
1 5 10 15

Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu
20 25 30

Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His
35 40 45

Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly
50 55 60

Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro
65 70 75 80

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
85 90 95

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
100 105 110

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
115 120 125

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
130 135 140

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
145 150 155 160

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
165 170 175

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
180 185 190

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
195 200 205

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
210 215 220

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
225 230 235 240

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
245 250 255

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
260 265 270

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
275 280 285

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
290 295 300

Ser Leu Ser Pro
305

<210> 181
<211> 336
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 181

Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys
1 5 10 15

Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys
20 25 30

Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg
35 40 45

Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly
50 55 60

Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser
65 70 75 80

Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly
85 90 95

His Ser Pro Gln Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp
100 105 110

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
130 135 140

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
145 150 155 160

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
165 170 175

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
180 185 190

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
195 200 205

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
210 215 220

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

225 230 235 240

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
245 250 255

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
260 265 270

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
275 280 285

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
290 295 300

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
305 310 315 320

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325 330 335

<210> 182
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучно синтезована послідовність

<400> 182

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 183
<211> 189
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 183

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln His His His His His His Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu
165 170 175

Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
180 185

<210> 184
<211> 330
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 184

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Ile Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
165 170 175

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
180 185 190

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn

195 200 205

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
210 215 220

Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
245 250 255

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
260 265 270

Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
275 280 285

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
290 295 300

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
305 310 315 320

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
325 330

<210> 185
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 185

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
100 105

<210> 186
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 186

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 187
<211> 116
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IC17Hdk

<400> 187

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gln Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Tyr Ser Glu Thr Arg Leu 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

Ala Leu Tyr Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 188
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IC17VL

<400> 188

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Ser Phe Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys
100 105

<210> 189
<211> 106
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Iam1

<400> 189

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 190
<211> 119

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> MRAH

<400> 190

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 191
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> MRAL

<400> 191

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 Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 192
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> H0002

<400> 192

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Tyr His Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Lys Leu Tyr Ser Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 193
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> L1058

<400> 193

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Asp Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Val Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Leu Arg Ser Ala Gly
85 90 95

Pro Tyr Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 194
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> H0041

<400> 194

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Gln Ser Tyr His Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Lys Leu Tyr Ser Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 195
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> L1088

<400> 195

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Asp Tyr
20 25 30

Ala Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Tyr Val Ser Lys Lys Pro Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Leu Arg Ser Pro Gly
85 90 95

Pro Tyr Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 196
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> H0052

<400> 196

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Tyr His Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Asp Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Lys Leu Tyr Ser Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 197
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> L1083

<400> 197

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Asp Tyr
20 25 30

Ala Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Tyr Val Asp Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Leu Arg Ser Pro Gly
85 90 95

Pro Tyr Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 198
<211> 325
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> G4T1

<400> 198

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Arg Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 199
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> k0

<400> 199

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 200
<211> 338
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 200

Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg Gly Val Leu
1 5 10 15

Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro Gly Val Glu
20 25 30

Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys Pro Ala Ala
35 40 45

Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg Leu Leu Leu
50 55 60

Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Tyr Arg Ala
65 70 75 80

Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val Pro Pro Glu
85 90 95

Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser Asn Val Val
100 105 110

Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr Lys Ala Val
115 120 125

Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp Phe Gln Glu
130 135 140

Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys Gln Leu Ala
145 150 155 160

Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met Cys Val Ala
165 170 175

Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe Gln Gly Cys
180 185 190

Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val Thr Ala Val
195 200 205

Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp Pro His Ser
210 215 220

Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Ala
225 230 235 240

Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp Leu Gln His
245 250 255

His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His Val Val Gln
260 265 270

Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser Glu Trp Ser
275 280 285

Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser Pro Pro Ala
290 295 300

Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr Asn Lys Asp
305 310 315 320

Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr Ser Leu Pro
325 330 335

Val Gln

<210> 201
<211> 118
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> mPD1F2VH

<400> 201

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Glu Asn Trp Gly Ser Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 202
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> mPD1F2VL

<400> 202

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 203
<211> 324
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 203

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Lys
100 105 110

Glu Val Ser Lys Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
115 120 125

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
130 135 140

Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
145 150 155 160

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
165 170 175

Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
180 185 190

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
210 215 220

Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
225 230 235 240

Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val
245 250 255

Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
260 265 270

Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
275 280 285

Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
290 295 300

Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 204
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> H5029

<400> 204

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Arg His Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Arg Pro Phe Glu Leu Leu Trp Val Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 205
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> L3021

<400> 205

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Pro Ser Gly Ala Trp
20 25 30

Asp Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gln Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Thr Ser Ser Ala
85 90 95

Trp Asp Pro Asp Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 206
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> H5041

<400> 206

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Lys His Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Arg Pro Trp Glu Leu Leu Trp Val Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 207
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> L3023

<400> 207

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Pro Ser Gly Ala Tyr
20 25 30

Asp Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gln Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Thr Asn Ser Ala
85 90 95

Trp Asp Pro Asp Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 208
<211> 330
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> mFa31

<400> 208

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu

50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Asn Leu Arg Arg Gly Pro Lys Val Phe Ile Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
165 170 175

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
180 185 190

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
195 200 205

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
210 215 220

Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
245 250 255

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
260 265 270

Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
275 280 285

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
290 295 300

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
305 310 315 320

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
325 330

<210> 209
<211> 402
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> mPD1-G1CH2

<400> 209

Trp Val Arg Gln Val Pro Trp Ser Phe Thr Trp Ala Val Leu Gln Leu
1 5 10 15

Ser Trp Gln Ser Gly Trp Leu Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp Arg
20 25 30

Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn
35 40 45

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met Leu
50 55 60

Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala
65 70 75 80

Phe Ser Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln Ile
85 90 95

Ile Gln Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Thr
100 105 110

Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu His
115 120 125

Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr
130 135 140

Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro Lys
145 150 155 160

Pro Glu Gly Arg Phe Gln Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser
165 170 175

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
180 185 190

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
195 200 205

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
210 215 220

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
225 230 235 240

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
245 250 255

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
260 265 270

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
275 280 285

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
290 295 300

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
305 310 315 320

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
325 330 335

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
340 345 350

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
355 360 365

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
370 375 380

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
385 390 395 400

Ser Pro

<210> 210
<211> 463
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> mPDL1-G1dCH2His

<400> 210

Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu
20 25 30

Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val Ile Gln
35 40 45

Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn Phe Arg
50 55 60

Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys
85 90 95

Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp Pro Ala
115 120 125

Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Glu Ala
130 135 140

Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly Lys Arg
145 150 155 160

Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val Thr Ser
165 170 175

Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys Thr Phe
180 185 190

Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro
195 200 205

Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His Ile Glu Gly
210 215 220

Arg Met Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
405 410 415

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro His His His His His His
450 455 460

<210> 211
<211> 107

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> mk0

<400> 211

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
100 105

<210> 212
<211> 105
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ml0

<400> 212

Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val
35 40 45

Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg
65 70 75 80

His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val Glu
85 90 95

Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser
100 105

<210> 213
<211> 468
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> hIL6R

<400> 213

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro
1 5 10 15

Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg
20 25 30

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro
35 40 45

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys
50 55 60

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg
65 70 75 80

Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
85 90 95

Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val
100 105 110

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser
115 120 125

Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr
130 135 140

Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
145 150 155 160

Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys
165 170 175

Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met
180 185 190

Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe
195 200 205

Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
210 215 220

Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
225 230 235 240

Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg
245 250 255

Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp
260 265 270

Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His
275 280 285

Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser
290 295 300

Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser
305 310 315 320

Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr
325 330 335

Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr
340 345 350

Ser Leu Pro Val Gln Asp Ser Ser Ser Val Pro Leu Pro Thr Phe Leu
355 360 365

Val Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Gly Thr Leu Leu Cys Ile Ala Ile
370 375 380

Val Leu Arg Phe Lys Lys Thr Trp Lys Leu Arg Ala Leu Lys Glu Gly
385 390 395 400

Lys Thr Ser Met His Pro Pro Tyr Ser Leu Gly Gln Leu Val Pro Glu
405 410 415

Arg Pro Arg Pro Thr Pro Val Leu Val Pro Leu Ile Ser Pro Pro Val
420 425 430

Ser Pro Ser Ser Leu Gly Ser Asp Asn Thr Ser Ser His Asn Arg Pro
435 440 445

Asp Ala Arg Asp Pro Arg Ser Pro Tyr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Tyr
450 455 460

Phe Phe Pro Arg
465

<210> 214
<211> 288
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 214

Met Trp Val Arg Gln Val Pro Trp Ser Phe Thr Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Ser Trp Gln Ser Gly Trp Leu Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp
20 25 30

Arg Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met
50 55 60

Leu Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala

65 70 75 80

Ala Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln
85 90 95

Ile Ile Gln Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp
100 105 110

Thr Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

His Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val
130 135 140

Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Lys Pro Glu Gly Arg Phe Gln Gly Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 215
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> G1m

<400> 215

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 216
<211> 106
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> lam1

<400> 216

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 217
<211> 328
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> G1d

<400> 217

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 218
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> k0

<400> 218

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 219
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 219

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 220
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 220

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 221
<211> 377
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 221

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 222
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 222

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 223
<211> 328

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> G1T6

<400> 223

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 224
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> TR01H113

<400> 224

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser Gln Asn Tyr Ala Thr Tyr Val Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ala Ala Gly Tyr Gly Val Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 225
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> L0011-k0

<400> 225

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Pro Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Антигензв'язувальна молекула проти CD137, яка включає варіабельний домен важкого ланцюга (VH) та відповідний йому варіабельний домен легкого ланцюга (VL), яка **відрізняється** тим, що комбінація VH і VL вибрана з (a) до (m), вказаних нижче:

(a) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 43, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54;

(b) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 44, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 55;

(c) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 45, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 55;

(d) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 46, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54;

(e) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 47, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54;

(f) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 48, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 56;

(g) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 49, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 57;

(h) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 50, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 58;

(i) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59;

(j) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 51, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60;

(k) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 52, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 60;

(l) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 50, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 59; та

(m) VH, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 53, і VL, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 54.

2. Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за п. 1, де зв'язувальна активність стосовно CD137 у присутності 10, 50, 100, 150, 200 або 250 мкМ низькомолекулярної сполуки вдвічі або більше перевищує зв'язувальну активність стосовно CD137 за відсутності низькомолекулярної сполуки, при цьому низькомолекулярна сполука являє собою аденозинвмісну сполуку.

3. Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за п. 1 або 2, яка включає змінену ділянку Fc, де змінена ділянка Fc включає будь-яку комбінацію амінокислотних змін, вибрану з наступних:

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K;
K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K;
L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/P343R/D413K;
L234Y/P238D/V264I/A330K/P343R/D413K;
L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/P343R/D413K;
L234Y/G237D/P238D/A330K/P343R/D413K;
L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R/P343R;
L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/Q311R/P343R;
L234Y/P238D/V264I/A330K/Q311R/P343R;
L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/Q311R/P343R;
L234Y/G237D/P238D/A330K/Q311R/P343R;
L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R;
K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R;
L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/D413K;
K214R/G236N/H268D/A330K/P343R;
K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R;
K214R/G236N/H268D/A330K/D413K;
K214R/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K;
K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K;
K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R;
K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R;
K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R;
K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R;
K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K;
K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K; і
K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R.

4. Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з пп. 1-3, яка включає константну ділянку важкого ланцюга, що включає будь-яку з амінокислотних послідовностей за SEQ ID NO: 64-85.

5. Антигензв'язувальна молекула проти CD137 за будь-яким з пп. 1-4, яка включає константну ділянку легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 63.

6. Виділена нуклеїнова кислота, що кодує антигензв'язувальну молекулу проти CD137 за будь-яким з пп. 1-5.

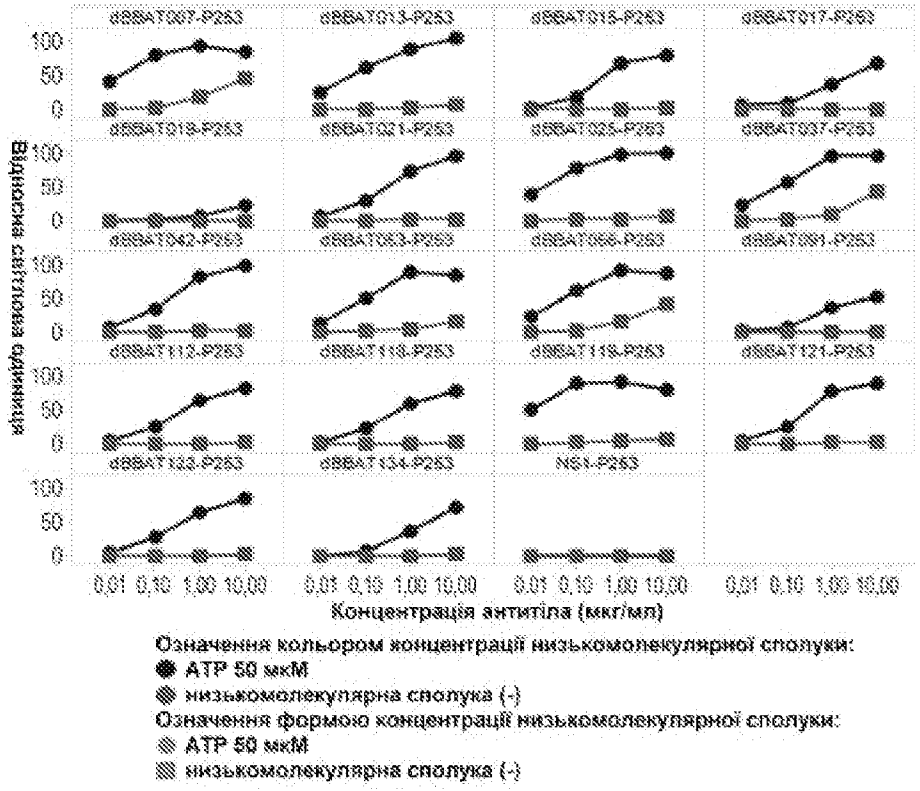
7. Вектор, у який введена нуклеїнова кислота за п. 6.

8. Клітина-хазяїн, що містить нуклеїнову кислоту за п. 6 або вектор за п. 7.

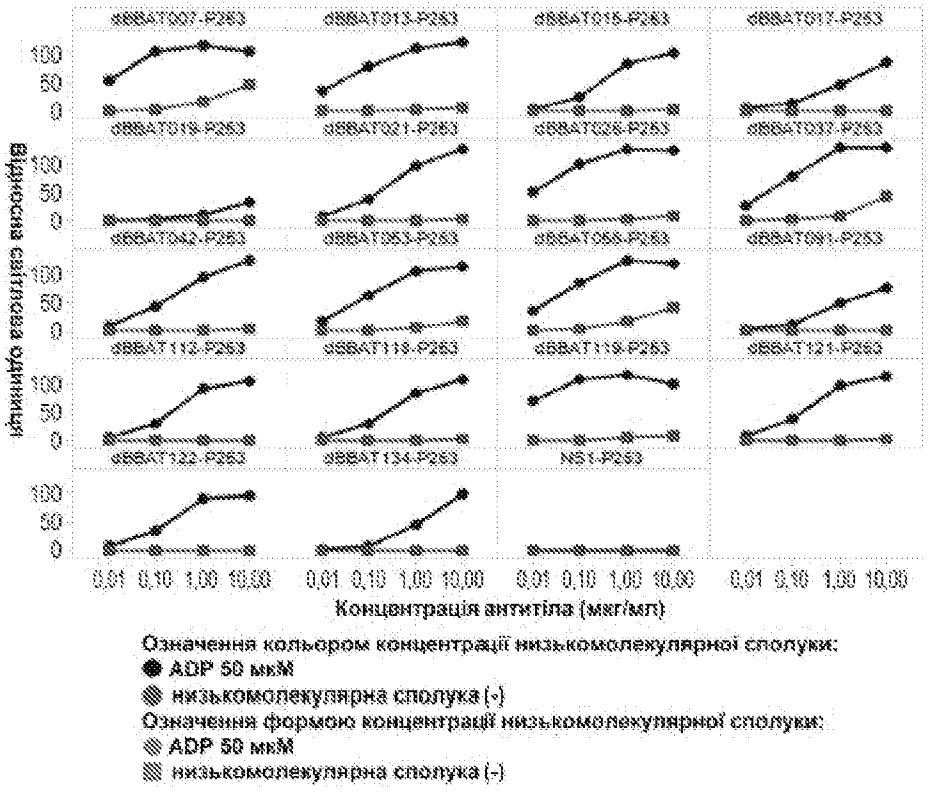
9. Спосіб отримання антигензв'язувальної молекули проти CD137, який передбачає культивування клітини-хазяїна за п. 8 таким чином, що виробляється антигензв'язувальна молекула проти CD137.

10. Імунокон'югат, що включає антигензв'язувальну молекулу проти CD137 за будь-яким з пп. 1-5 та цитотоксичний агент.

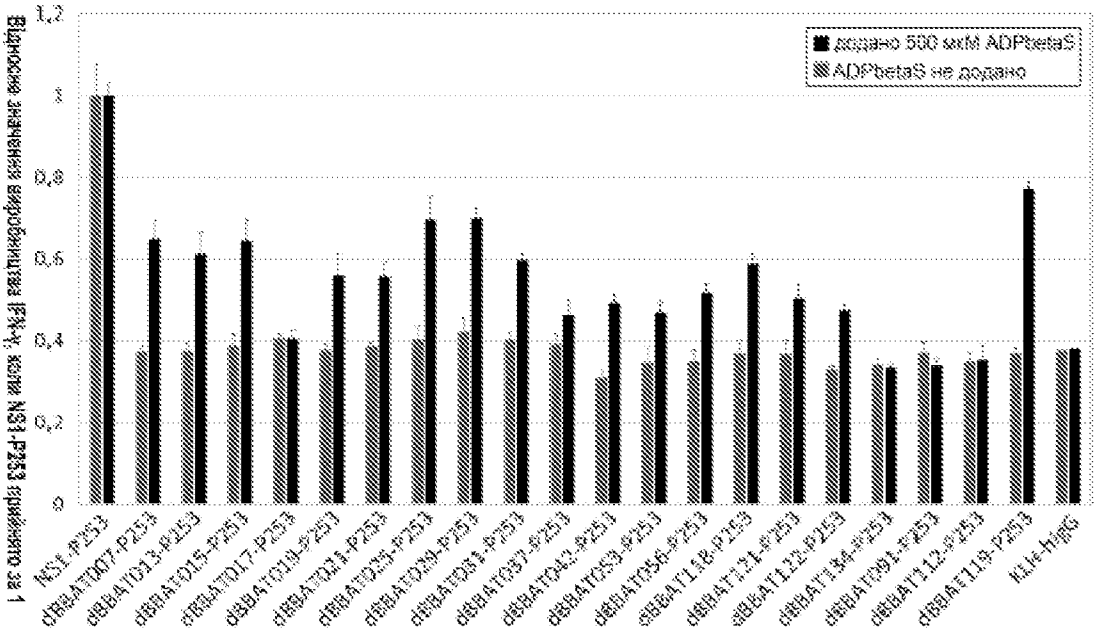
11. Фармацевтична композиція, яка містить антигензв'язувальну молекулу проти CD137 за будь-яким з пп. 1-5 або імунокон'югат за п. 10 і фармацевтично прийнятний носій.


dBBAT007-P253
dBBAT013-P253
dBBAT015-P253
dBBAT017-P253
dBBAT019-P253
dBBAT021-P253
dBBAT025-P253
dBBAT037-P253
dBBAT042-P253
dBBAT053-P253
dBBAT058-P253
dBBAT091-P253
dBBAT112-P253
dBBAT118-P253
dBBAT119-P253
dBBAT121-P253
dBBAT122-P253
dBBAT134-P253
NS1-P253
Відносна світлова одиниця
100
50
0
0,01 0,10 1,00 10,00
Концентрація антитіла (мкг/мл)
Означення кольором концентрації низькомолекулярної сполуки:
ATP 50 мкМ
низькомолекулярна сполука (-)
Означення формою концентрації низькомолекулярної сполуки:
ATP 50 мкМ
низькомолекулярна сполука (-)

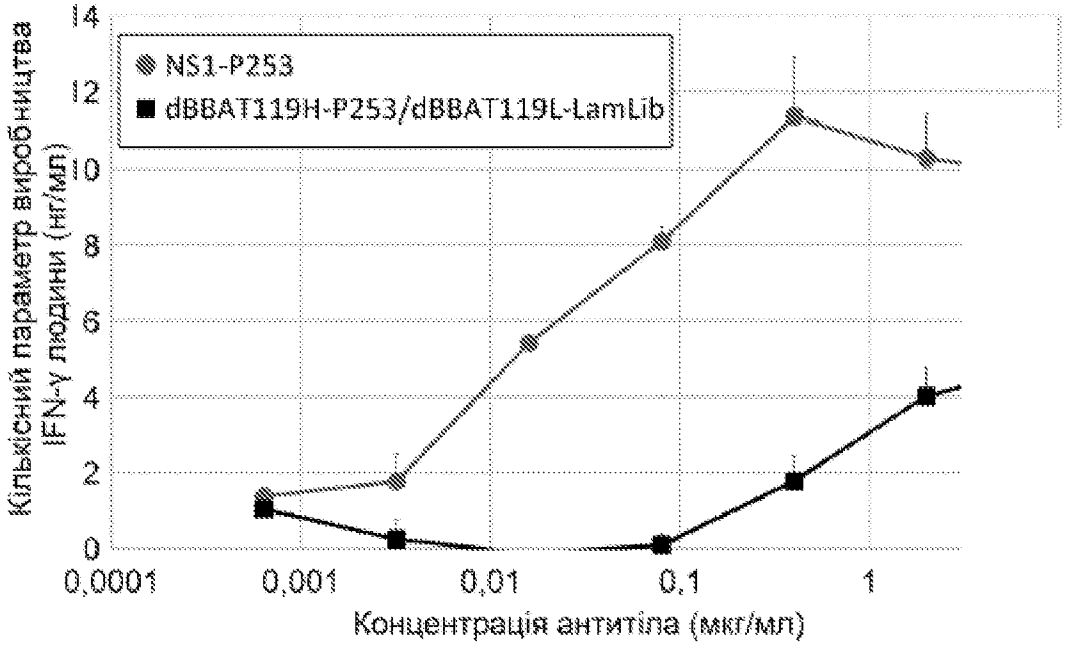
Фіг. 1


dBBAT007-P253
dBBAT013-P253
dBBAT015-P253
dBBAT017-P253
dBBAT019-P253
dBBAT021-P253
dBBAT025-P253
dBBAT037-P253
dBBAT042-P253
dBBAT053-P253
dBBAT058-P253
dBBAT091-P253
dBBAT112-P253
dBBAT118-P253
dBBAT119-P253
dBBAT121-P253
dBBAT122-P253
dBBAT134-P253
NS1-P253
Відносна світлова одиниця
100
50
0
0,01 0,10 1,00 10,00
Концентрація антитіла (мкг/мл)
Означення кольором концентрації низькомолекулярної сполуки:
ADP 50 мкМ
низькомолекулярна сполука (-)
Означення формою концентрації низькомолекулярної сполуки:
ADP 50 мкМ
низькомолекулярна сполука (-)

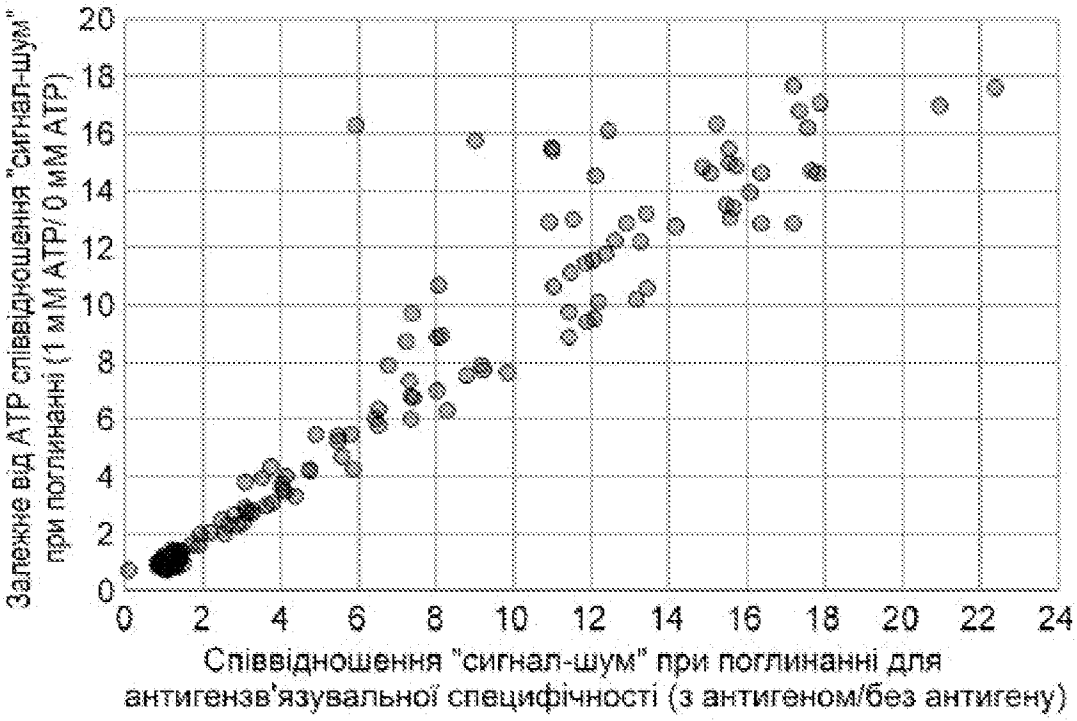
Фіг. 2


додано 500 мкМ ADPbetaS
ADPbetaS не додано
NS1-P253
dBBAT007-P253
dBBAT013-P253
dBBAT015-P253
dBBAT017-P253
dBBAT019-P253
dBBAT021-P253
dBBAT025-P253
dBBAT029-P253
dBBAT031-P253
dBBAT037-P253
dBBAT042-P253
dBBAT053-P253
dBBAT056-P253
dBBAT118-P253
dBBAT121-P253
dBBAT122-P253
dBBAT184-P253
dBBAT091-P253
dBBAT112-P253
dBBAT119-P253
KLH-HuIgG

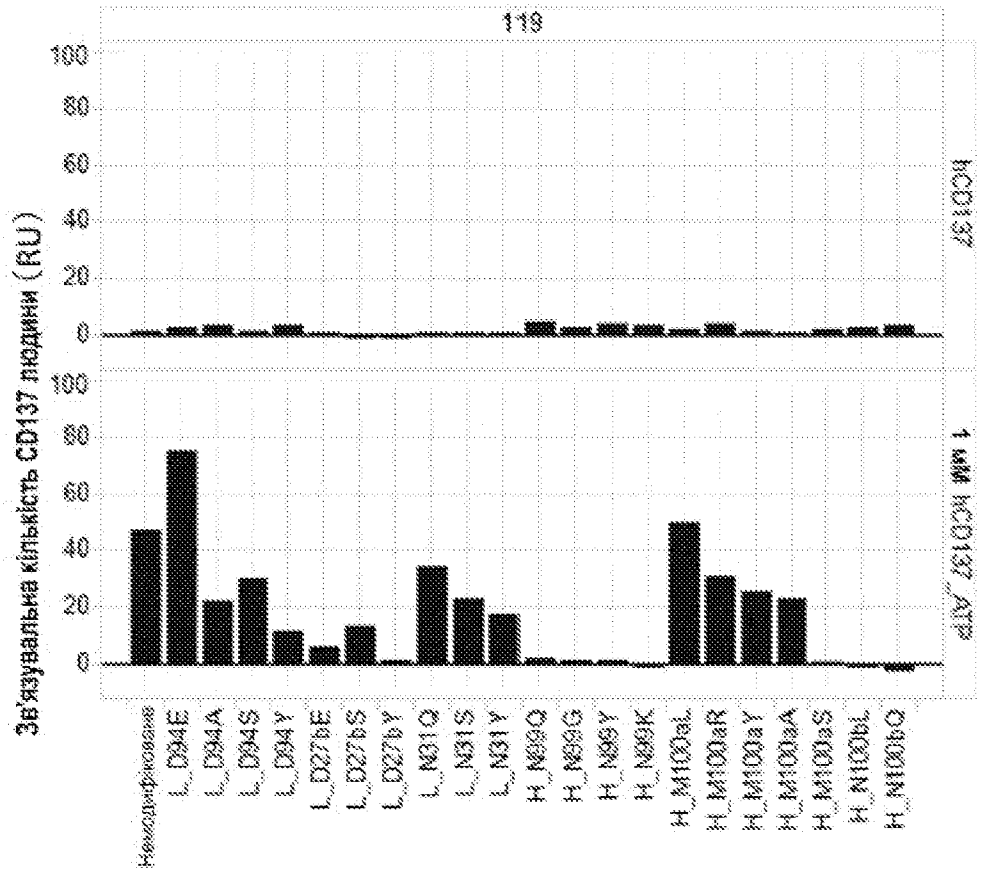
Фіг. 3


NS1-P253
dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib
Кількісний параметр виробництва IFN-γ людини (нг/мл)
Концентрація антитіла (мкг/мл)
0,0001
0,001
0,01
0,1
1

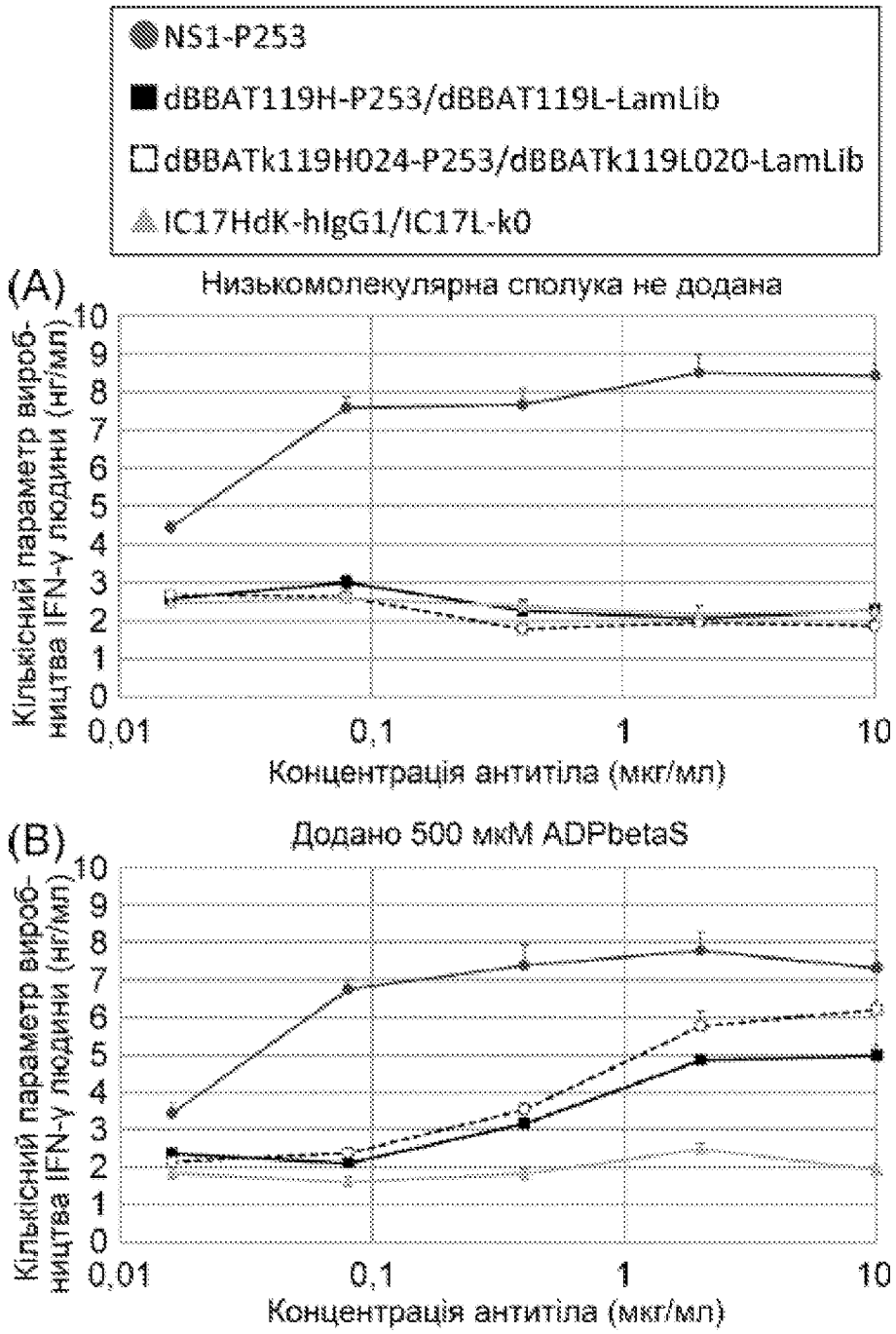
Фіг. 4


Залежне від АТР співвідношення "сигнал-шум" при поглинанні (1 мМ АТР/ 0 мМ АТР)
Співвідношення "сигнал-шум" при поглинанні для антигензв'язувальної специфічності (з антигеном/без антигену)

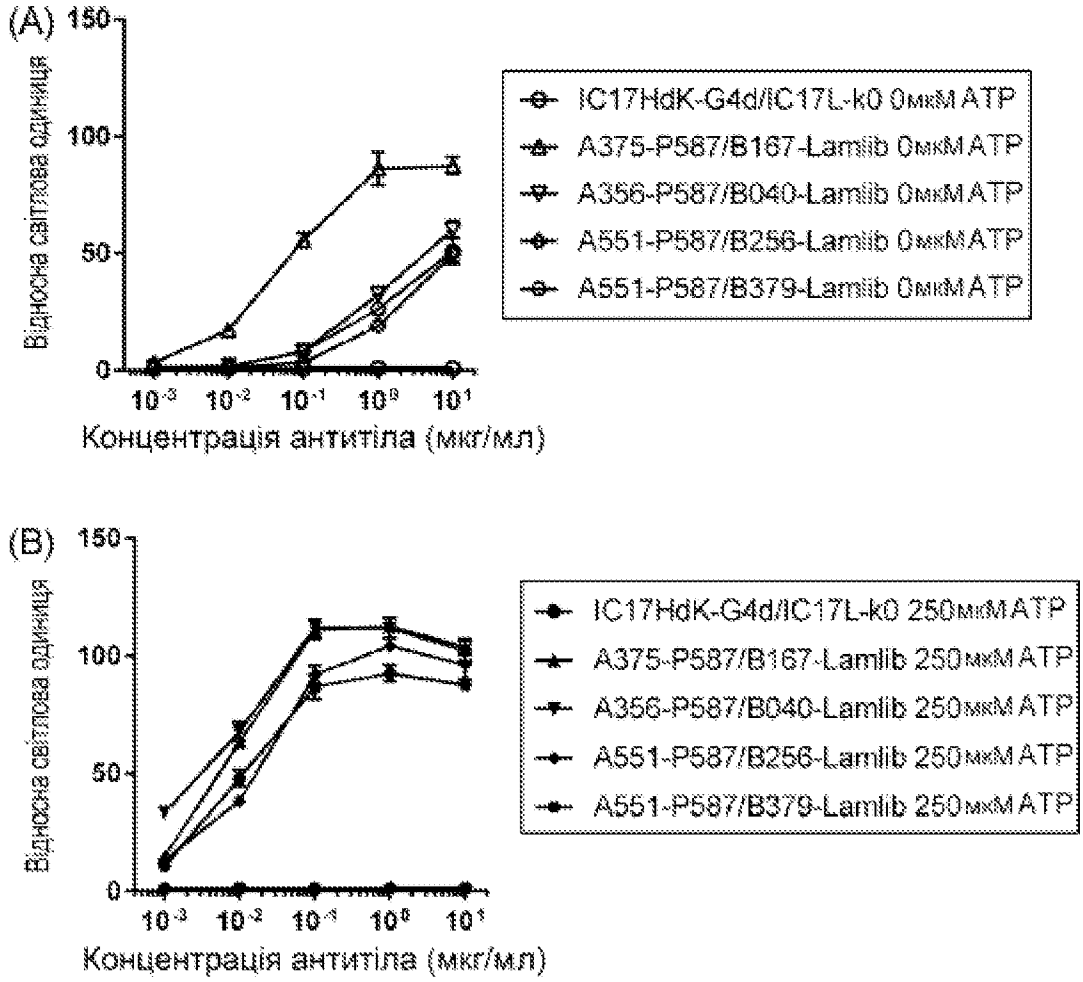
Фіг. 5


119
Зв'язувальна кількість CD137 людини (RU)
hCD137
1 мМ hCD137_ATP
Неідентифіковано
L_D94E
L_D94A
L_D94S
L_D94Y
L_D27bE
L_D27bS
L_D27bY
L_N31Q
L_N31S
L_N31Y
H_N99Q
H_N99G
H_N99Y
H_N99K
H_M100aL
H_M100aR
H_M100aY
H_M100aA
H_M100aS
H_M100bL
H_M100bQ

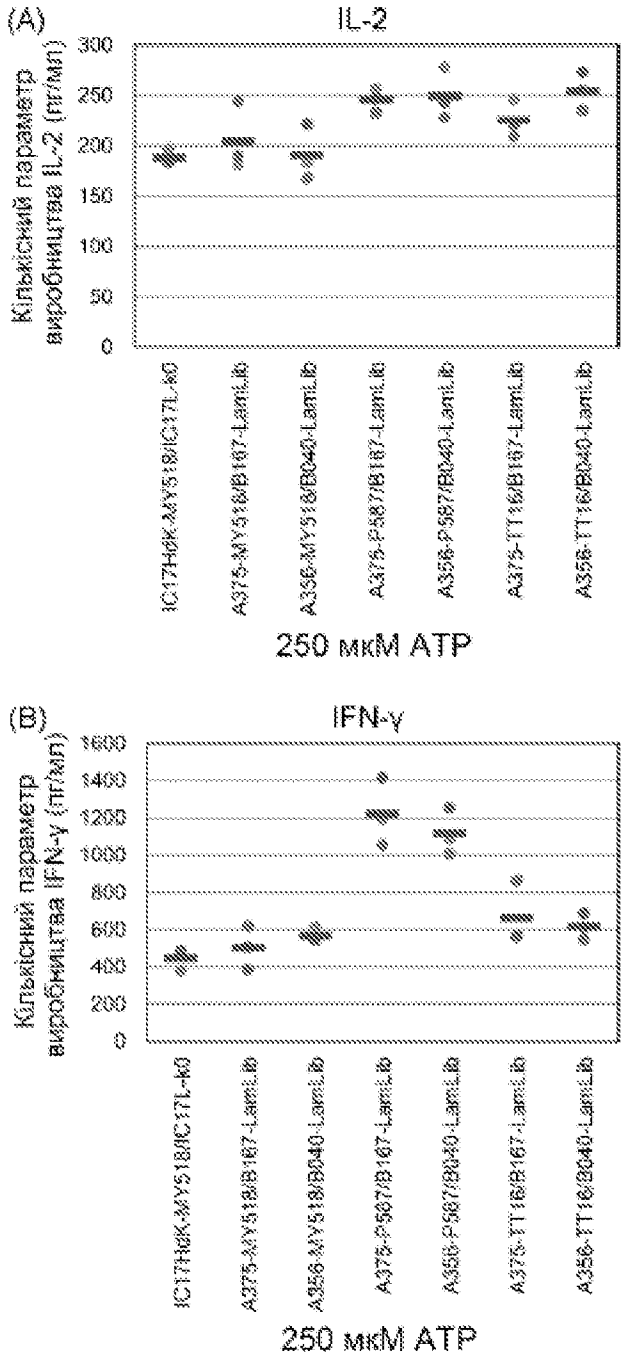
Фіг. 6


NS1-P253
dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib
dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib
IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0
(A)
Низькомолекулярна сполука не додана
Кількісний параметр виробництва IFN-γ людини (нг/мл)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0,01
0,1
1
10
Концентрація антитіла (мкг/мл)
(B)
Додано 500 мкМ ADPbetaS
Кількісний параметр виробництва IFN-γ людини (нг/мл)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0,01
0,1
1
10
Концентрація антитіла (мкг/мл)

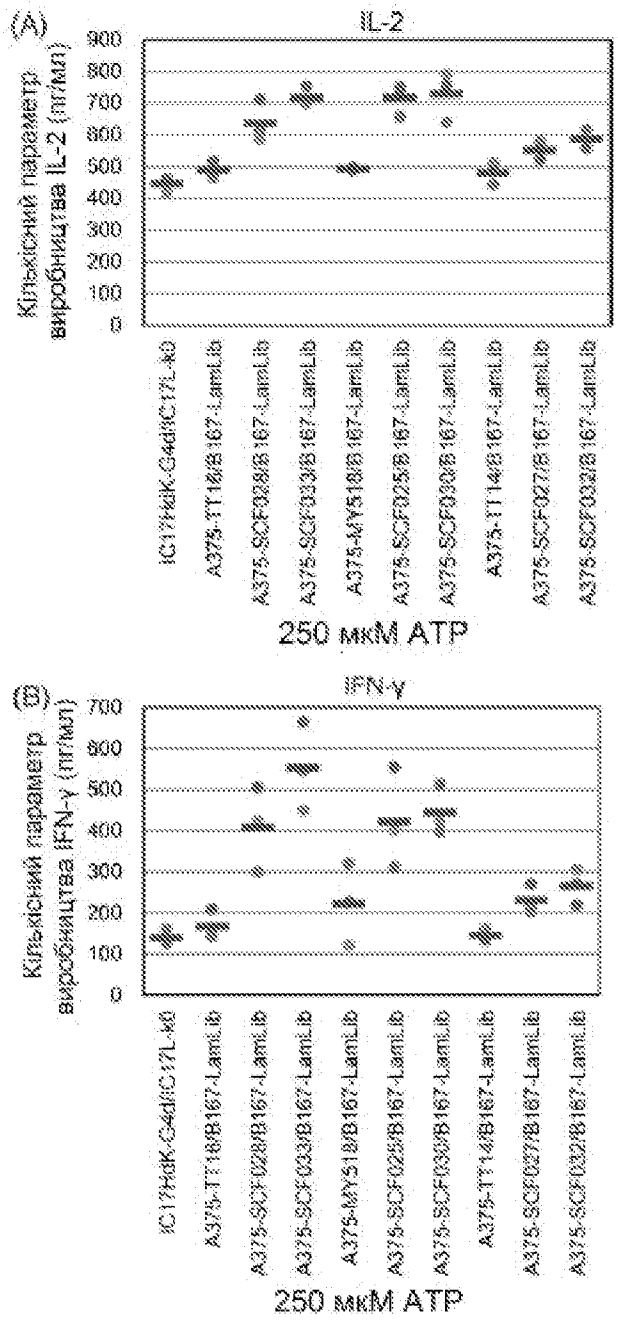
Фіг. 7


(A)
150
100
50
0
Відносна світлова одиниця
10-3
10-2
10-1
100
101
Концентрація антитіла (мкг/мл)
IC17HdK-G4d/IC17L-k0 0мкМ ATP
A375-P587/B167-Lamlib 0мкМ ATP
A356-P587/B040-Lamlib 0мкМ ATP
A551-P587/B256-Lamlib 0мкМ ATP
A551-P587/B379-Lamlib 0мкМ ATP
(B)
150
100
50
0
Відносна світлова одиниця
10-3
10-2
10-1
100
101
Концентрація антитіла (мкг/мл)
IC17HdK-G4d/IC17L-k0 250мкМ ATP
A375-P587/B167-Lamlib 250мкМ ATP
A356-P587/B040-Lamlib 250мкМ ATP
A551-P587/B256-Lamlib 250мкМ ATP
A551-P587/B379-Lamlib 250мкМ ATP

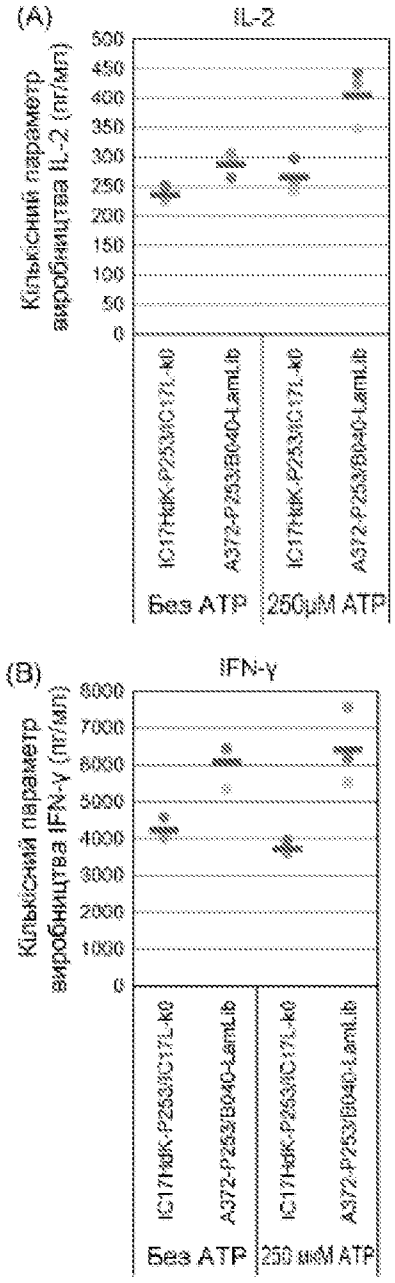
Фіг. 8


(A)
IL-2
Кількісний параметр виробництва IL-2 (пг/мл)
300
250
200
150
100
50
0
IC17HoK-MY516/IC17L-kO
A375-MY516/B167-Lamp.lib
A356-MY516/B040-Lamp.lib
A375-P5807/B167-Lamp.lib
A356-P5807/B040-Lamp.lib
A375-TT16/B167-Lamp.lib
A356-TT16/B040-Lamp.lib
250 мкМ ATP
(B)
IFN-γ
Кількісний параметр виробництва IFN-γ (пг/мл)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
IC17HoK-MY516/IC17L-kO
A375-MY516/B167-Lamp.lib
A356-MY516/B040-Lamp.lib
A375-P5807/B167-Lamp.lib
A356-P5807/B040-Lamp.lib
A375-TT16/B167-Lamp.lib
A356-TT16/B040-Lamp.lib
250 мкМ ATP

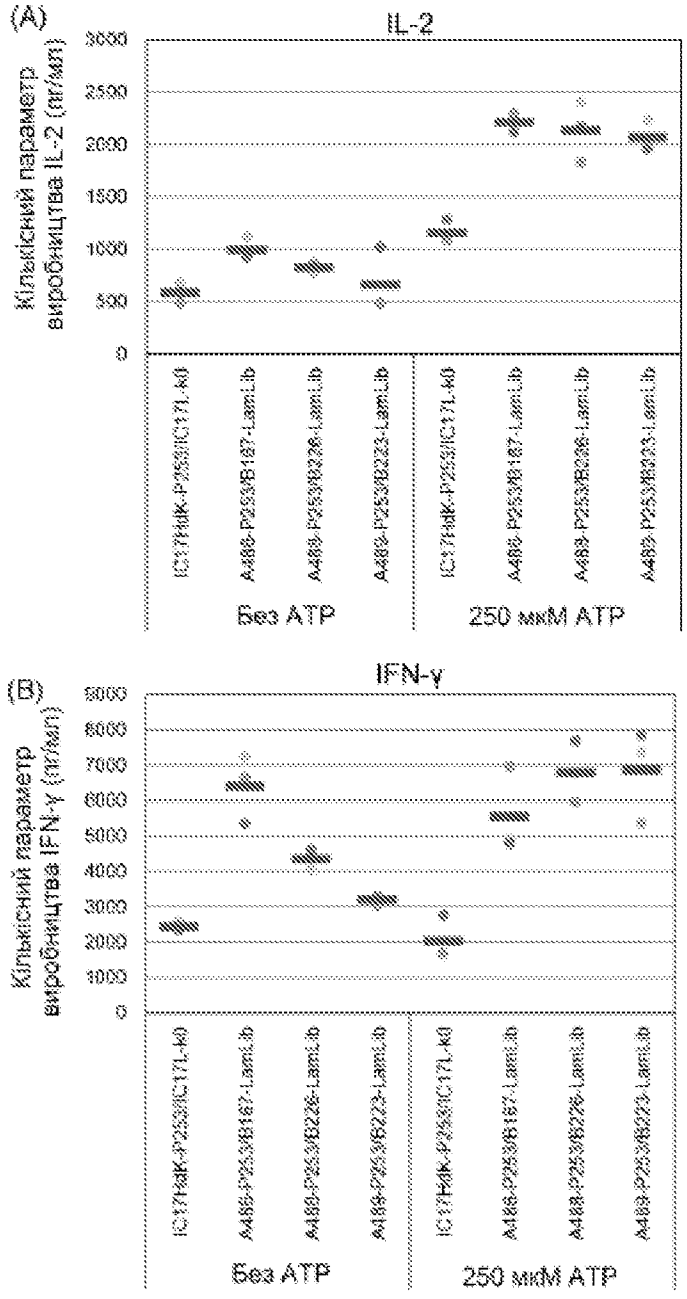
Фіг. 9


(A)
Кількісний параметр виробництва IL-2 (пг/мл)
IL-2
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
IC17HsK-G4d/C17IL-k0
A375-TT14/B167-LamLib
A375-SCF028/B167-LamLib
A375-SCF033/B167-LamLib
A375-MY518/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-TT14/B167-LamLib
A375-SCF027/B167-LamLib
A375-SCF032/B167-LamLib
250 мкМ ATP
(B)
Кількісний параметр виробництва IFN-γ (пг/мл)
IFN-γ
700
600
500
400
300
200
100
0
IC17HsK-G4d/C17IL-k0
A375-TT14/B167-LamLib
A375-SCF028/B167-LamLib
A375-SCF033/B167-LamLib
A375-MY518/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-TT14/B167-LamLib
A375-SCF027/B167-LamLib
A375-SCF032/B167-LamLib
250 мкМ ATP

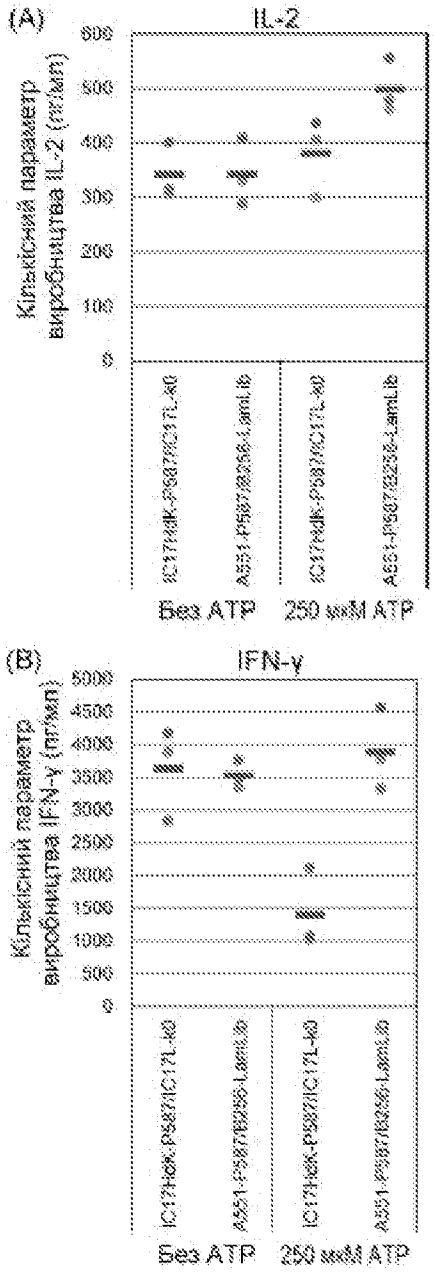
Фіг. 10


(A)
IL-2
Кількісний параметр виробництва IL-2 (пг/мл)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
IC17Hdk-P253(C17L-k0
A372-P253(B040-LamLib
IC17Hdk-P253(C17L-k0
A372-P253(B040-LamLib
Без ATP
250μM ATP
(B)
IFN-γ
Кількісний параметр виробництва IFN-γ (пг/мл)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IC17Hdk-P253(C17L-k0
A372-P253(B040-LamLib
IC17Hdk-P253(C17L-k0
A372-P253(B040-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP

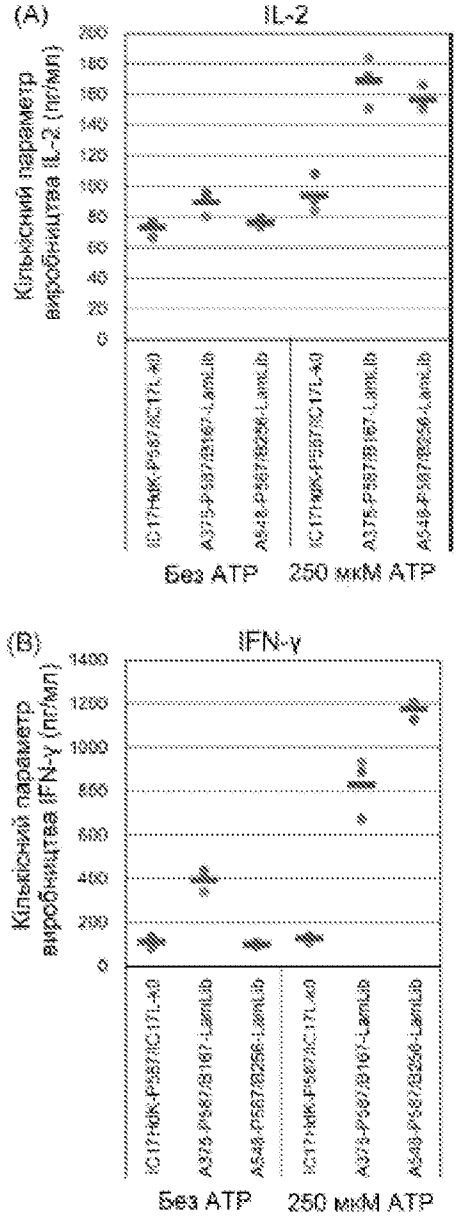
Фіг. 11


(A)
IL-2
Кількісний параметр виробництва IL-2 (пг/мл)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
IC17HdK-P253IC171-Ab0
A488-P253IB167-Lami.lb
A488-P253IB226-Lami.lb
A488-P253IB223-Lami.lb
Без ATP
250 мкМ ATP
(B)
IFN-γ
Кількісний параметр виробництва IFN-γ (пг/мл)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IC17HdK-P253IC171-Ab0
A488-P253IB167-Lami.lb
A488-P253IB226-Lami.lb
A488-P253IB223-Lami.lb
Без ATP
250 мкМ ATP

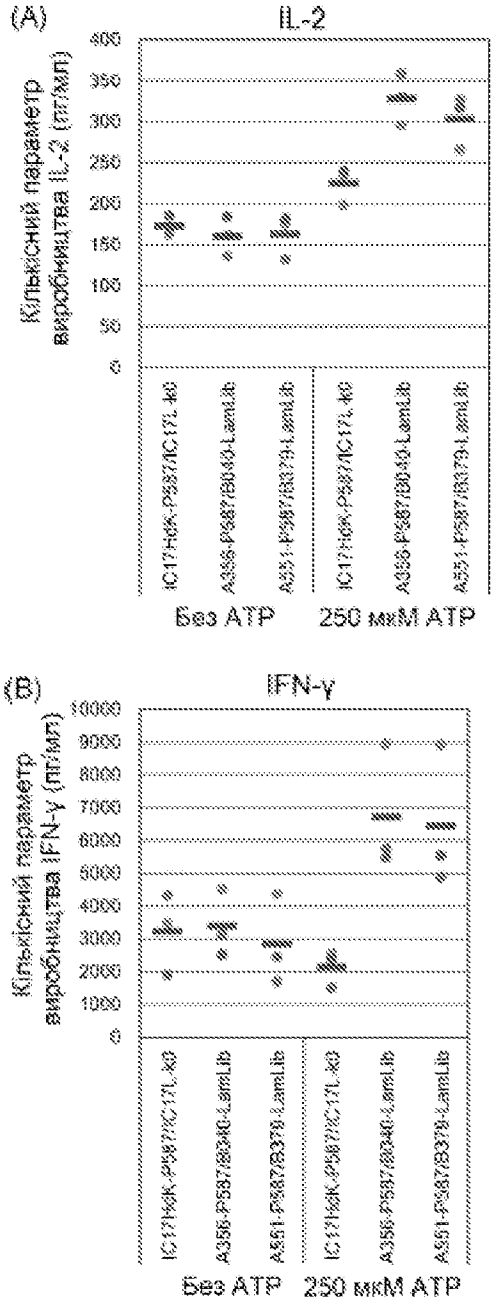
Фіг. 12


(A)
IL-2
Кількісний параметр виробництва IL-2 (пг/мл)
600
500
400
300
200
100
0
IC17Hdk-P5871/C17L-k0
A551-P5871/B256-LamLib
IC17Hdk-P5871/C17L-k0
A551-P5871/B256-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP
(B)
IFN-γ
Кількісний параметр виробництва IFN-γ (пг/мл)
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
IC17Hdk-P5871/C17L-k0
A551-P5871/B256-LamLib
IC17Hdk-P5871/C17L-k0
A551-P5871/B256-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP

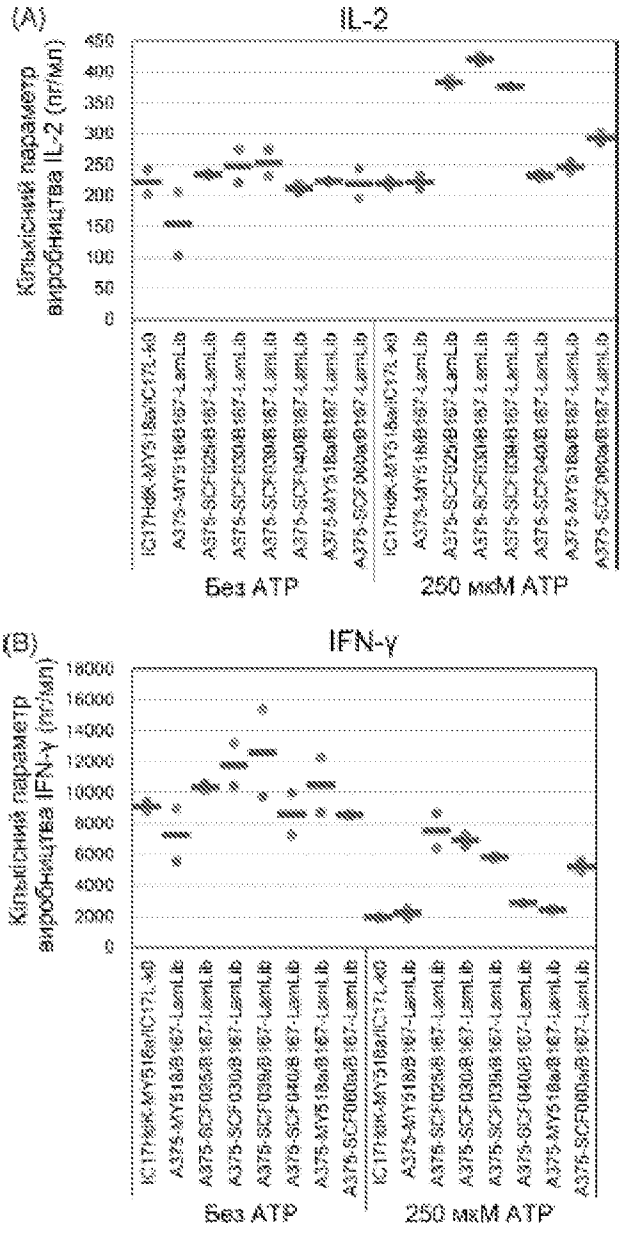
Фіг. 13


(A)
IL-2
Кількісний параметр виробництва IL-2 (пг/мл)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Без ATP
250 мкМ ATP
(B)
IFN-γ
Кількісний параметр виробництва IFN-γ (пг/мл)
0
20
40
60
80
100
120
140
Без ATP
250 мкМ ATP

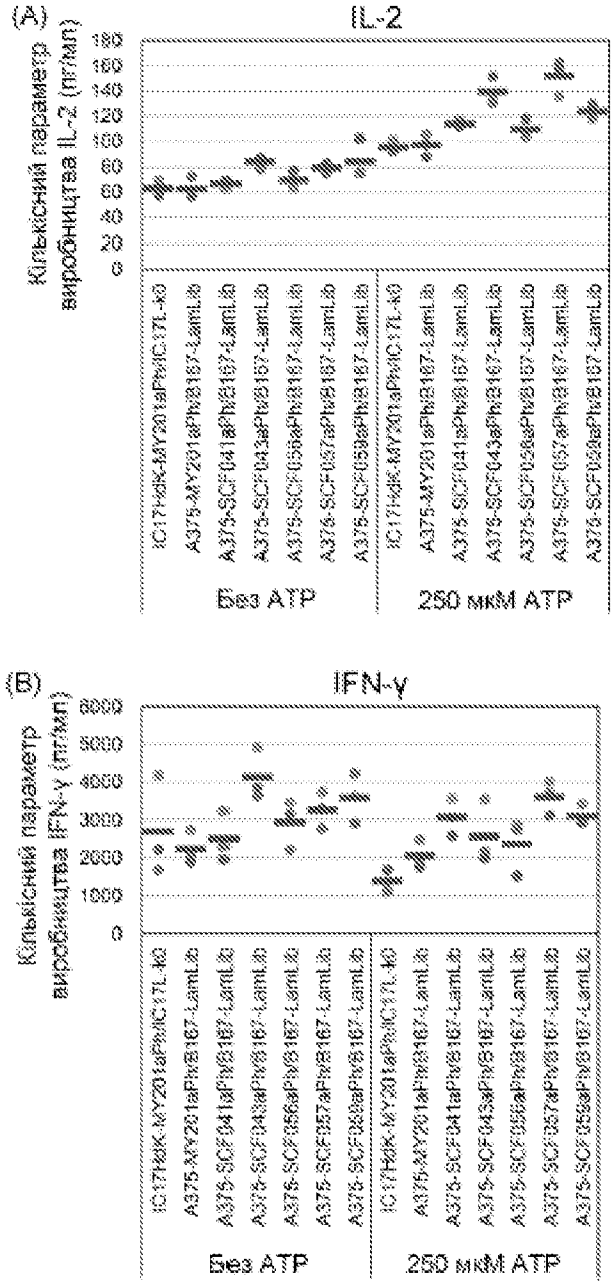
Фіг. 14


(A)
IL-2
Кількісний параметр виробництва IL-2 (пг/мл)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
IC17HoK-P5871IC17L.ko
A356-P5871B0340-LamLib
A551-P5871B0379-LamLib
IC17HoK-P5871IC17L.ko
A356-P5871B0340-LamLib
A551-P5871B0379-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP
(B)
IFN-γ
Кількісний параметр виробництва IFN-γ (пг/мл)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000
10000
IC17HoK-P5871IC17L.ko
A356-P5871B0340-LamLib
A551-P5871B0379-LamLib
IC17HoK-P5871IC17L.ko
A356-P5871B0340-LamLib
A551-P5871B0379-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP

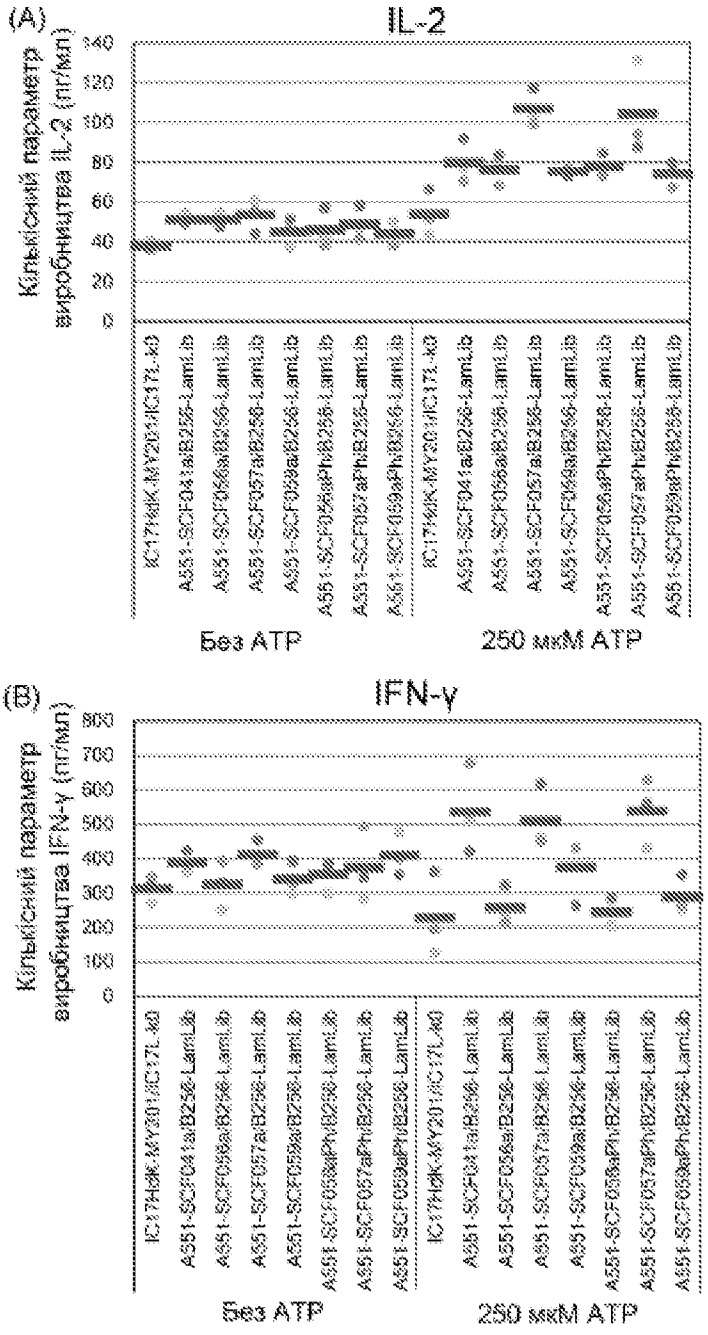
Фіг. 15


(A)
IL-2
Кількісний параметр вироблення IL-2 (пг/мл)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
IC17Hok-MY518ai/IC17L-k0
A375-MY518i0/167-LamLib
A375-SCF0250i0/167-LamLib
A375-SCF0300i0/167-LamLib
A375-SCF0350i0/167-LamLib
A375-SCF0400i0/167-LamLib
A375-MY518ai0/167-LamLib
A375-SCF0600i0/167-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP
(B)
IFN-γ
Кількісний параметр вироблення IFN-γ (пг/мл)
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000
IC17Hok-MY518ai/IC17L-k0
A375-MY518i0/167-LamLib
A375-SCF0250i0/167-LamLib
A375-SCF0300i0/167-LamLib
A375-SCF0350i0/167-LamLib
A375-SCF0400i0/167-LamLib
A375-MY518ai0/167-LamLib
A375-SCF0600i0/167-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP

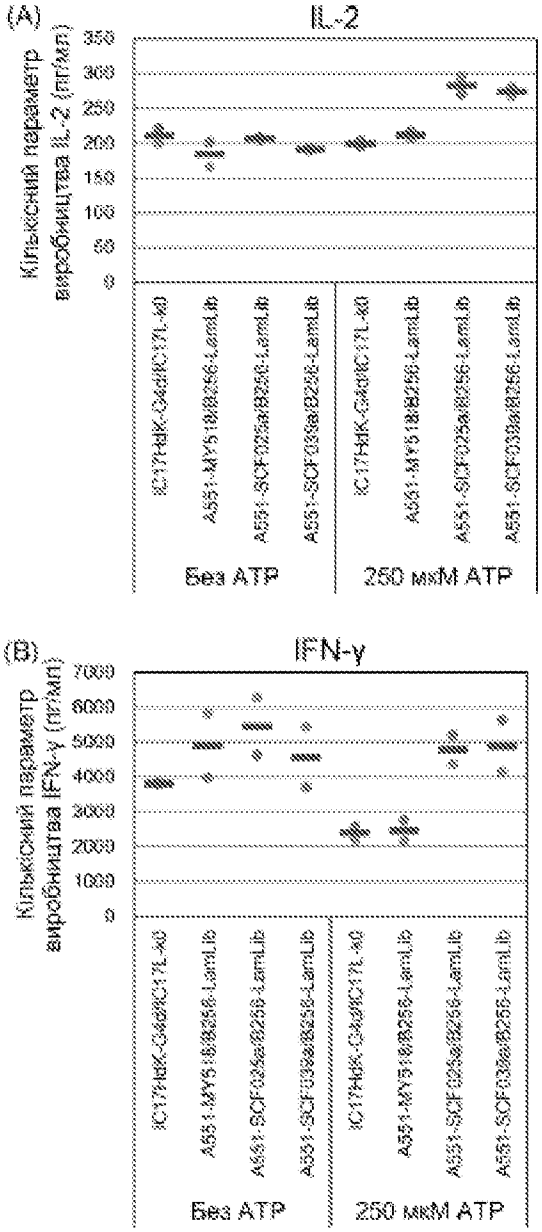
Фіг. 16


(A)
IL-2
Кількісний параметр виробництва IL-2 (пг/мл)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
IC17Hdk-MY201aPhiC17L-kb
A375-MY201aPhi3167-LamLib
A375-SCF041aPhi3167-LamLib
A375-SCF043aPhi3167-LamLib
A375-SCF056aPhi3167-LamLib
A375-SCF057aPhi3167-LamLib
A375-SCF058aPhi3167-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP
(B)
IFN-γ
Кількісний параметр виробництва IFN-γ (пг/мл)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IC17Hdk-MY201aPhiC17L-kb
A375-MY201aPhi3167-LamLib
A375-SCF041aPhi3167-LamLib
A375-SCF043aPhi3167-LamLib
A375-SCF056aPhi3167-LamLib
A375-SCF057aPhi3167-LamLib
A375-SCF058aPhi3167-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP

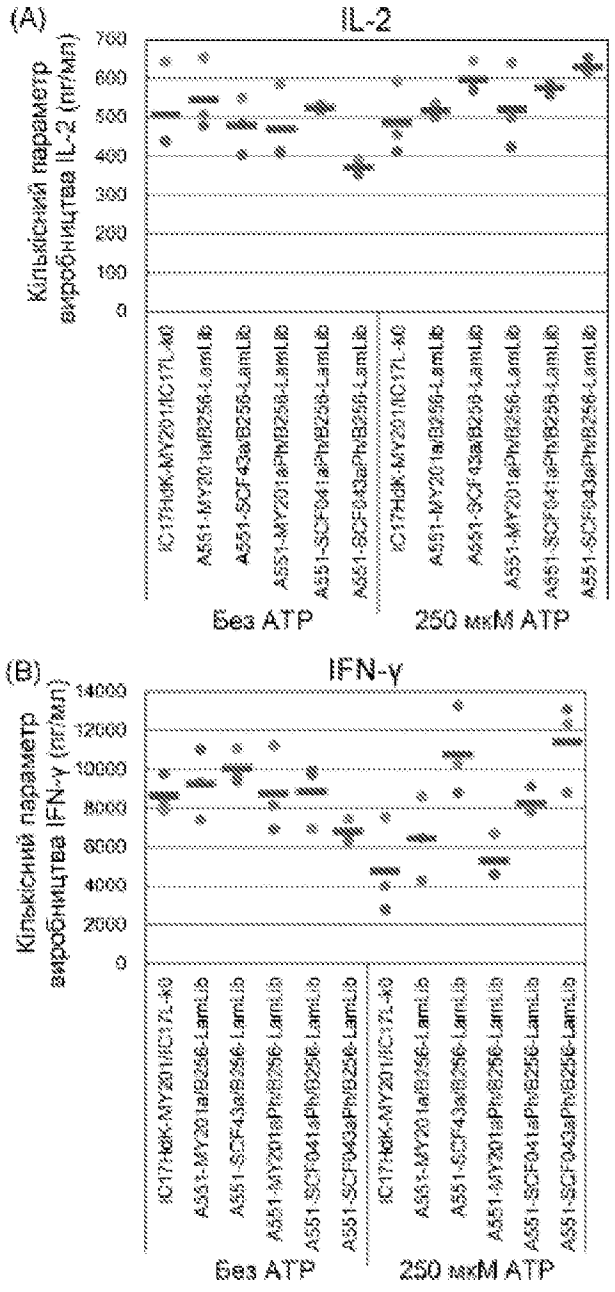
Фіг. 17


(A)
IL-2
Кількісний параметр виробництва IL-2 (пг/мл)
0
20
40
60
80
100
120
140
KC17MdK-MY201/KC17L-K0
A551-SCF041a/B256-LamLib
A551-SCF056a/B256-LamLib
A551-SCF057a/B256-LamLib
A551-SCF059a/B256-LamLib
A551-SCF056aPh/B256-LamLib
A551-SCF057aPh/B256-LamLib
A551-SCF059aPh/B256-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP
(B)
IFN-γ
Кількісний параметр виробництва IFN-γ (пг/мл)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
KC17MdK-MY201/KC17L-K0
A551-SCF041a/B256-LamLib
A551-SCF056a/B256-LamLib
A551-SCF057a/B256-LamLib
A551-SCF059a/B256-LamLib
A551-SCF056aPh/B256-LamLib
A551-SCF057aPh/B256-LamLib
A551-SCF059aPh/B256-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP

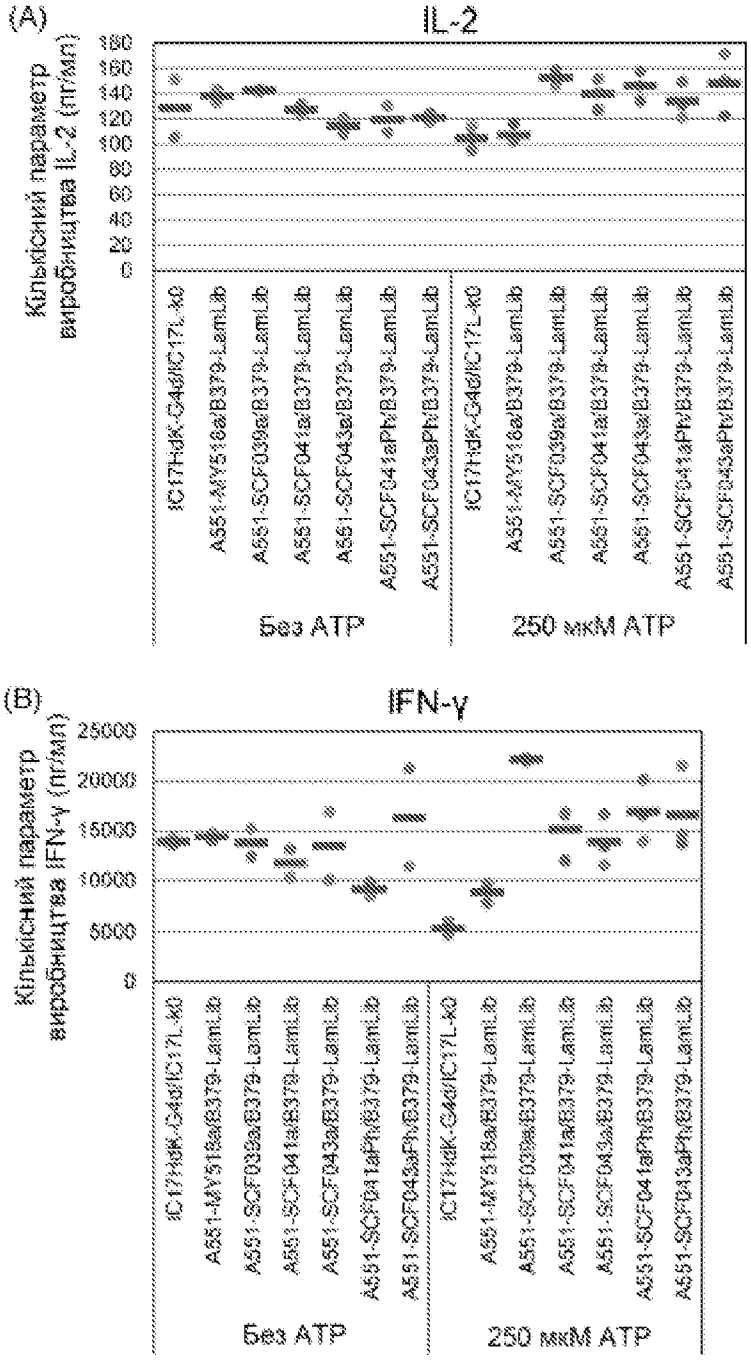
Фіг. 18


(A)
IL-2
Кількісний параметр вироблення IL-2 (пг/мл)
350
300
250
200
150
100
50
0
IC17HuK-G4dPC17L-k0
A551-MY518B2556-LamLib
A551-SCF025aB2556-LamLib
A551-SCF039aB2556-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP
(B)
IFN-γ
Кількісний параметр вироблення IFN-γ (пг/мл)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0

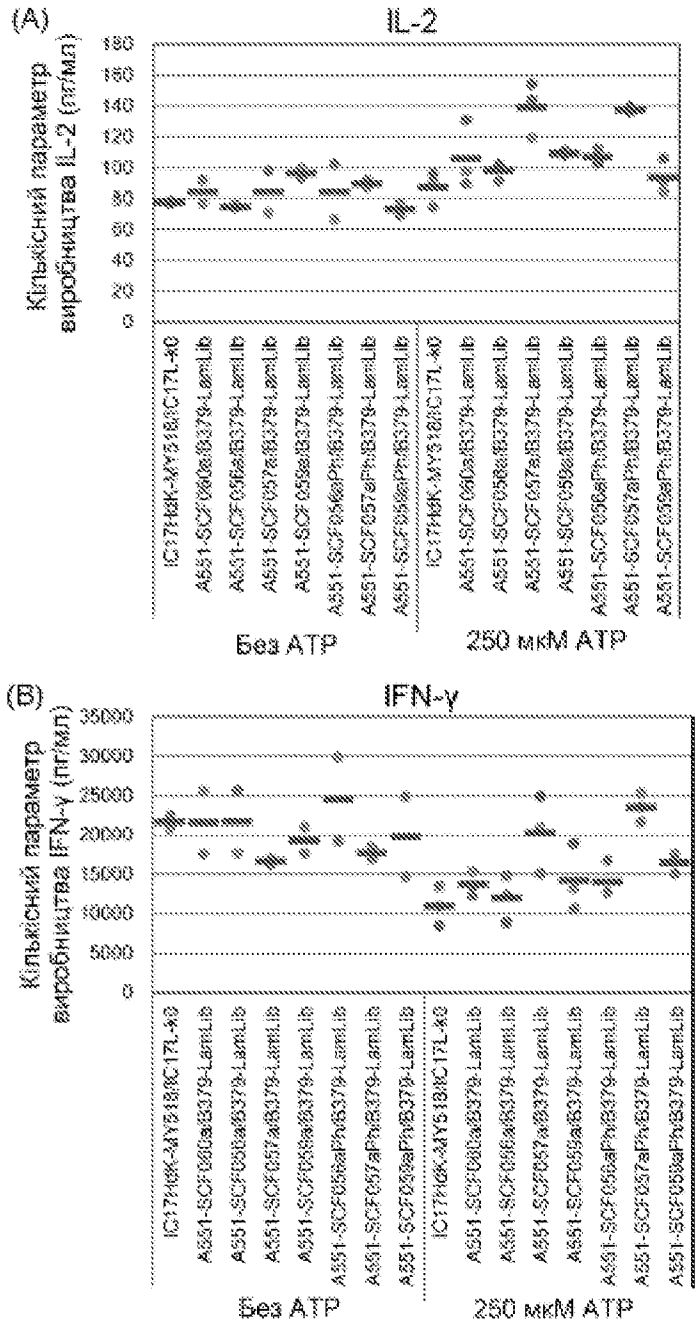
Фіг. 19


(A)
IL-2
Кількісний параметр вироблення IL-2 (пг/мл)
0
100
200
300
400
500
600
700
IC17HBK-MY201IC17L-k0
A551-MY201aPh/B256-LamLib
A551-SCF43aB256-LamLib
A551-MY201aPh/B256-LamLib
A551-SCF041aPh/B256-LamLib
A551-SCF043aPh/B256-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP
(B)
IFN-γ
Кількісний параметр вироблення IFN-γ (пг/мл)
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
IC17-k0k-MY201IC17L-k0
A551-MY201aB/B256-LamLib
A551-SCF43aB/B256-LamLib
A551-MY201aPh/B256-LamLib
A551-SCF041aPh/B256-LamLib
A551-SCF043aPh/B256-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP

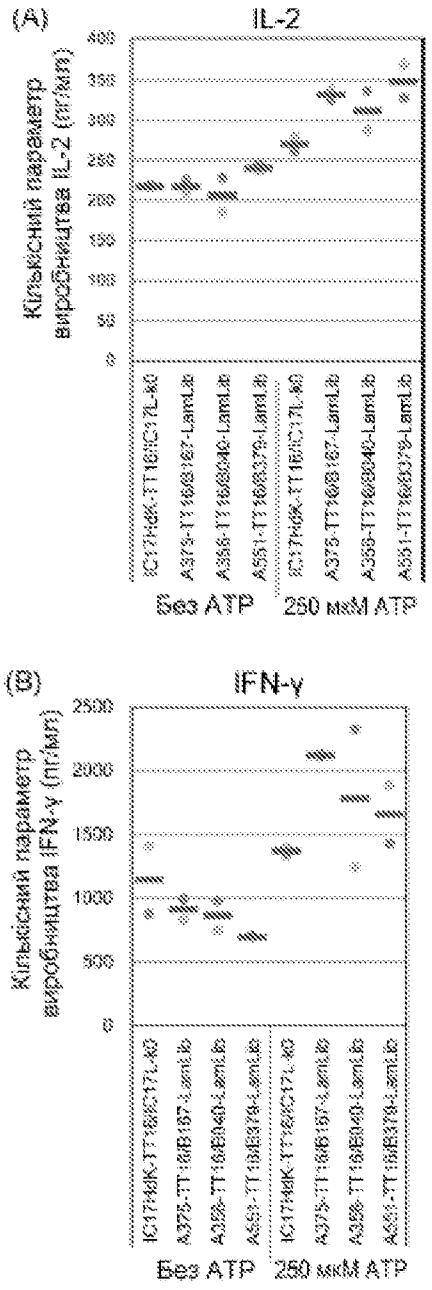
Фіг. 20


(A)
IL-2
Кількісний параметр вироблення IL-2 (пг/мл)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
IC17HdK-C46/IC17L-K0
A551-MY516a/B379-LamLib
A551-SCF039a/B379-LamLib
A551-SCF041a/B379-LamLib
A551-SCF043a/B379-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B379-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP
(B)
IFN-γ
Кількісний параметр вироблення IFN-γ (пг/мл)
0
5000
10000
15000
20000
25000
IC17HdK-C46/IC17L-K0
A551-MY516a/B379-LamLib
A551-SCF039a/B379-LamLib
A551-SCF041a/B379-LamLib
A551-SCF043a/B379-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B379-LamLib
Без ATP
250 мкМ ATP

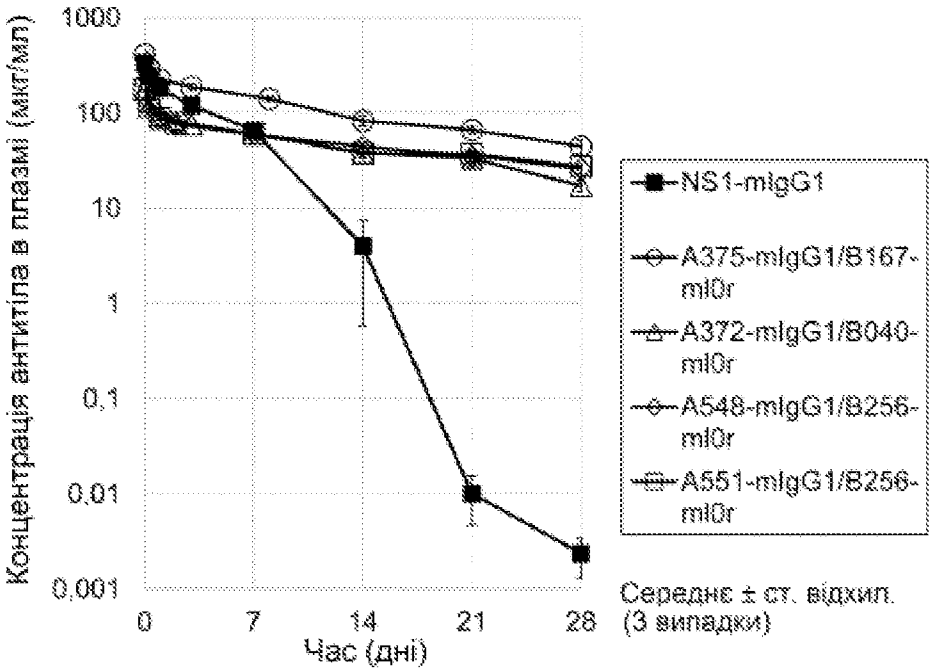
Фіг. 21


(A)
IL-2
Кількісний параметр виробництва IL-2 (пг/мл)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
IC17HdK-MY518/IC17L-40
A551-SCF060aaB3379-Lam1.lib
A551-SCF056aaB3379-Lam1.lib
A551-SCF057aaB3379-Lam1.lib
A551-SCF059aaB3379-Lam1.lib
A551-SCF054aaPrhB3379-Lam1.lib
A551-SCF057aaPrhB3379-Lam1.lib
A551-SCF056aaPrhB3379-Lam1.lib
Без АТР
250 мкМ АТР
(B)
IFN-γ
Кількісний параметр виробництва IFN-γ (пг/мл)
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
IC17HdK-MY518/IC17L-40
A551-SCF060aaB3379-Lam1.lib
A551-SCF056aaB3379-Lam1.lib
A551-SCF057aaB3379-Lam1.lib
A551-SCF059aaB3379-Lam1.lib
A551-SCF054aaPrhB3379-Lam1.lib
A551-SCF057aaPrhB3379-Lam1.lib
A551-SCF056aaPrhB3379-Lam1.lib
Без АТР
250 мкМ АТР

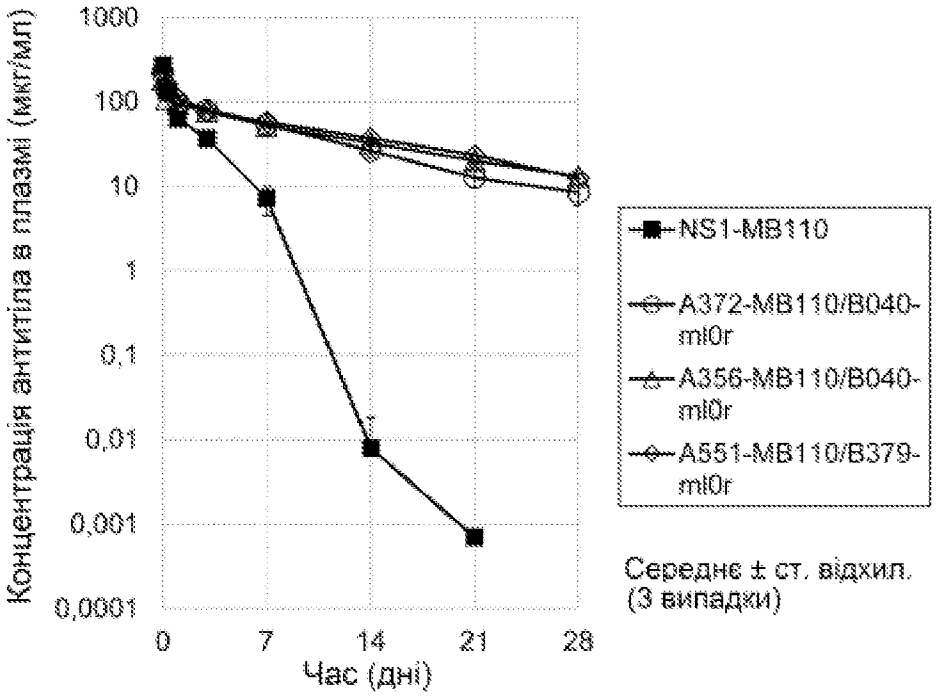
Фіг. 22


(A)
IL-2
Кількісний параметр виробництва IL-2 (пг/мл)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
IC17H6K-TT16ЕС17L-k0
A375-TT16ЕВ187-Lam1.kb
A356-TT16ЕВ040-Lam1.kb
A551-TT16ЕЕ378-Lam1.kb
Без ATP
250 мкМ ATP
(B)
IFN-γ
Кількісний параметр виробництва IFN-γ (пг/мл)
0
500
1000
1500
2000
2500
Без ATP
250 мкМ ATP

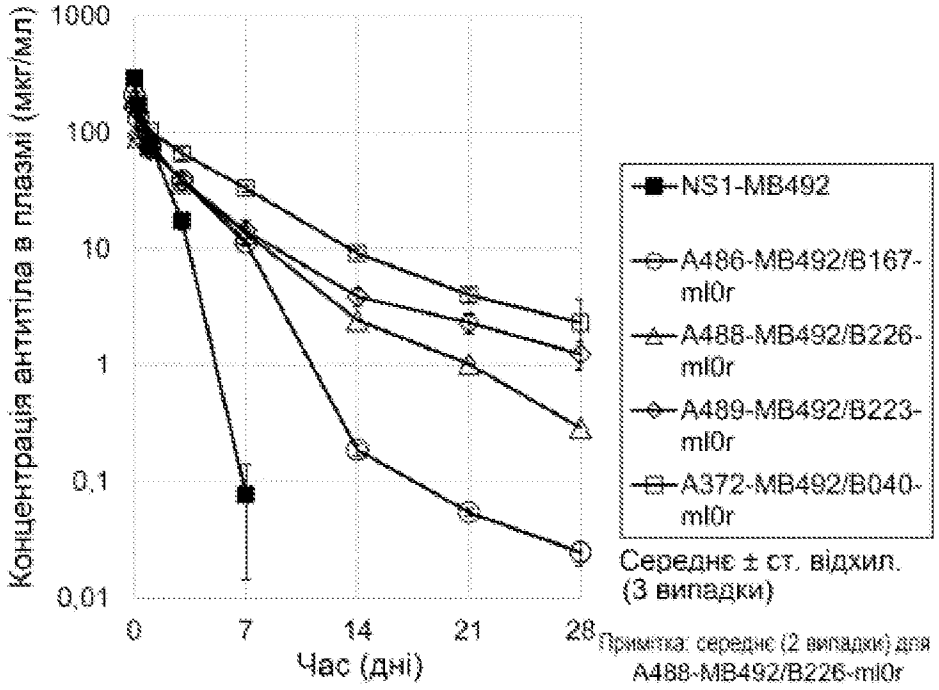
Фіг. 23


Концентрація антитіла в плазмі (мкг/мл)
1000
100
10
1
0,1
0,01
0,001
0
7
14
21
28
Час (дні)
NS1-mIgG1
A375-mIgG1/B167-mI0r
A372-mIgG1/B040-mI0r
A548-mIgG1/B256-mI0r
A551-mIgG1/B256-mI0r
Середнє ± ст. відхил. (3 випадки)

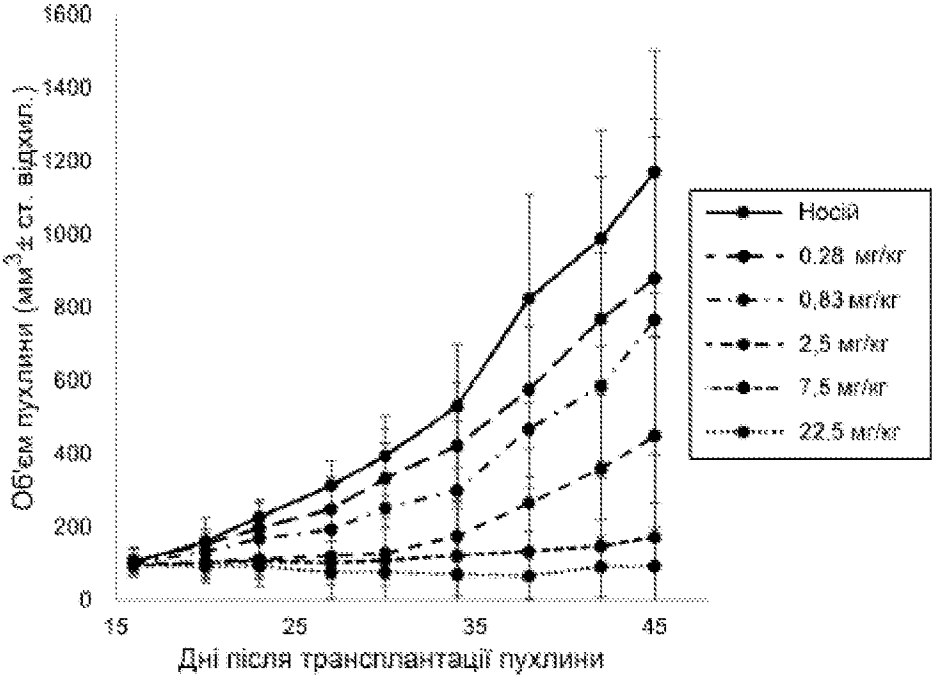
Фіг. 24


Концентрація антитіла в плазмі (мкг/мл)
1000
100
10
1
0,1
0,01
0,001
0,0001
0
7
14
21
28
Час (дні)
NS1-MB110
A372-MB110/B040-mI0r
A356-MB110/B040-mI0r
A551-MB110/B379-mI0r
Середнє ± ст. відхил. (3 випадки)

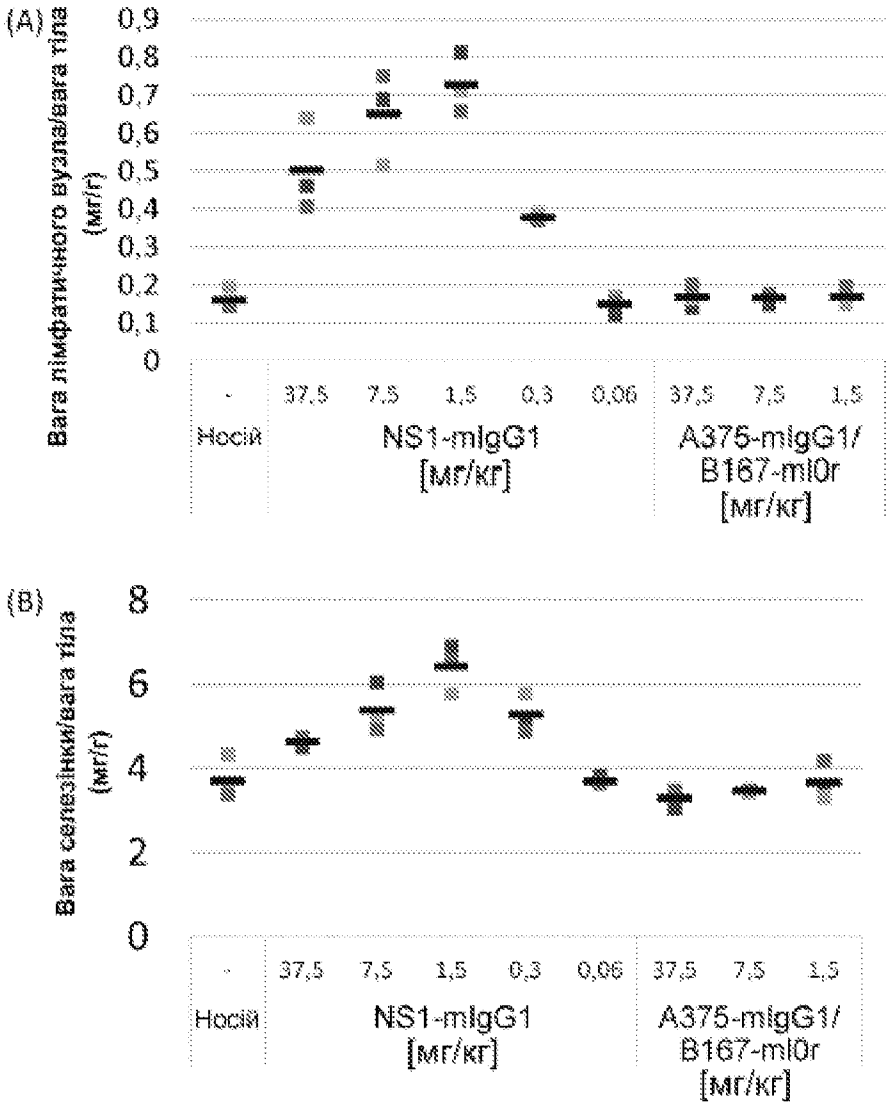
Фіг. 25


Концентрація антитіла в плазмі (мкг/мл)
1000
100
10
1
0,1
0,01
0
7
14
21
28
Час (дні)
NS1-MB492
A486-MB492/B167-ml0r
A488-MB492/B226-ml0r
A489-MB492/B223-ml0r
A372-MB492/B040-ml0r
Середнє ± ст. відхил. (3 випадки)
Примітка: середнє (2 випадки) для A488-MB492/B226-ml0r

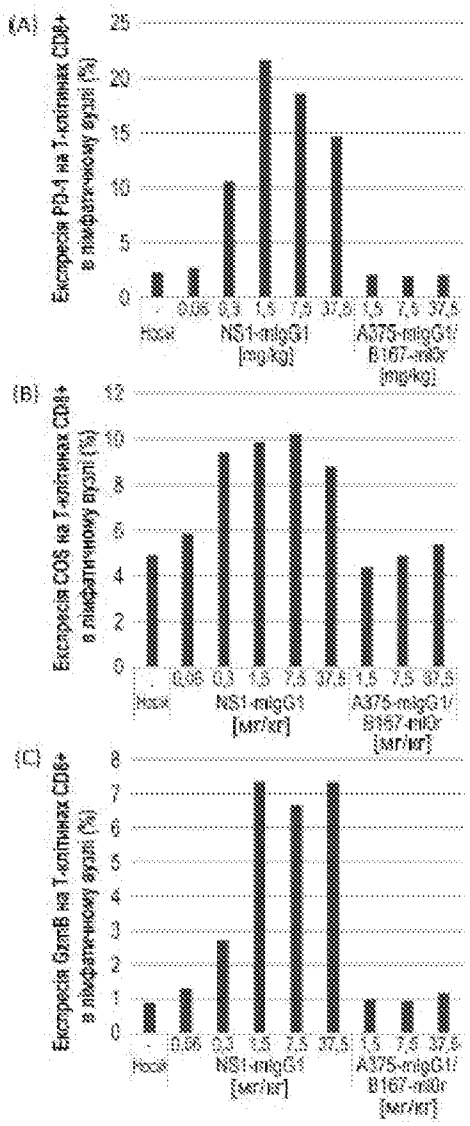
Фіг. 26


Об'єм пухлини (мм3 ± ст. відхил.)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
15
25
35
45
Дні після трансплантації пухлини
Носій
0,28 мг/кг
0,83 мг/кг
2,5 мг/кг
7,5 мг/кг
22,5 мг/кг

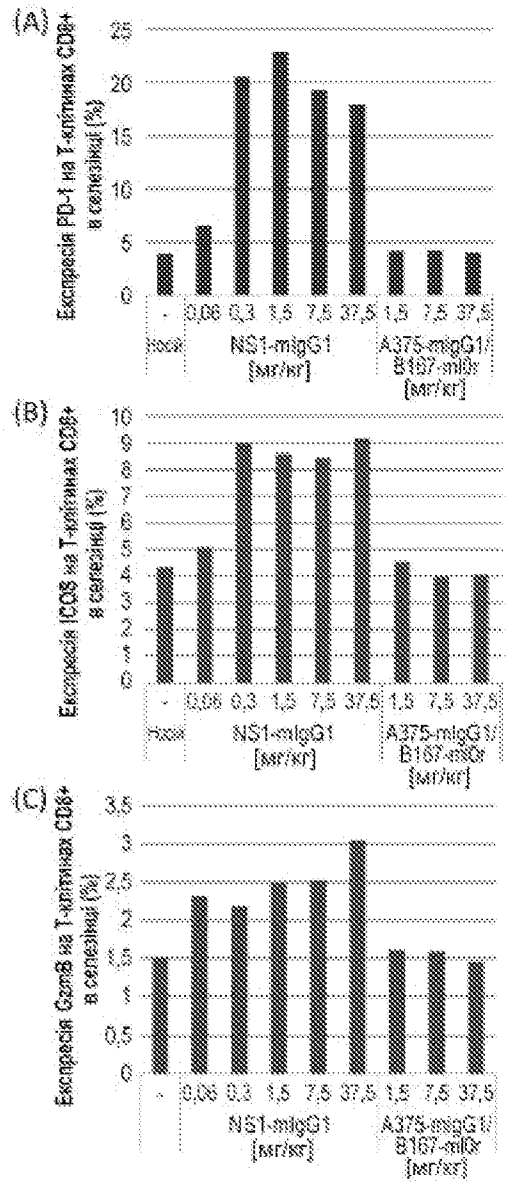
Фіг. 27


(A)
Вага лімфатичного вузла/вага тіла (мг/г)
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
-
Носій
37,5
7,5
1,5
0,3
0,06
37,5
7,5
1,5
NS1-mIgG1 [мг/кг]
A375-mIgG1/ B167-mI0r [мг/кг]
(B)
Вага селезінки/вага тіла (мг/г)
8
6
4
2
0
-
Носій
37,5
7,5
1,5
0,3
0,06
37,5
7,5
1,5
NS1-mIgG1 [мг/кг]
A375-mIgG1/ B167-mI0r [мг/кг]

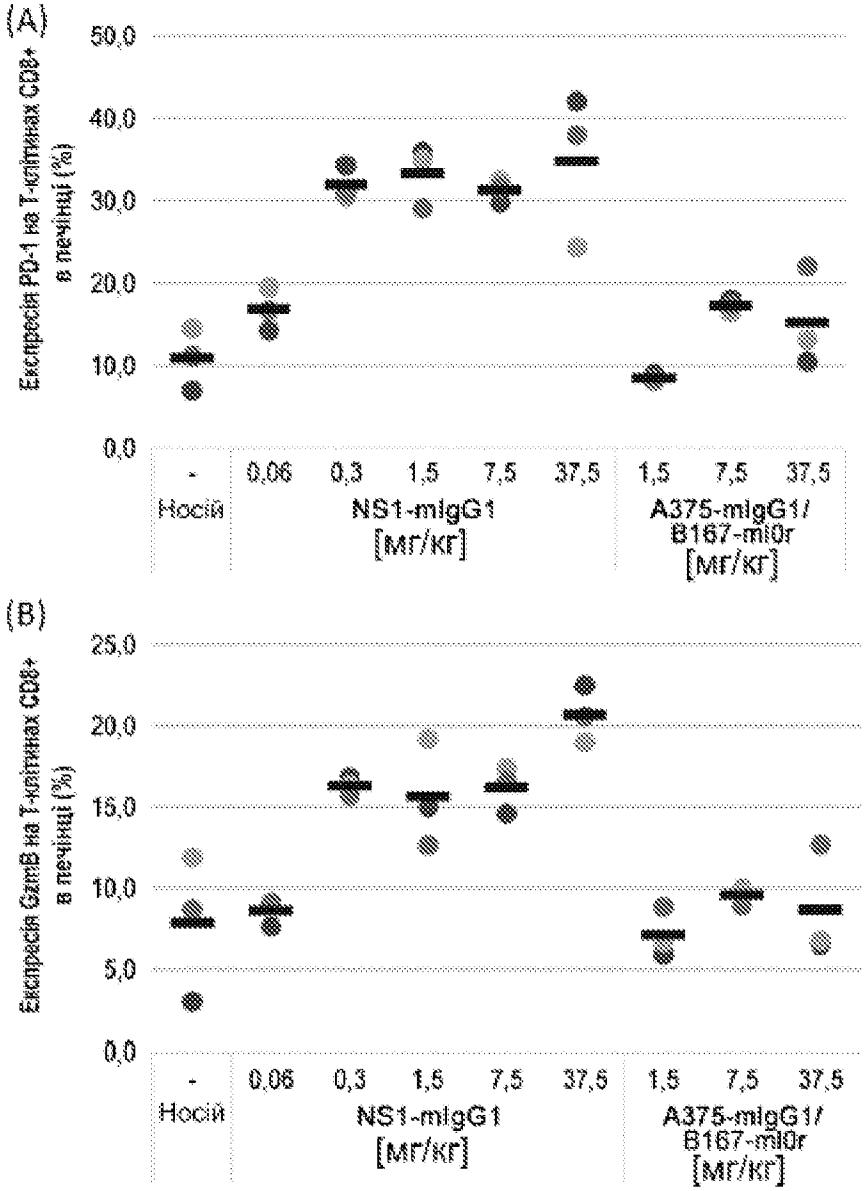
Фіг. 28


(A)
Експресія PD-1 на Т-клітинах CD8+ в пухлинному вогнищі (%)
25
20
15
10
5
0
-
0,05
0,3
1,5
7,5
37,5
1,5
7,5
37,5
Носій
NS1-mIgG1 [mg/kg]
A375-mIgG1/ B167-miR [mg/kg]
(B)
Експресія CD8 на Т-клітинах CD8+ в пухлинному вогнищі (%)
12
10
8
6
4
2
0
-
0,05
0,3
1,5
7,5
37,5
1,5
7,5
37,5
Носій
NS1-mIgG1 [мг/кг]
A375-mIgG1/ B167-miR [мг/кг]
(C)
Експресія GzmB на Т-клітинах CD8+ в пухлинному вогнищі (%)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-
0,05
0,3
1,5
7,5
37,5
1,5
7,5
37,5
Носій
NS1-mIgG1 [мг/кг]
A375-mIgG1/ B167-miR [мг/кг]

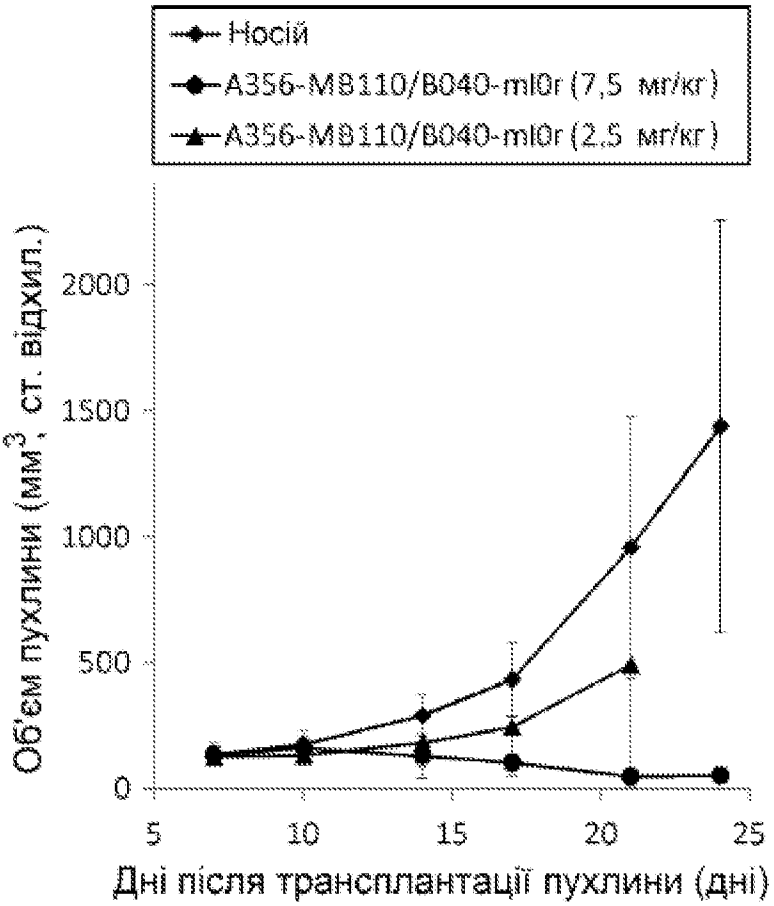
Фіг. 29


(A)
Експресія PD-1 на Т-клітинах CD8+ в селезінці (%)
25
20
15
10
5
0
-
0,06
0,3
1,5
7,5
37,5
1,5
7,5
37,5
Носій
NS1-mIgG1 [мг/кг]
A375-mIgG1/ B167-mIOr [мг/кг]
(B)
Експресія ICOS на Т-клітинах CD8+ в селезінці (%)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-
0,06
0,3
1,5
7,5
37,5
1,5
7,5
37,5
Носій
NS1-mIgG1 [мг/кг]
A375-mIgG1/ B167-mIOr [мг/кг]
(C)
Експресія GzmB на Т-клітинах CD8+ в селезінці (%)
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
-
0,06
0,3
1,5
7,5
37,5
1,5
7,5
37,5
NS1-mIgG1 [мг/кг]
A375-mIgG1/ B167-mIOr [мг/кг]

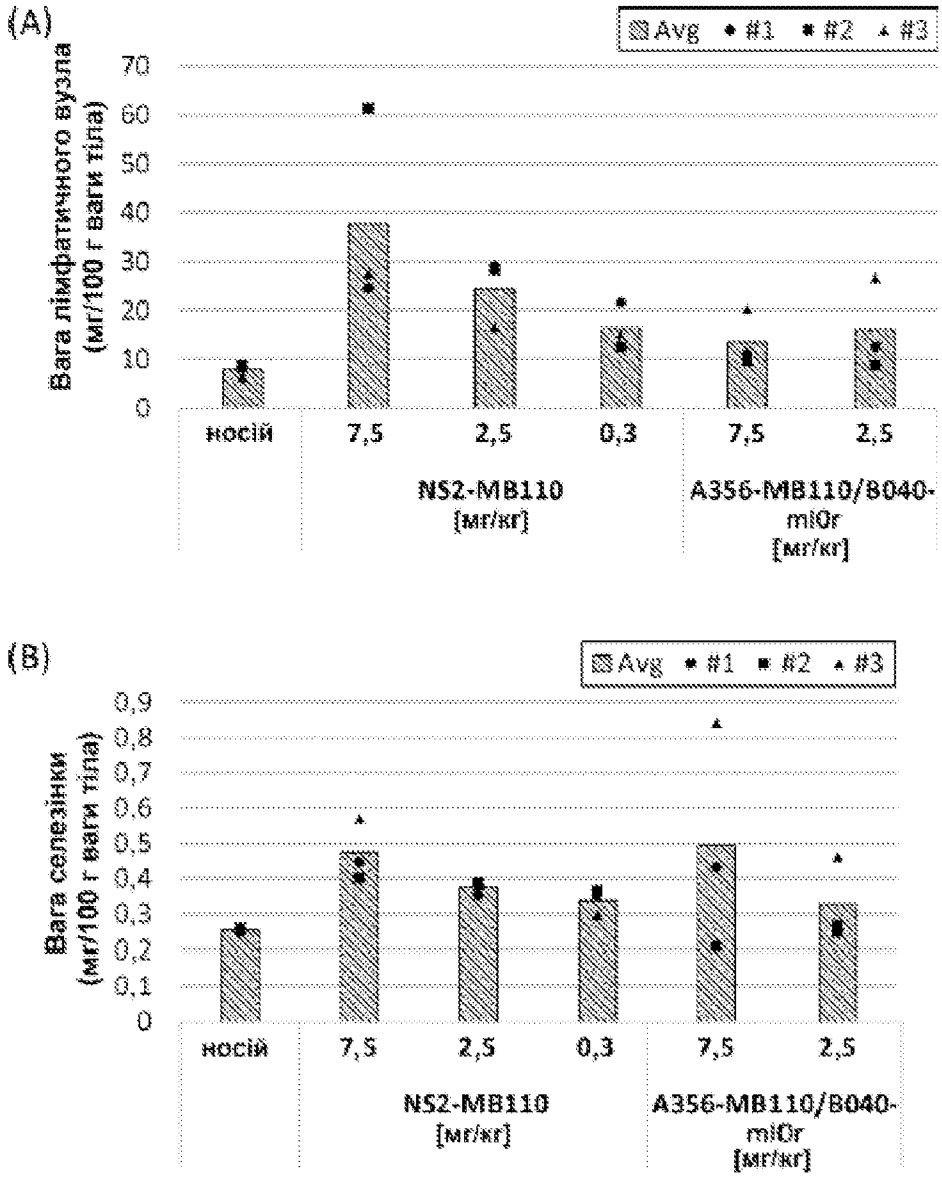
Фіг. 30


(A)
Експресія PD-1 на Т-клітинах CD8+ в печінці (%)
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
-
Носій
0,06
0,3
1,5
7,5
37,5
NS1-mIgG1
[мг/кг]
1,5
7,5
37,5
A375-mIgG1/
B167-mI0r
[мг/кг]
(B)
Експресія GzmB на Т-клітинах CD8+ в печінці (%)
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
-
Носій
0,06
0,3
1,5
7,5
37,5
NS1-mIgG1
[мг/кг]
1,5
7,5
37,5
A375-mIgG1/
B167-mI0r
[мг/кг]

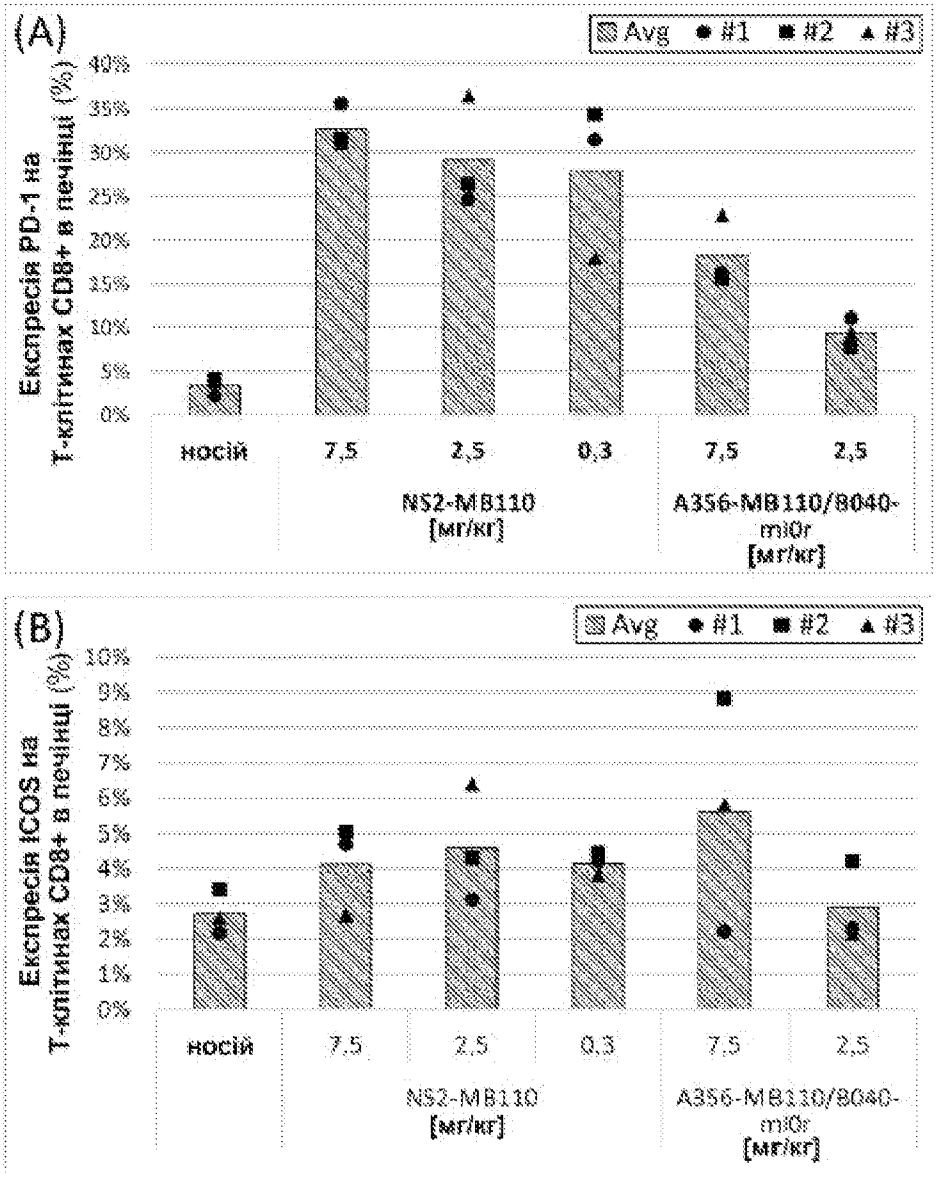
Фіг. 31


Носій
A356-MB110/B040-ml0r (7,5 мг/кг)
A356-MB110/B040-ml0r (2,5 мг/кг)
Об'єм пухлини (мм3, ст. відхил.)
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
Дні після трансплантації пухлини (дні)

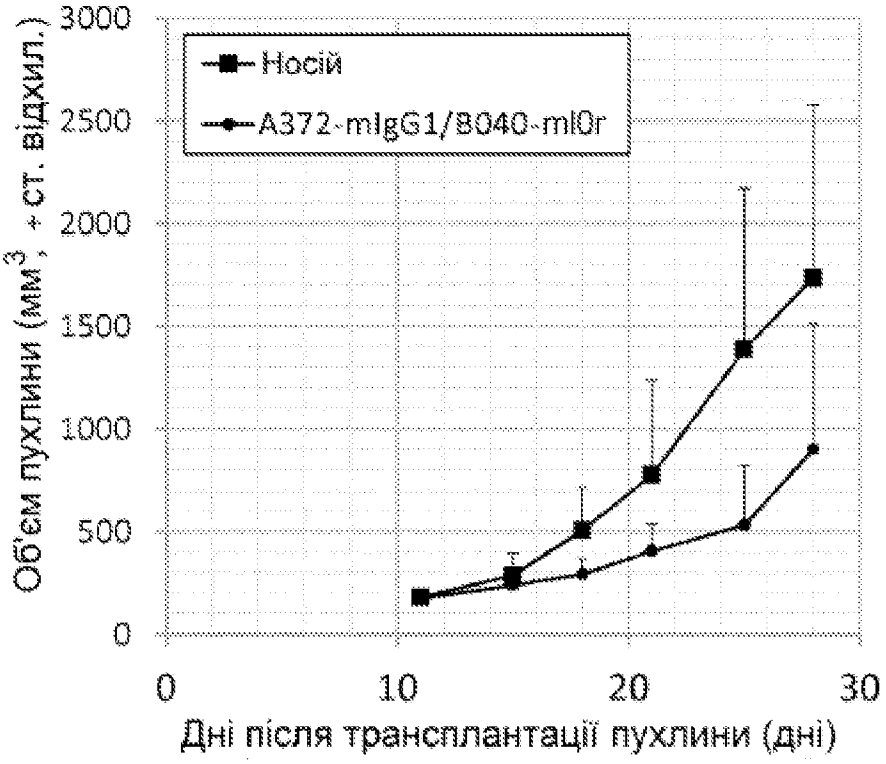
Фіг. 32


(A)
Avg
#1
#2
#3
Вага лімфатичного вузла (мг/100 г ваги тіла)
70
60
50
40
30
20
10
0
носій
7,5
2,5
0,3
7,5
2,5
NS2-MB110 [мг/кг]
A356-MB110/B040-miOr [мг/кг]
(B)
Avg
#1
#2
#3
Вага селезінки (мг/100 г ваги тіла)
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
носій
7,5
2,5
0,3
7,5
2,5
NS2-MB110 [мг/кг]
A356-MB110/B040-miOr [мг/кг]

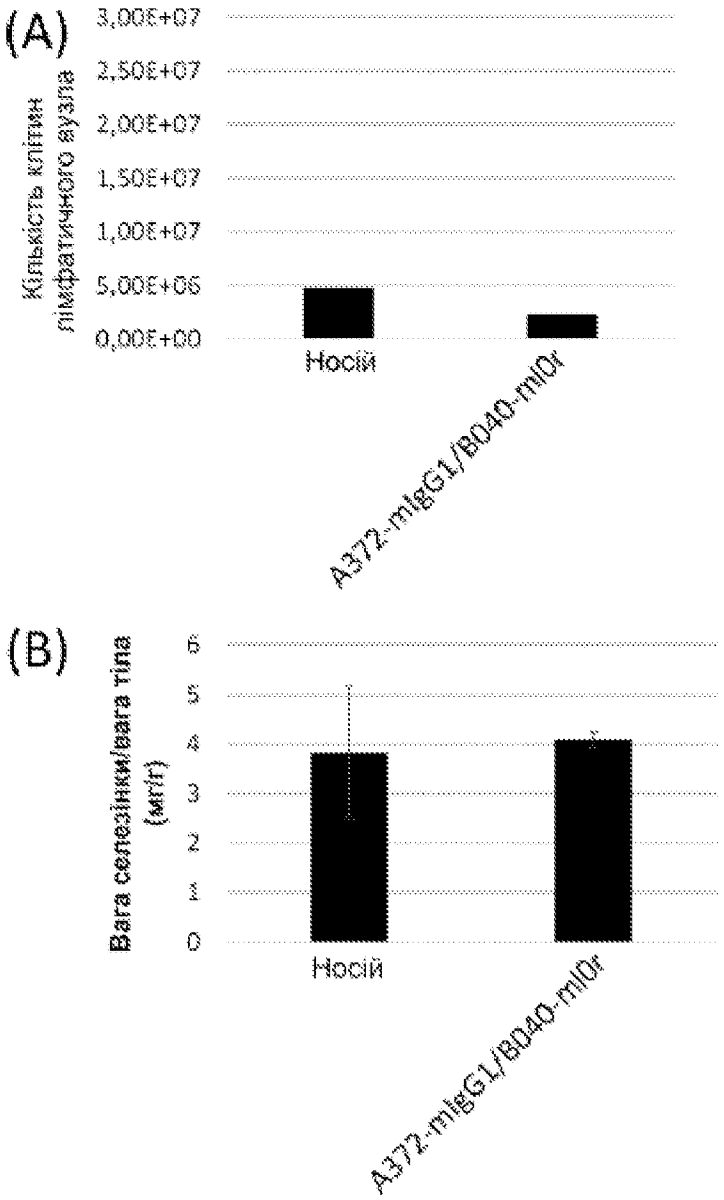
Фіг. 33


(A)
Avg
#1
#2
#3
Експресія PD-1 на Т-клітинах CD8+ в печінці (%)
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
носій
7,5
2,5
0,3
7,5
2,5
N52-MB110 [мг/кг]
A356-MB110/8040-m0r [мг/кг]
(B)
Avg
#1
#2
#3
Експресія ICOS на Т-клітинах CD8+ в печінці (%)
10%
9%
8%
7%
6%
5%
4%
3%
2%
1%
0%
носій
7,5
2,5
0,3
7,5
2,5
N52-MB110 [мг/кг]
A356-MB110/8040-m0r [мг/кг]

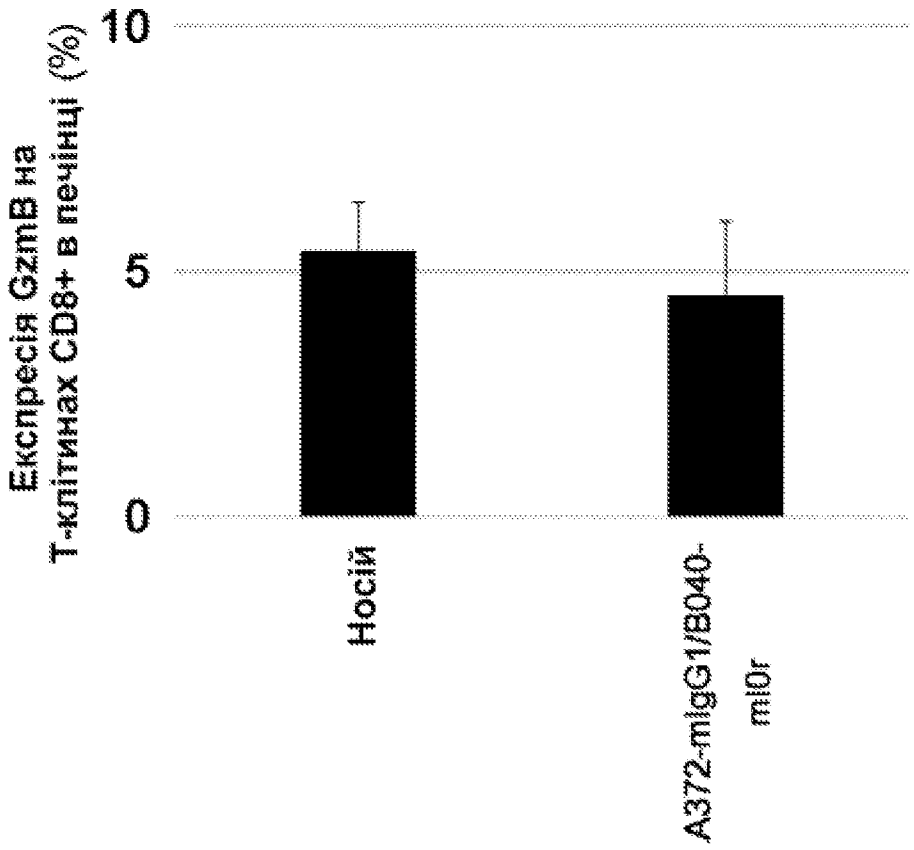
Фіг. 34


Носій
A372-mIgG1/B040-mI0r
Об'єм пухлини (мм3, ± ст. відхил.)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
Дні після трансплантації пухлини (дні)

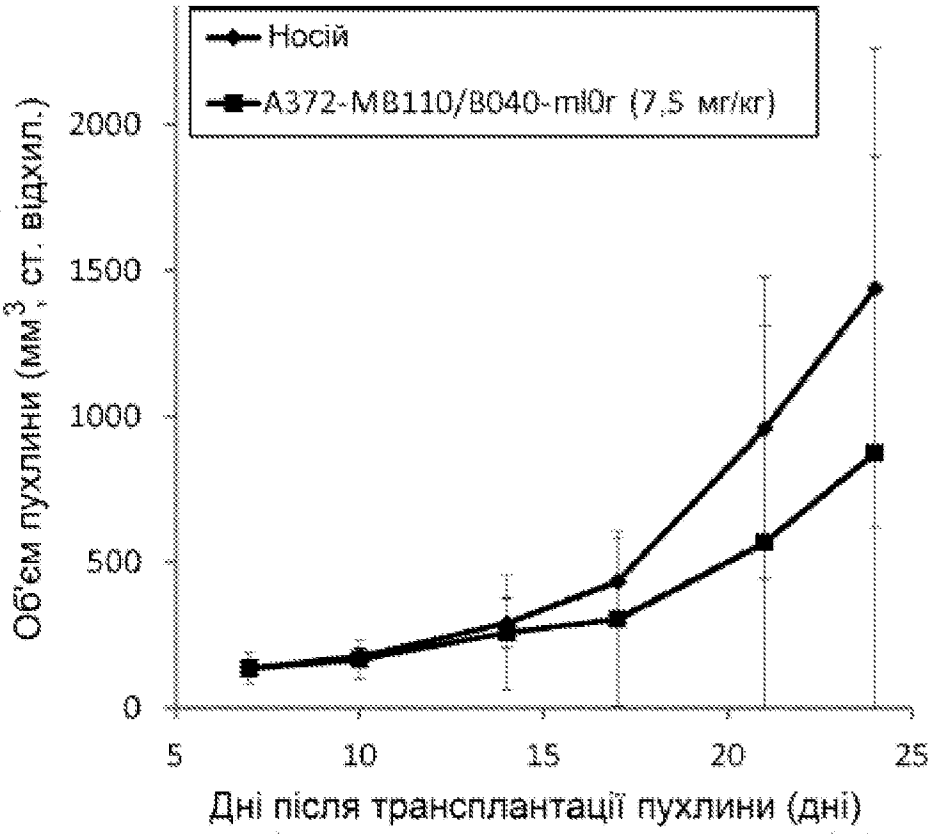
Фіг. 35


(A)
Кількість клітин лімфатичного вузла
3,00E+07
2,50E+07
2,00E+07
1,50E+07
1,00E+07
5,00E+06
0,00E+00
Носій
A372-mIgG1/BD40-mI0r
(B)
Вага селезінки/вага тіла (мг/г)
6
5
4
3
2
1
0
Носій
A372-mIgG1/BD40-mI0r

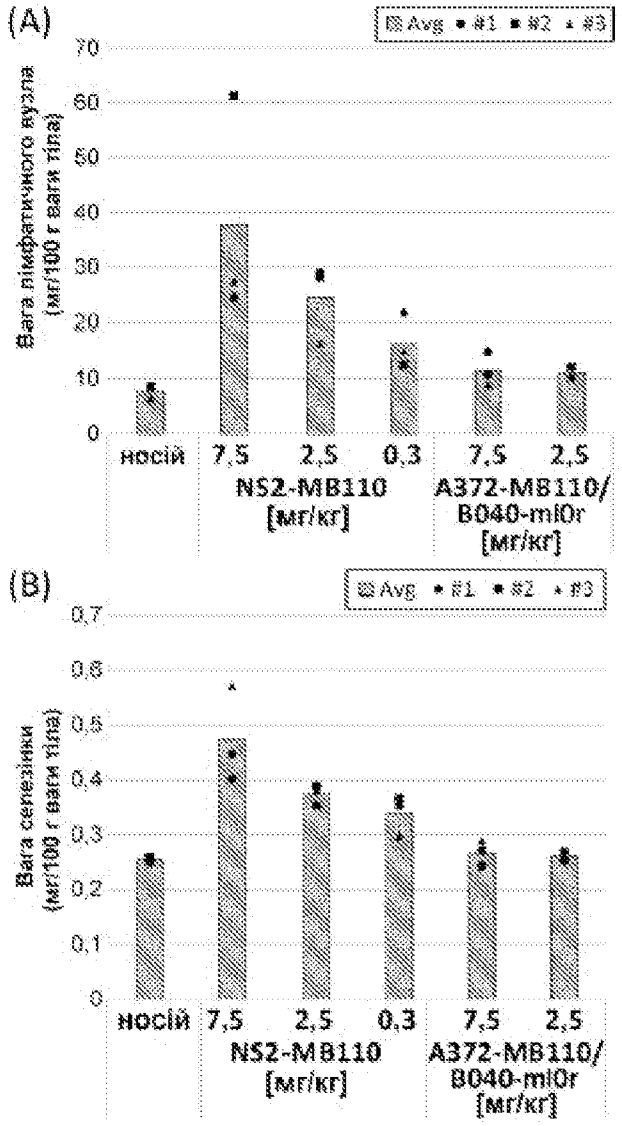
Фіг. 36


Експресія GzmB на Т-клітинах CD8+ в печінці (%)
10
5
0
Носій
A372-mIgG1/B040-mI0r

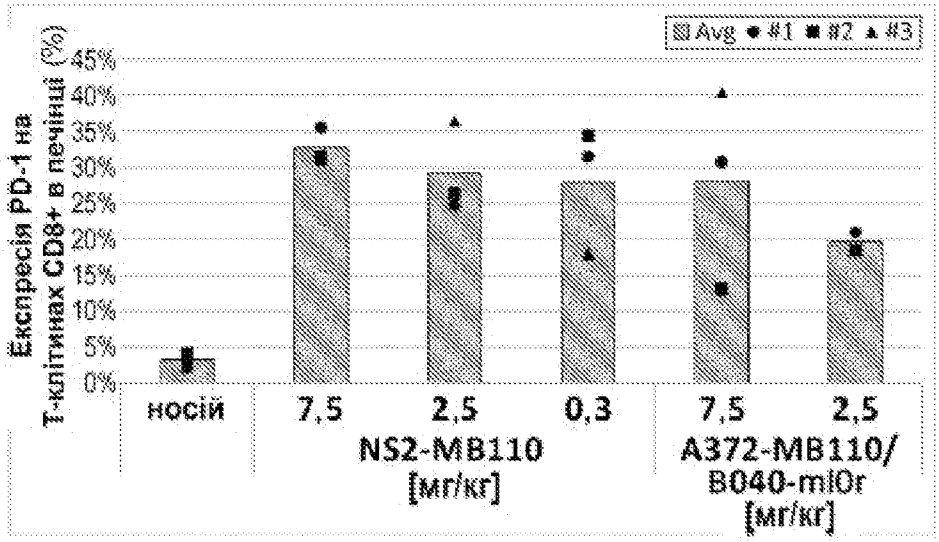
Фіг. 37


Носій
A372-MB110/B040-ml0r (7,5 мг/кг)
Об'єм пухлини (мм3, ст. відхил.)
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
Дні після трансплантації пухлини (дні)

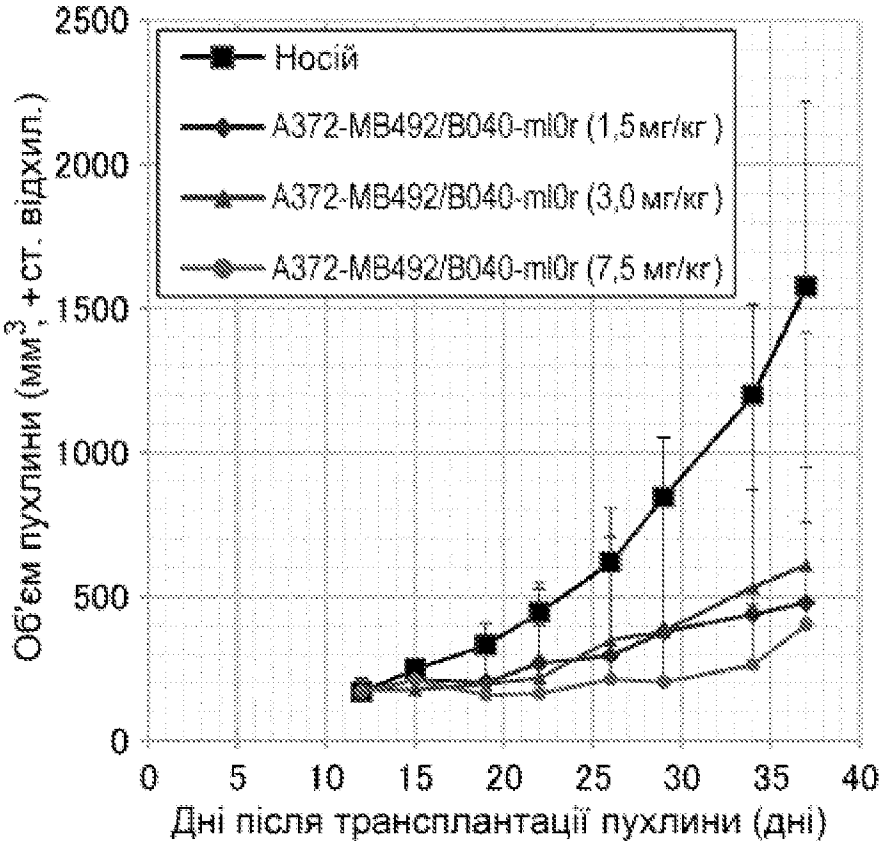
Фіг. 38


(A)
Avg #1 #2 #3
Вага лімфатичного вузла (мг/100 г ваги тіла)
70
60
50
40
30
20
10
0
носій
7,5
2,5
0,3
7,5
2,5
NS2-MB110 [мг/кг]
A372-MB110/ B040-mIOr [мг/кг]
(B)
Avg #1 #2 #3
Вага селезінки (мг/100 г ваги тіла)
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
носій
7,5
2,5
0,3
7,5
2,5
NS2-MB110 [мг/кг]
A372-MB110/ B040-mIOr [мг/кг]

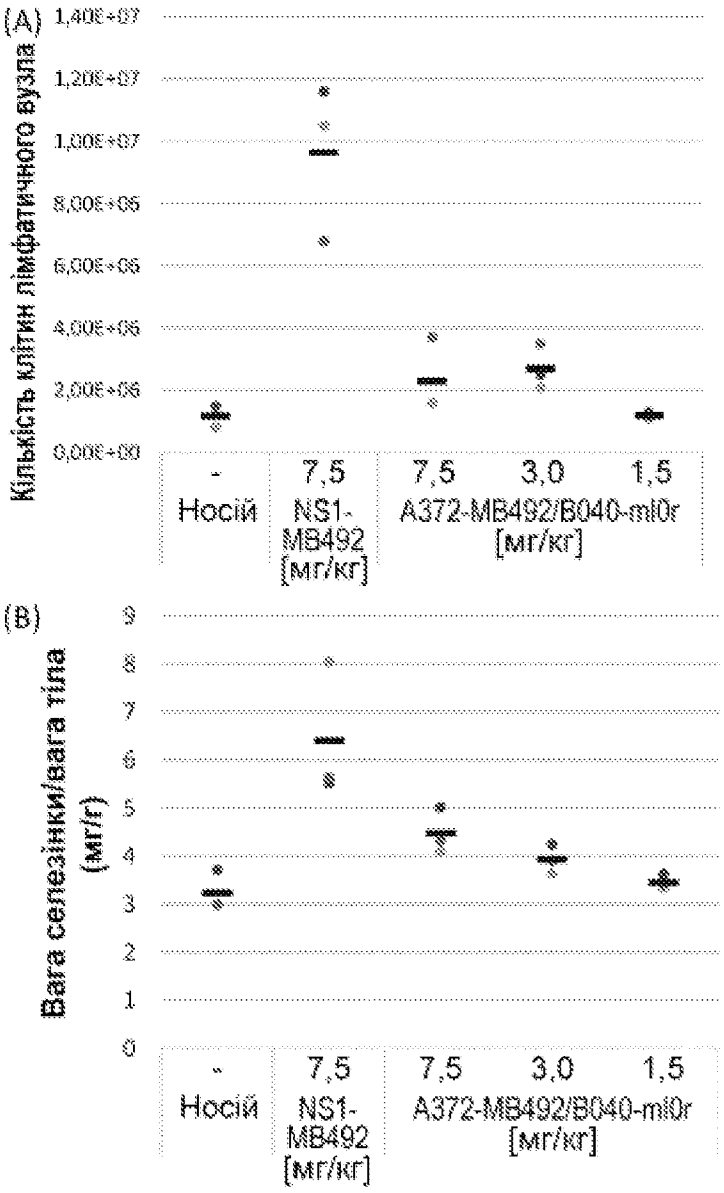
Фіг. 39


Avg #1 #2 #3
Експресія PD-1 на Т-клітинах CD8+ в печінці (%)
45%
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
носій
7,5
2,5
0,3
7,5
2,5
NS2-MB110 [мг/кг]
A372-MB110/B040-mIOr [мг/кг]

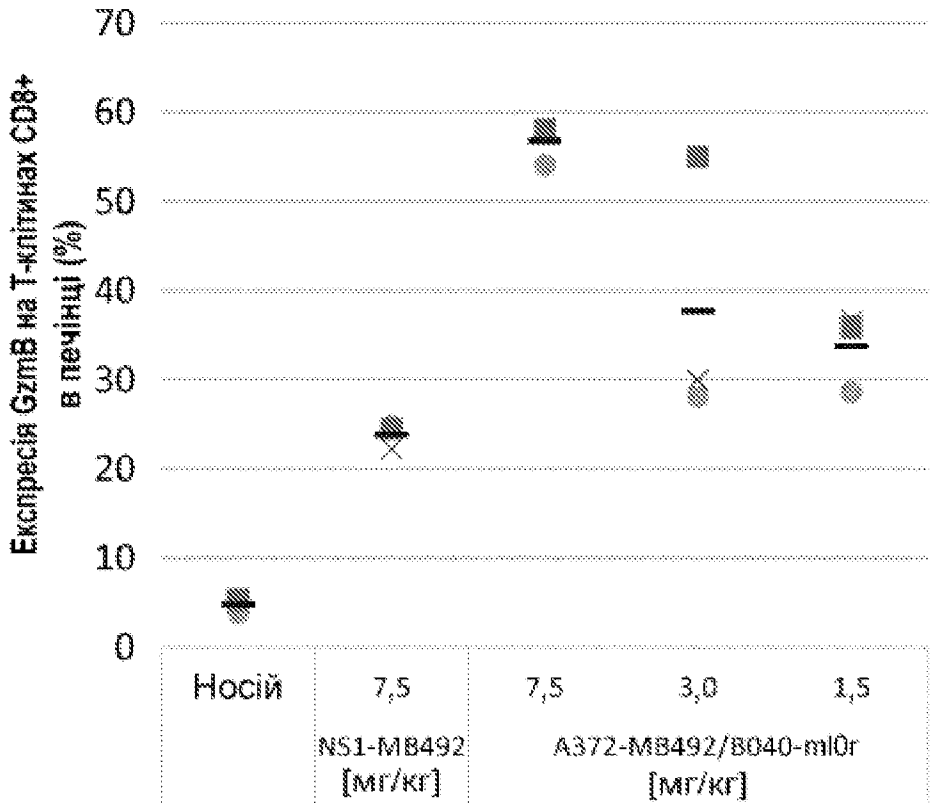
Фіг. 40


Носій
A372-MB492/B040-mIOr (1,5 мг/кг)
A372-MB492/B040-mIOr (3,0 мг/кг)
A372-MB492/B040-mIOr (7,5 мг/кг)
Об'єм пухлини (мм3, + ст. відхил.)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Дні після трансплантації пухлини (дні)

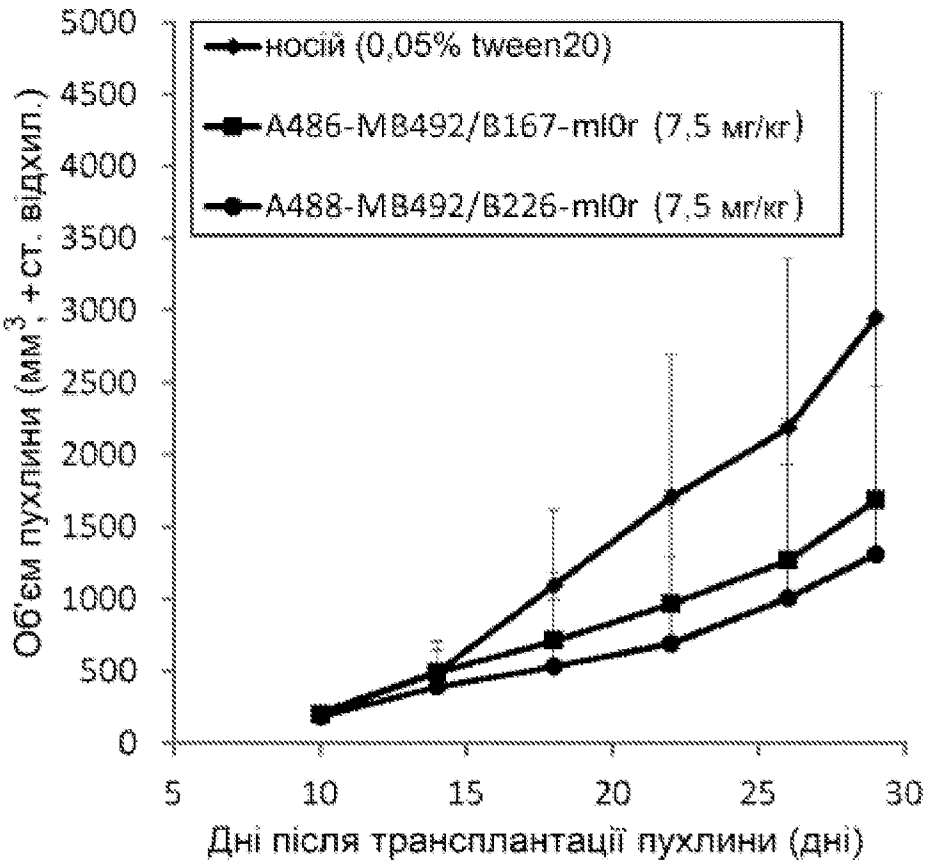
Фіг. 41


(A)
Кількість клітин лімфатичного вузла
1,40E+07
1,20E+07
1,00E+07
8,00E+06
6,00E+06
4,00E+06
2,00E+06
0,00E+00
-
Носій
7,5
NS1-MB492 [мг/кг]
7,5
3,0
1,5
A372-MB492/B040-mI0r [мг/кг]
(B)
Вага селезінки/вага тіла (мг/г)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-
Носій
7,5
NS1-MB492 [мг/кг]
7,5
3,0
1,5
A372-MB492/B040-mI0r [мг/кг]

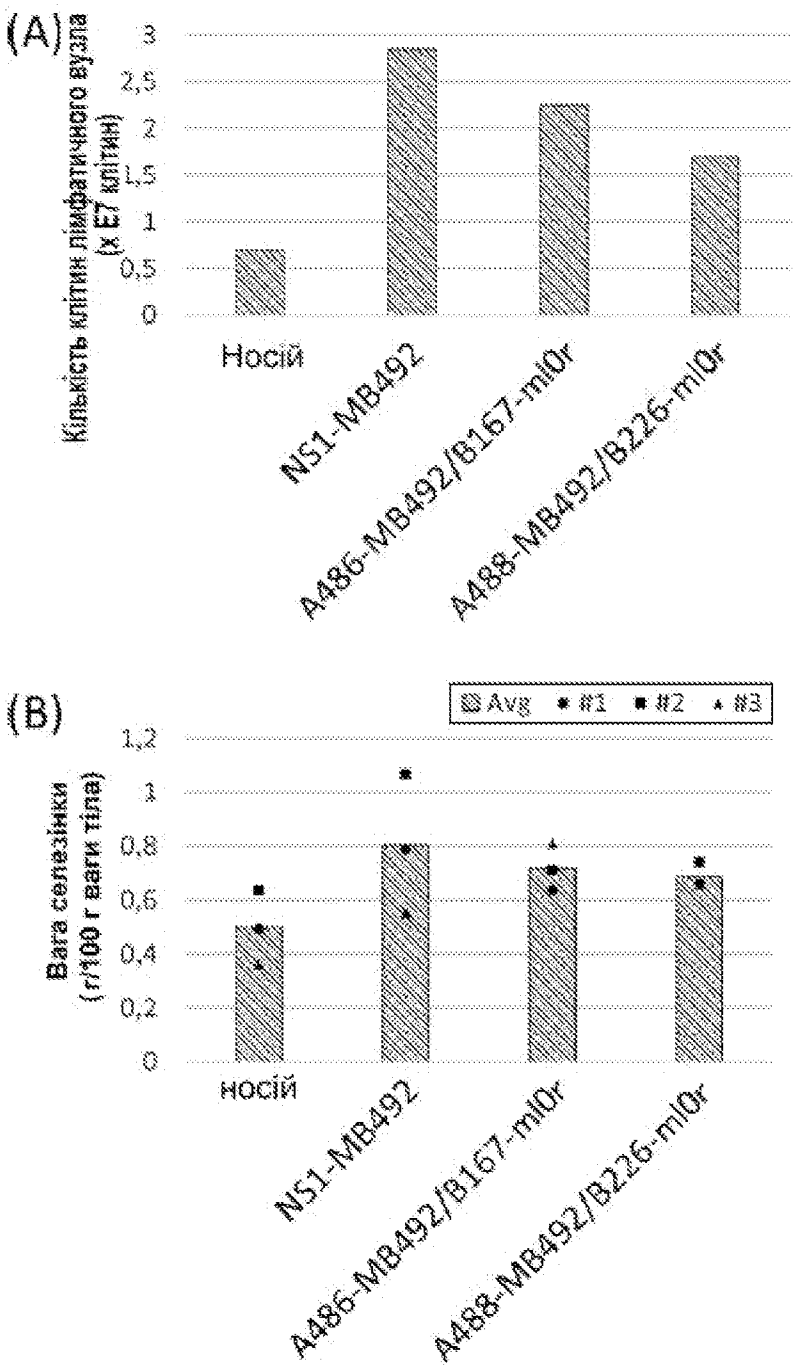
Фіг. 42


Експресія GzmB на Т-клітинах CD8+ в печінці (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
Носій
7,5
N51-MB492 [мг/кг]
7,5
3,0
1,5
A372-MB492/B040-ml0r [мг/кг]

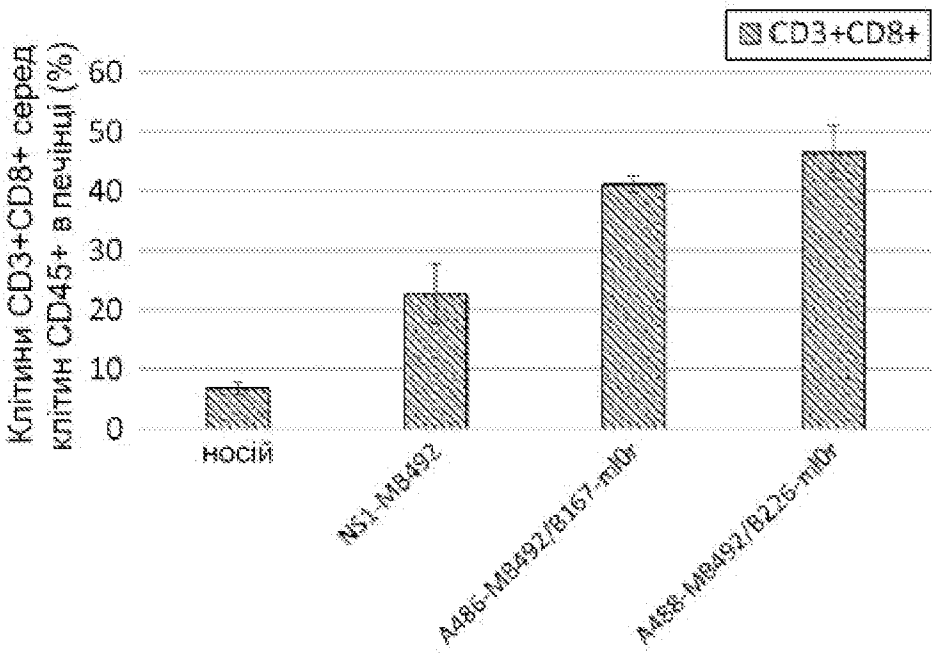
Фіг. 43


носій (0,05% tween20)
A486-MB492/B167-ml0r (7,5 мг/кг)
A488-MB492/B226-ml0r (7,5 мг/кг)
Об'єми пухлини (мм3, + ст. відхил.)
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
30
Дні після трансплантації пухлини (дні)

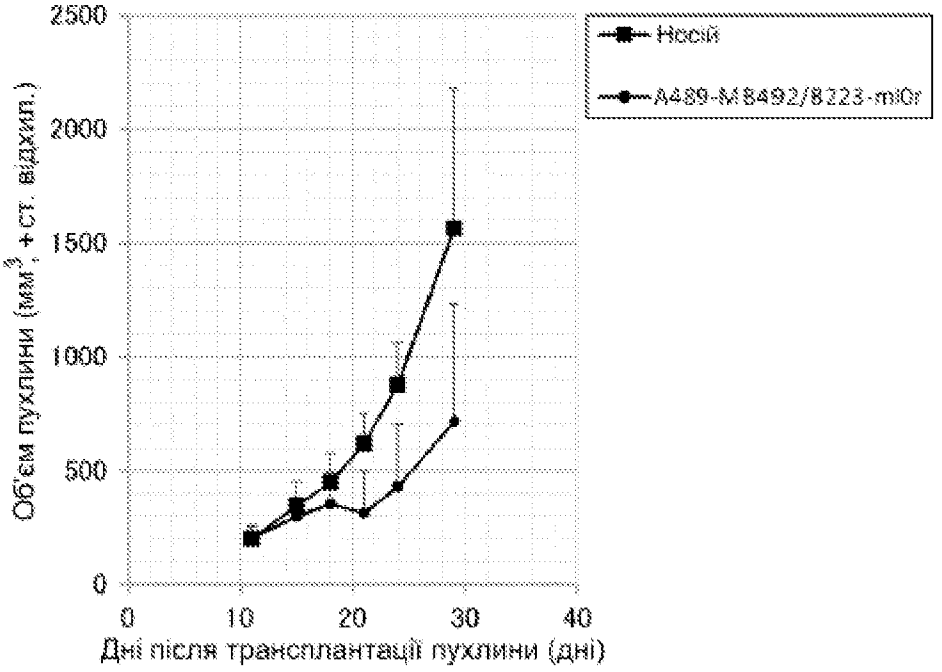
Фіг. 44


(A)
Кількість клітин лімфатичного вузла (x E7 клітин)
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Носій
N51-MB492
A486-MB492/B167-ml0r
A488-MB492/B226-ml0r
(B)
Avg
#1
#2
#3
Вага селезінки (г/100 г ваги тіла)
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
носій
N51-MB492
A486-MB492/B167-ml0r
A488-MB492/B226-ml0r

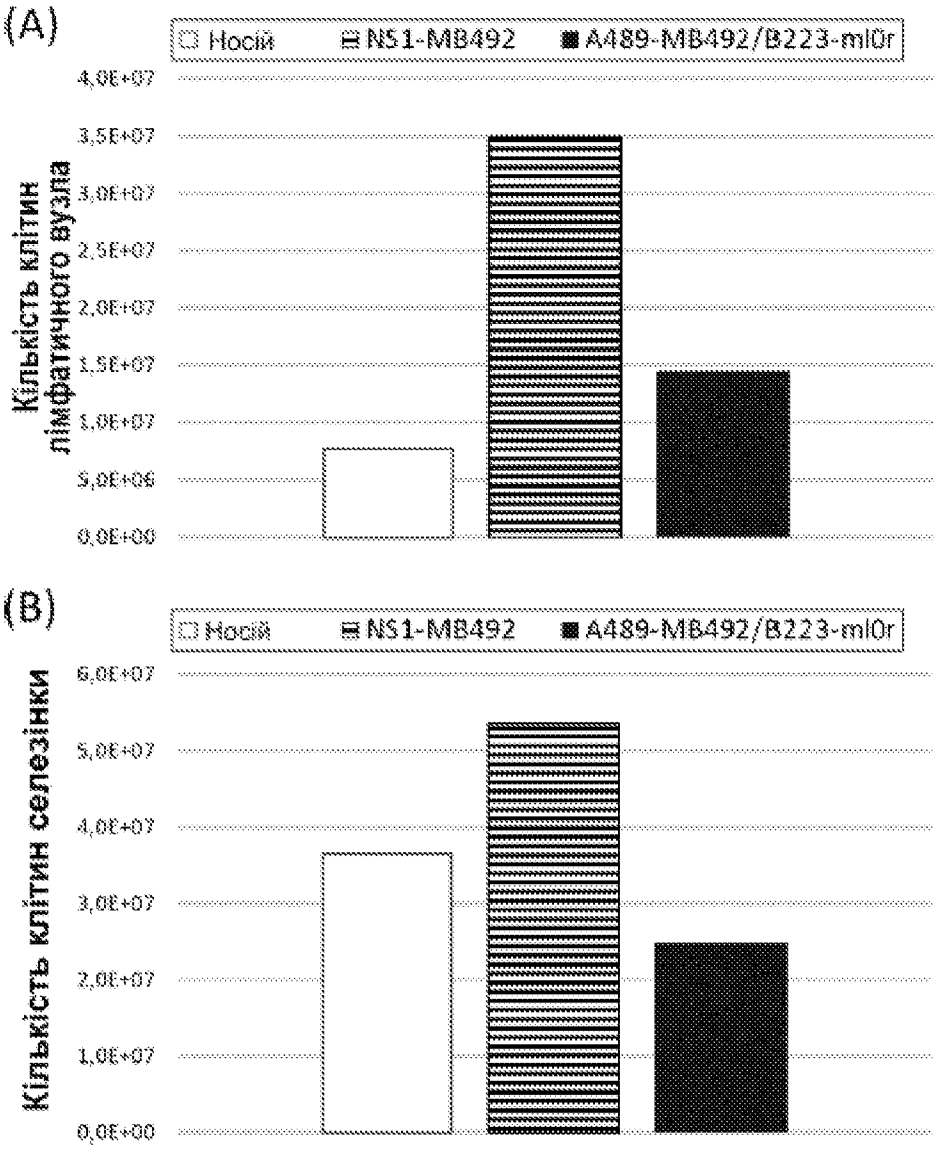
Фіг. 45


CD3+CD8+
Клітини CD3+CD8+ серед клітин CD45+ в печінці (%)
60
50
40
30
20
10
0
носій
NS1-MB492
A486-MB492/B167-mIgG
A488-MB492/B226-mIgG

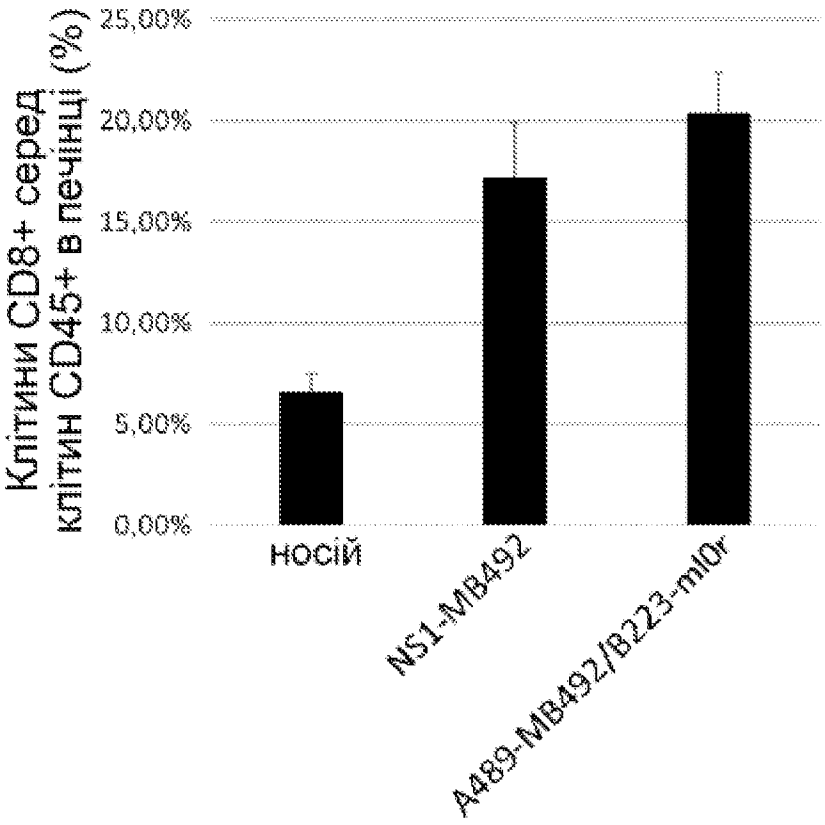
Фіг. 46


Носій
A489-MB492/8223-mIgG
2500
2000
1500
1000
500
0
Об'єм пухлини (мм³, + ст. відхил.)
0
10
20
30
40
Дні після трансплантації пухлини (дні)

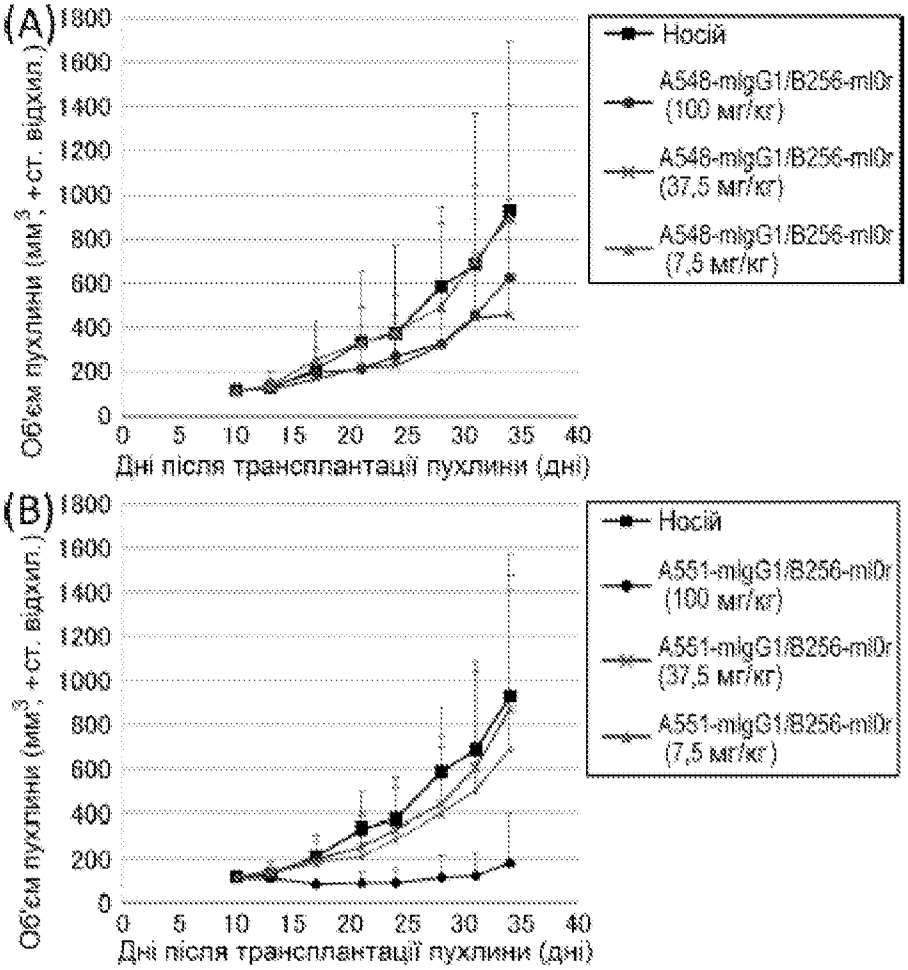
Фіг. 47


(A)
Носій
NS1-MB492
A489-MB492/B223-ml0r
Кількість клітин лімфатичного вузла
4,0E+07
3,5E+07
3,0E+07
2,5E+07
2,0E+07
1,5E+07
1,0E+07
5,0E+06
0,0E+00
(B)
Носій
NS1-MB492
A489-MB492/B223-ml0r
Кількість клітин селезінки
6,0E+07
5,0E+07
4,0E+07
3,0E+07
2,0E+07
1,0E+07
0,0E+00

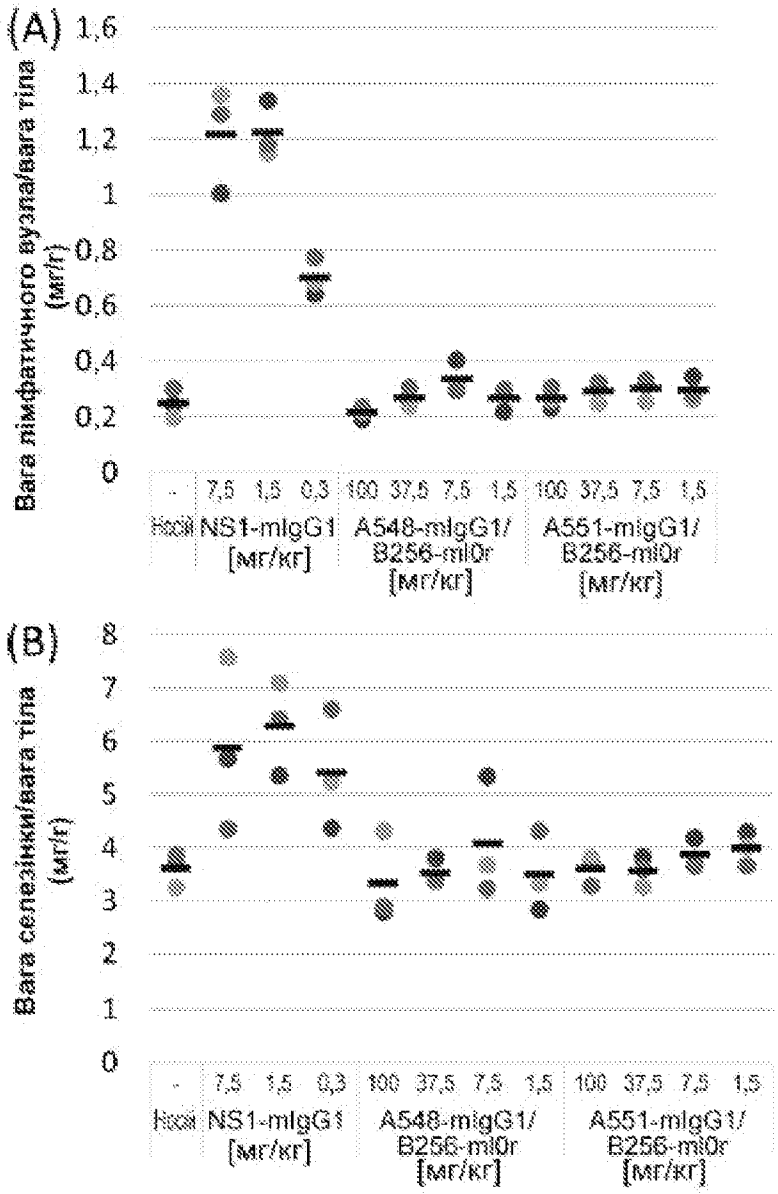
Фіг. 48


Клітини CD8+ серед клітин CD45+ в печінці (%)
25,00%
20,00%
15,00%
10,00%
5,00%
0,00%
носій
NS1-MB492
A489-MB492/B223-m10r

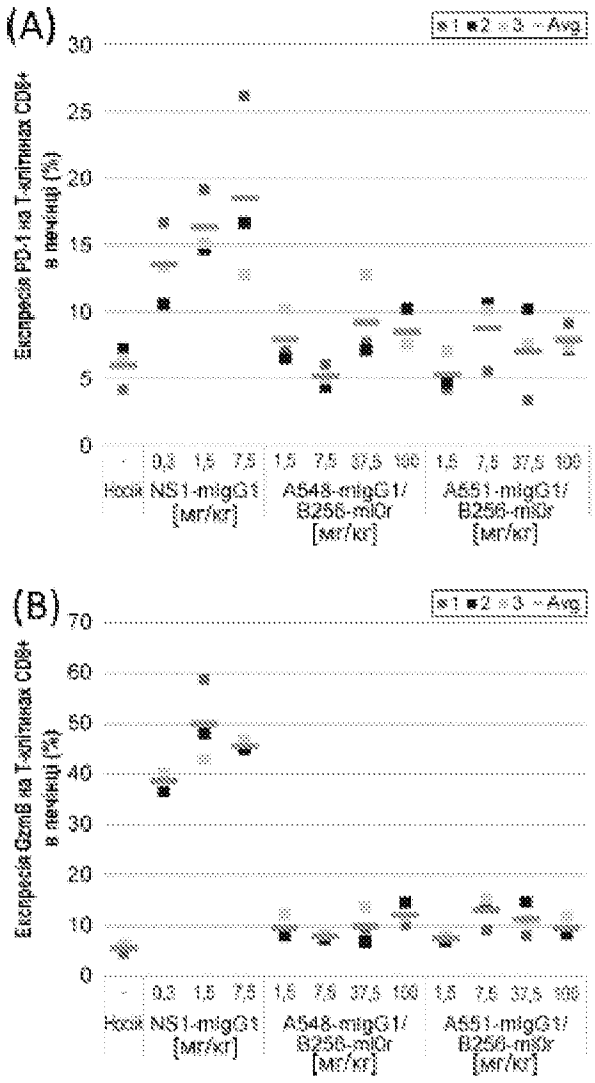
Фіг. 49


(A)
Об'єм пухлини (мм^3, +ст. відхил.)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
Дні після трансплантації пухлини (дні)
Носій
A548-migG1/B256-ml0r (100 мг/кг)
A548-migG1/B256-ml0r (37,5 мг/кг)
A548-migG1/B256-ml0r (7,5 мг/кг)
(B)
Об'єм пухлини (мм^3, +ст. відхил.)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
Дні після трансплантації пухлини (дні)
Носій
A551-migG1/B256-ml0r (100 мг/кг)
A551-migG1/B256-ml0r (37,5 мг/кг)
A551-migG1/B256-ml0r (7,5 мг/кг)

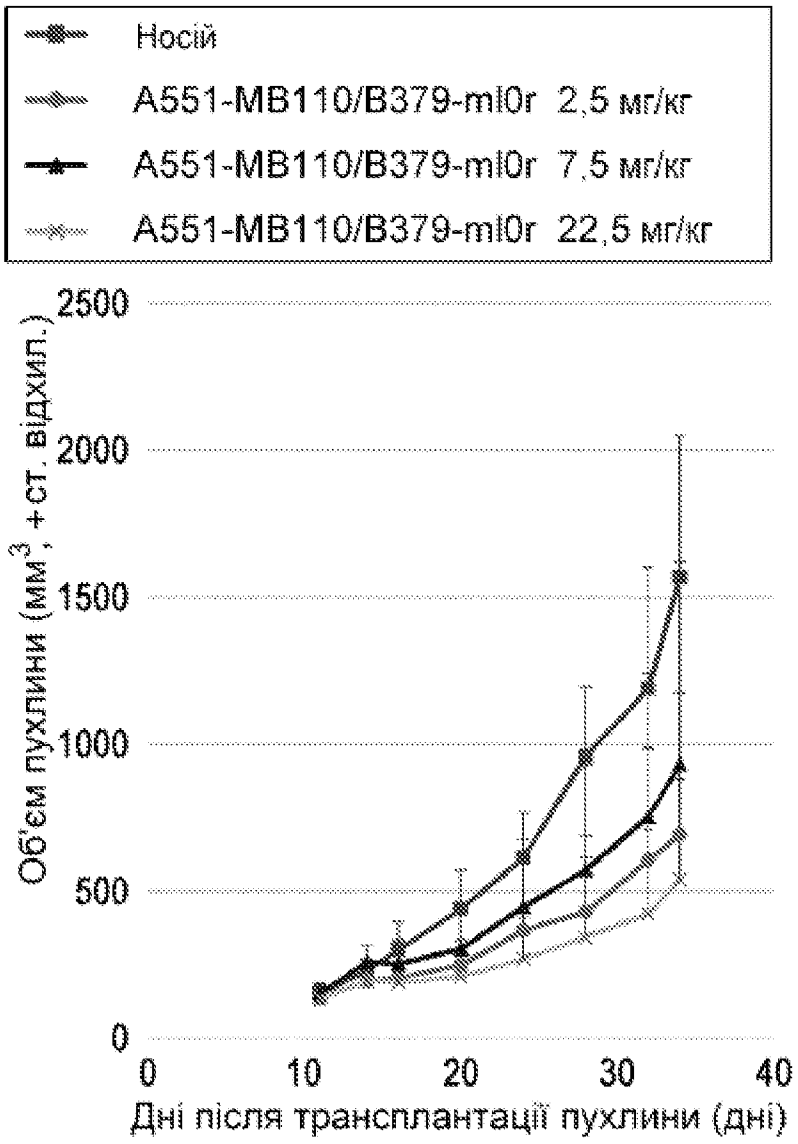
Фіг. 50


(A)
Вага лімфатичного вузла/вага тіла (мг/г)
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
-
Носій
7,5 1,5 0,3
NS1-mIgG1 [мг/кг]
100 37,5 7,5 1,5
A548-mIgG1/ B256-mI0r [мг/кг]
100 37,5 7,5 1,5
A551-mIgG1/ B256-mI0r [мг/кг]
(B)
Вага селезінки/вага тіла (мг/г)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-
Носій
7,5 1,5 0,3
NS1-mIgG1 [мг/кг]
100 37,5 7,5 1,5
A548-mIgG1/ B256-mI0r [мг/кг]
100 37,5 7,5 1,5
A551-mIgG1/ B256-mI0r [мг/кг]

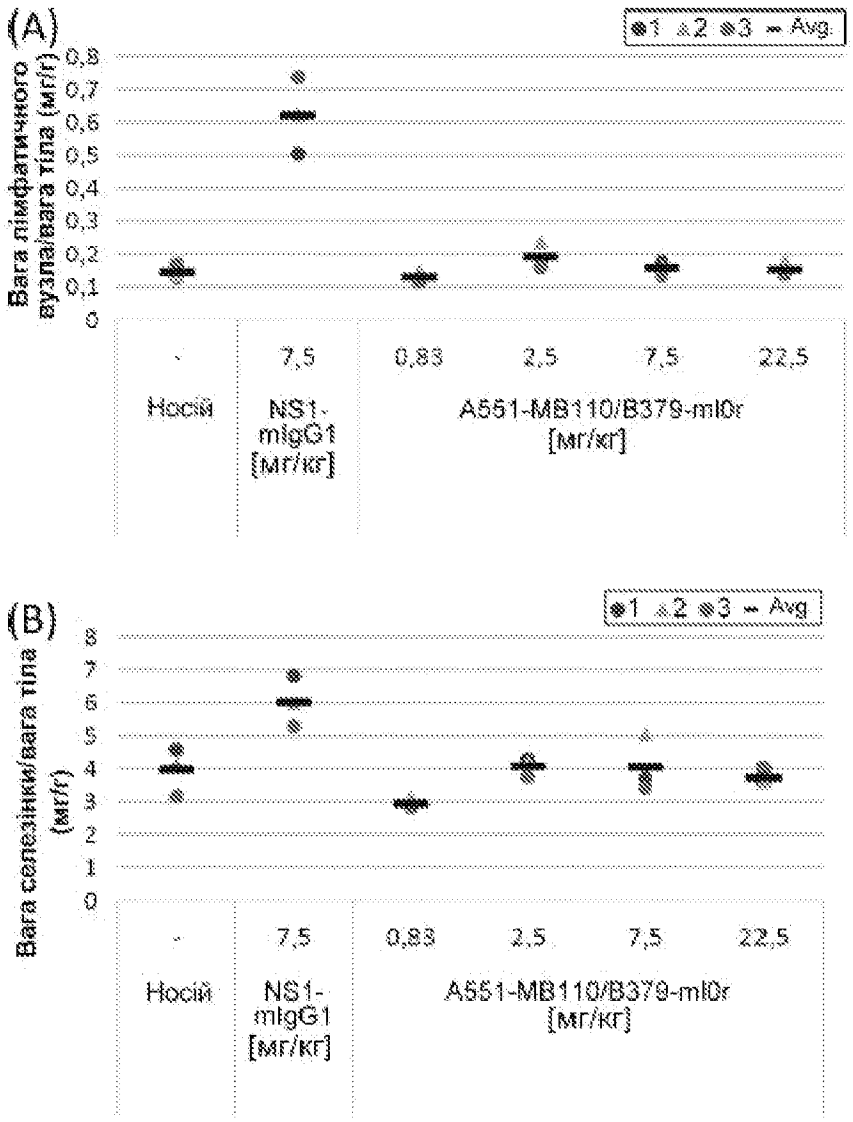
Фіг. 51


(A)
1 2 3 Avg
Експресія PD-1 на Т-клітинах CD8+ в печінці (%)
30
25
20
15
10
5
0
-
0,3
1,5
7,5
1,5
7,5
37,5
100
1,5
7,5
37,5
100
Нісл
NS1-mIgG1 [мг/кг]
A548-mIgG1/ B256-mIOr [мг/кг]
A551-mIgG1/ B256-mSx [мг/кг]
(B)
1 2 3 Avg
Експресія GzmB на Т-клітинах CD8+ в печінці (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
-
0,3
1,5
7,5
1,5
7,5
37,5
100
1,5
7,5
37,5
100
Нісл
NS1-mIgG1 [мг/кг]
A548-mIgG1/ B256-mIOr [мг/кг]
A551-mIgG1/ B256-mSx [мг/кг]

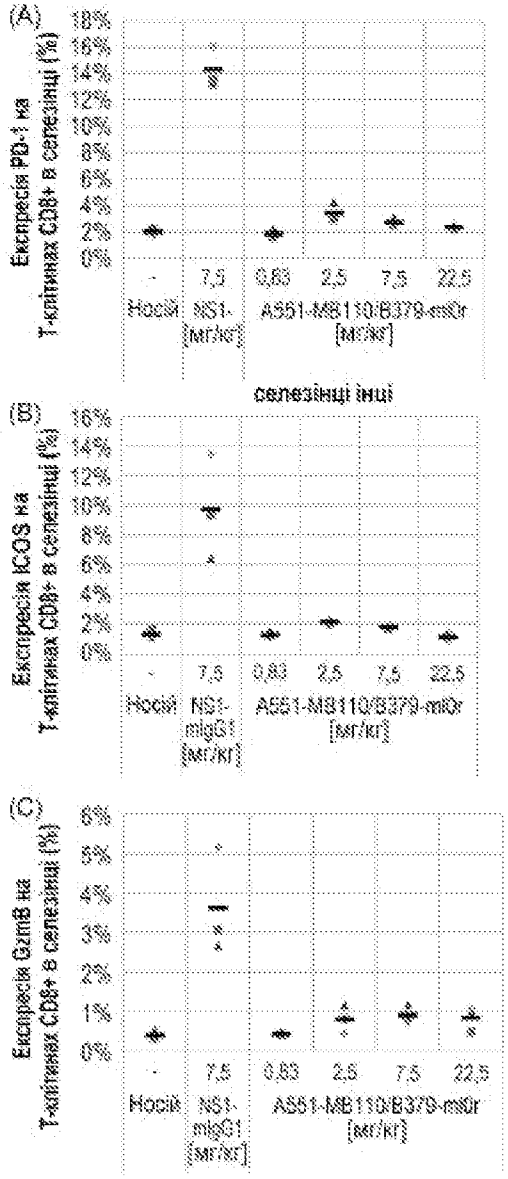
Фіг. 52


Носій
A551-MB110/B379-ml0r 2,5 мг/кг
A551-MB110/B379-ml0r 7,5 мг/кг
A551-MB110/B379-ml0r 22,5 мг/кг
Об'єм пухлини (мм3, + ст. відхил.)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
Дні після трансплантації пухлини (дні)

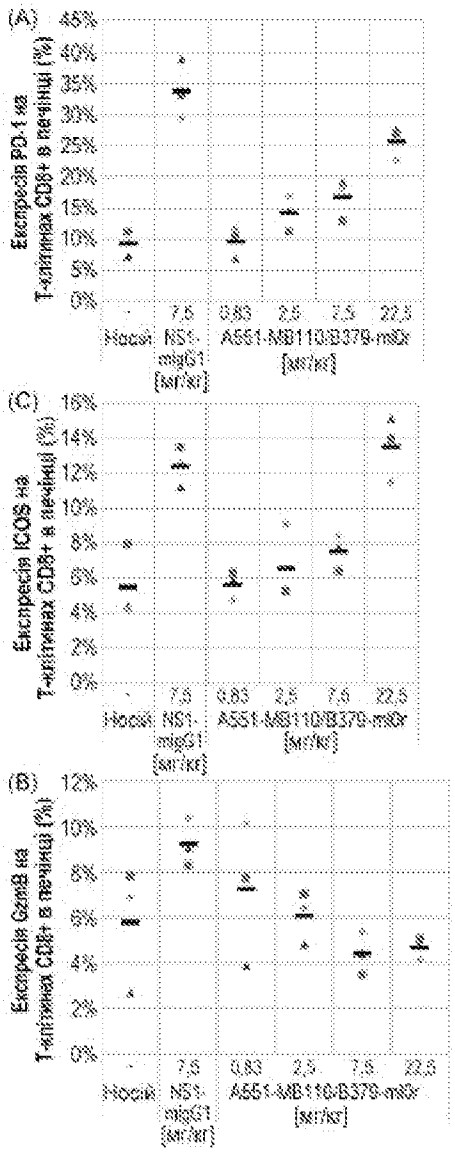
Фіг. 53


(A)
●1 ▲2 ■3 – Avg.
Вага лімфатичного вузла/вага тіла (мг/г)
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
-
7,5
0,83
2,5
7,5
22,5
Носій
NS1-mIgG1 [мг/кг]
A551-MB110/B379-mI0r [мг/кг]
(B)
●1 ▲2 ■3 – Avg
Вага селезінки/вага тіла (мг/г)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-
7,5
0,83
2,5
7,5
22,5
Носій
NS1-mIgG1 [мг/кг]
A551-MB110/B379-mI0r [мг/кг]

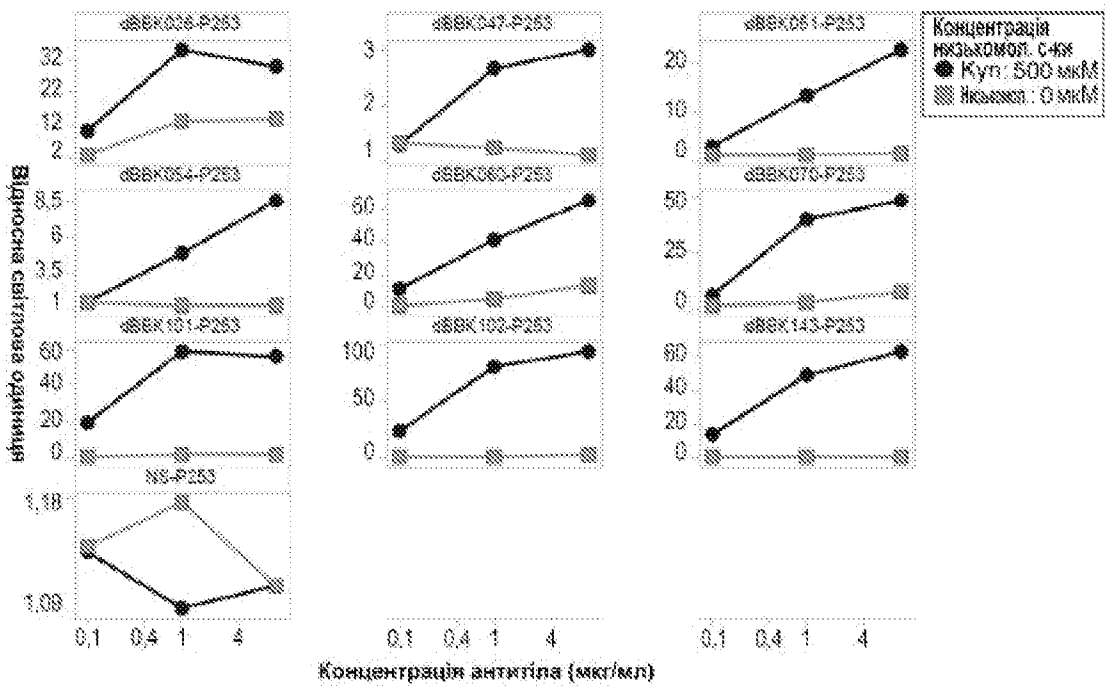
Фіг. 54


(A)
Експресія PD-1 на
Т-клітинах CD8+ в селезінці (%)
18%
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
-
7,5
0,63
2,5
7,5
22,5
Носій
NS1-
[мг/кг]
AS51-MB110/B379-mBir
[мг/кг]
селезінці інші
(B)
Експресія ICOS на
Т-клітинах CD8+ в селезінці (%)
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
-
7,5
0,63
2,5
7,5
22,5
Носій
NS1-
mIgG1
[мг/кг]
AS51-MB110/B379-mBir
[мг/кг]
(C)
Експресія GzmB на
Т-клітинах CD8+ в селезінці (%)
6%
5%
4%
3%
2%
1%
0%
-
7,5
0,63
2,5
7,5
22,5
Носій
NS1-
mIgG1
[мг/кг]
AS51-MB110/B379-mBir
[мг/кг]

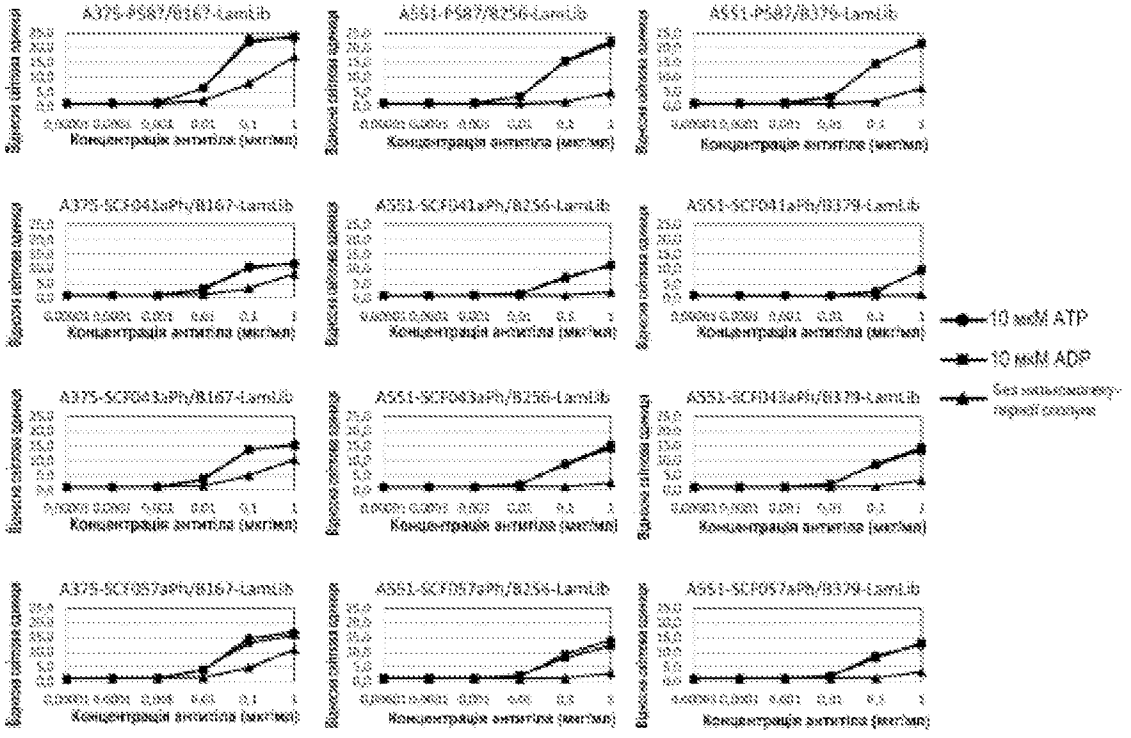
Фіг. 55


(A)
Експресія PD-1 на Т-клітинах CD8+ в печінці (%)
45%
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
-
Носій
7,5
NS1-mIgG1 [мг/кг]
0,83
2,5
7,5
22,5
A551-MB110/B379-mBr [мг/кг]
(C)
Експресія ICOS на Т-клітинах CD8+ в печінці (%)
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
(B)
Експресія GzmB на Т-клітинах CD8+ в печінці (%)
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%

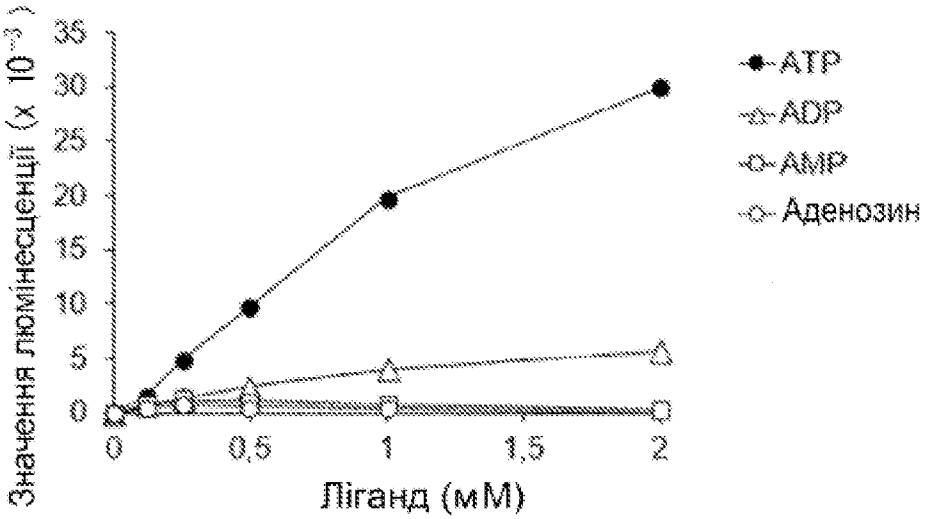
Фіг. 56


dBBK028-P253
dBBK047-P253
dBBK061-P253
dBBK054-P253
dBBK083-P253
dBBK076-P253
dBBK101-P253
dBBK102-P253
dBBK143-P253
NS-P253
Відносна світлова одиниця
Концентрація антитіла (мкг/мл)
Концентрація нікельхлорид. с-ки
Куп.: 500 мкМ
Нікельхл.: 0 мкМ

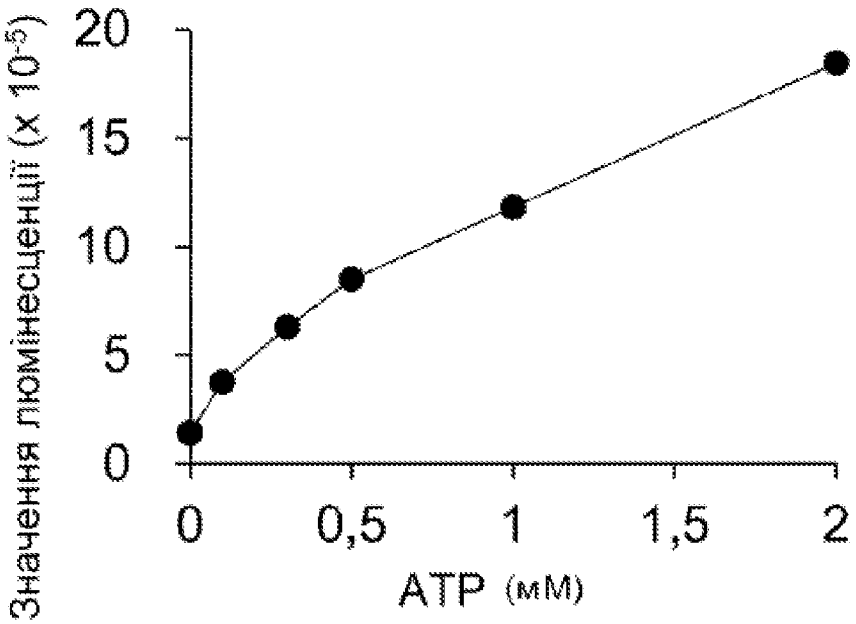
Фіг. 57


A375-P587/B167-LamLib
A551-P587/B256-LamLib
A551-P587/B379-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A551-SCF041aPh/B256-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A375-SCF063aPh/B167-LamLib
A551-SCF063aPh/B256-LamLib
A551-SCF063aPh/B379-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib
A551-SCF057aPh/B256-LamLib
A551-SCF057aPh/B379-LamLib
10 мкМ ATP
10 мкМ ADP

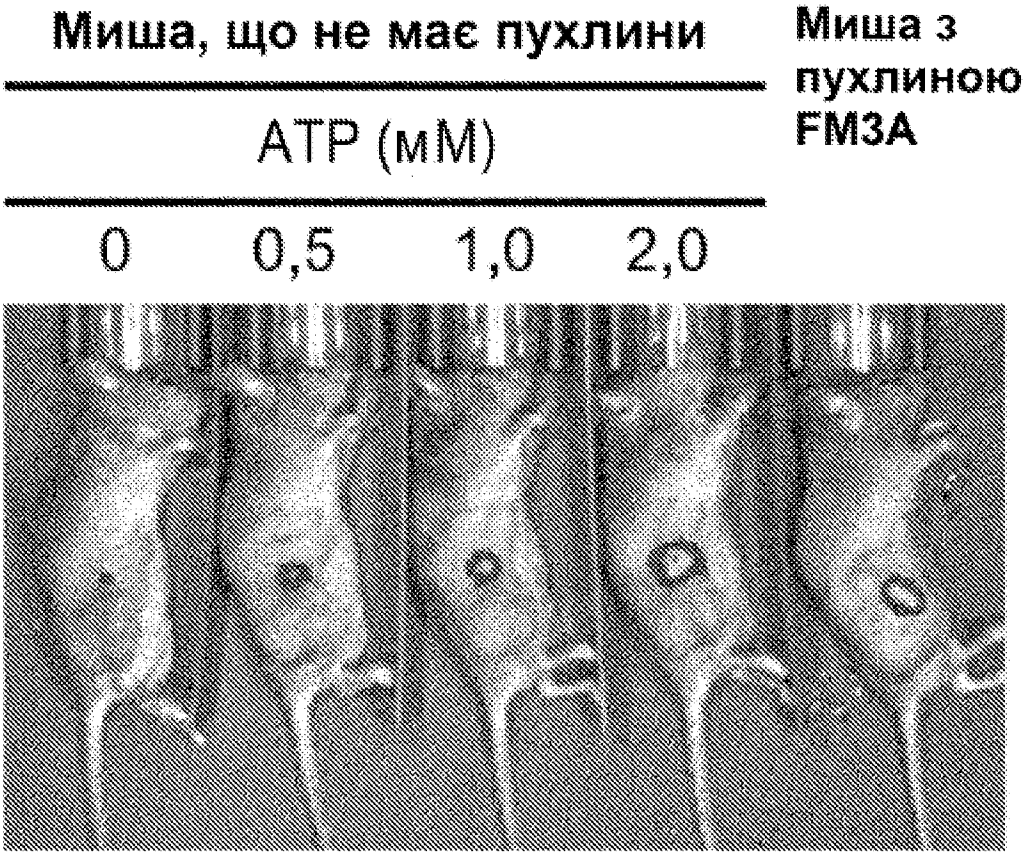
Фіг. 58


Значення люмінесценції (x 10⁻³)
0
5
10
15
20
25
30
35
0
0,5
1
1,5
2
Ліганд (мМ)
ATP
ADP
AMP
Аденозин

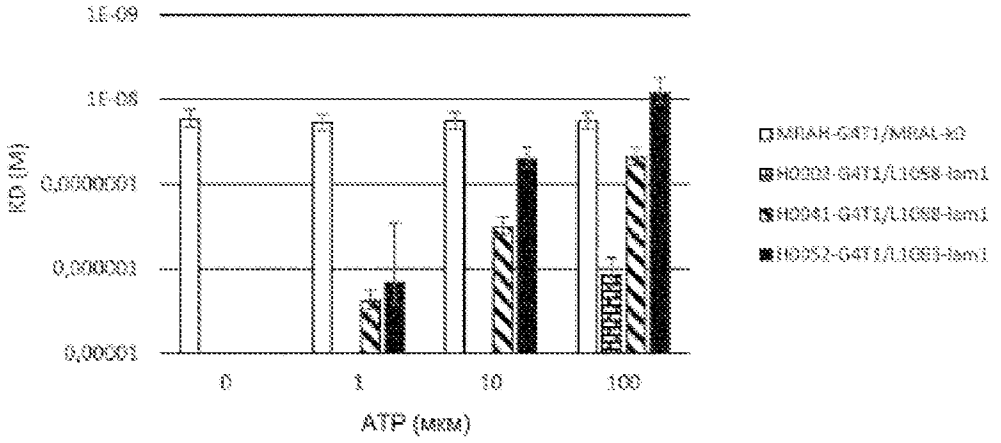
Фіг. 59


Значення люмінесценції (x 10⁻⁵)
0
5
10
15
20
0
0,5
1
1,5
2
ATP (мМ)

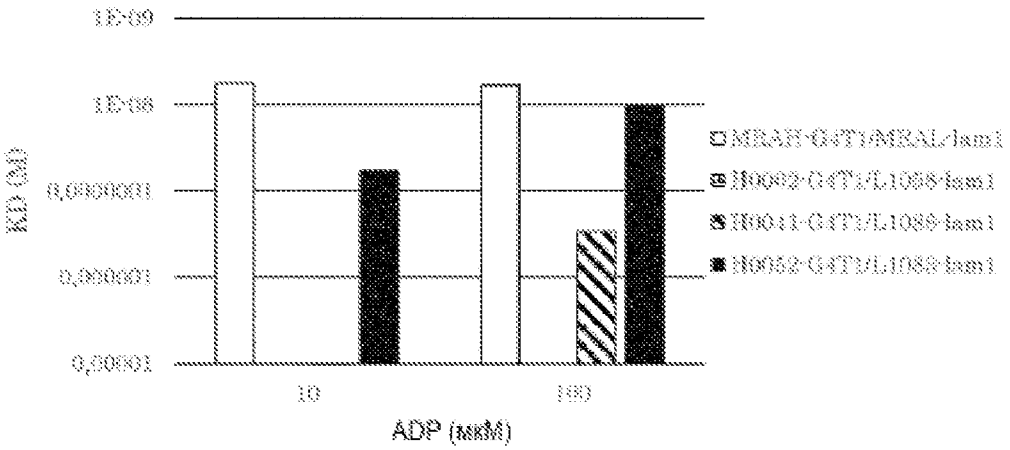
Фіг. 60


Миша, що не має пухлини
Миша з пухлиною FM3A
ATP (мМ)
0
0,5
1,0
2,0

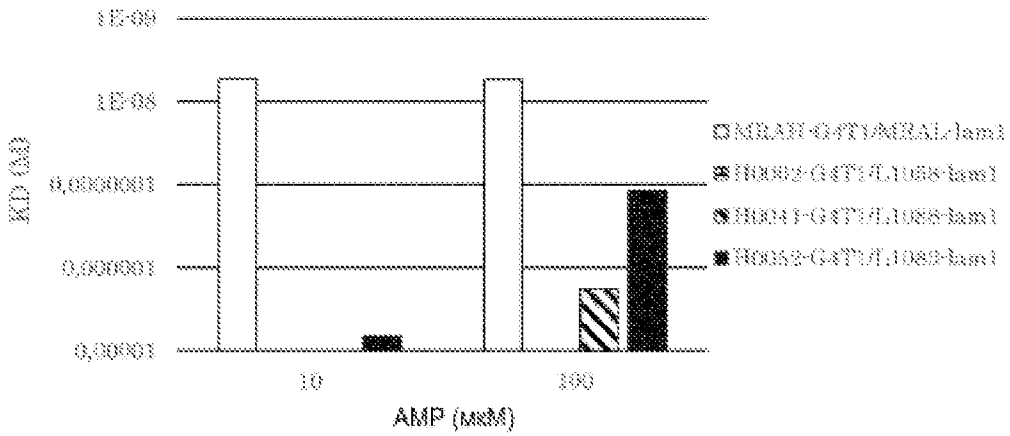
Фіг. 61


1E-09
1E-08
KD (M)
0,0000001
0,000001
0,00001
0
1
10
100
ATP (мкМ)
MRAH-G4T1/MRAL-k0
HD023-G4T1/L1G5S-lam1
HD041-G4T1/L1G5S-lam1
HD052-G4T1/L1G5S-lam1

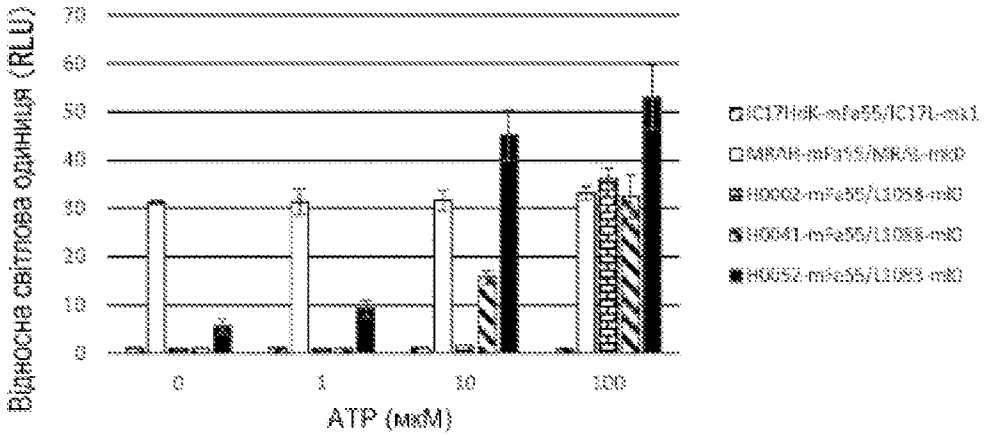
Фіг. 62


1E-09
1E-08
0,0000001
0,000001
0,00001
KD (M)
10
100
ADP (мкМ)
MRAH-G4T1/MRAL-lam1
H0052-G4T1/L1088-lam1
H0041-G4T1/L1089-lam1
H0052-G4T1/L1089-lam1

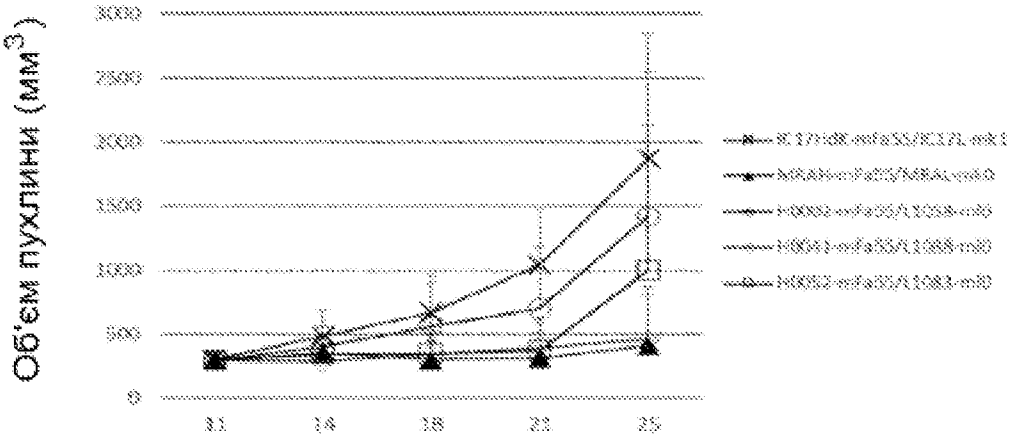
Фіг. 63


1E-09
1E-08
0,0000001
0,000001
0,00001
KD (M)
10
100
AMP (мкМ)
MRAH-G4T1/MRAL-lam1
H0052-G4T1/L1088-lam1
H0041-G4T1/L1088-lam1
H0052-G4T1/L1089-lam1

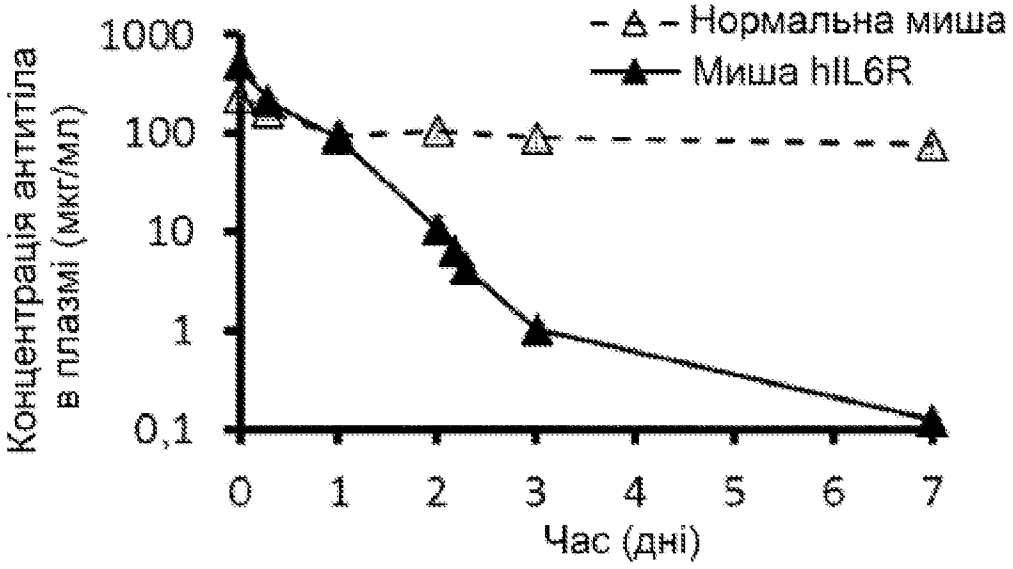
Фіг. 64


Відносна світлова одиниця (RLU)
0
10
20
30
40
50
60
70
0
1
10
100
ATP (мкМ)

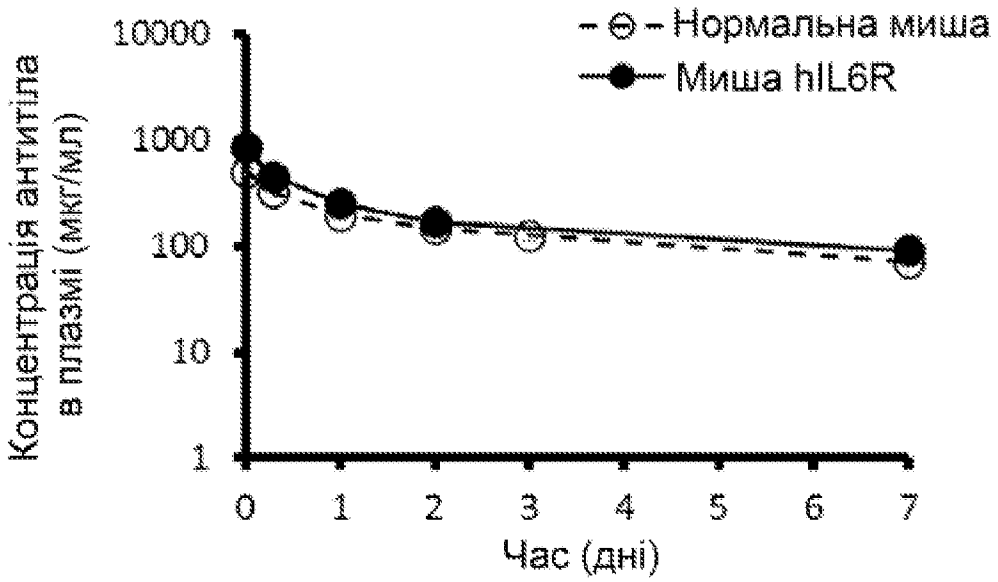
Фіг. 65


Об'єм пухлини (мм3)
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
11
14
18
22
25
Дні після трансплантації клітин

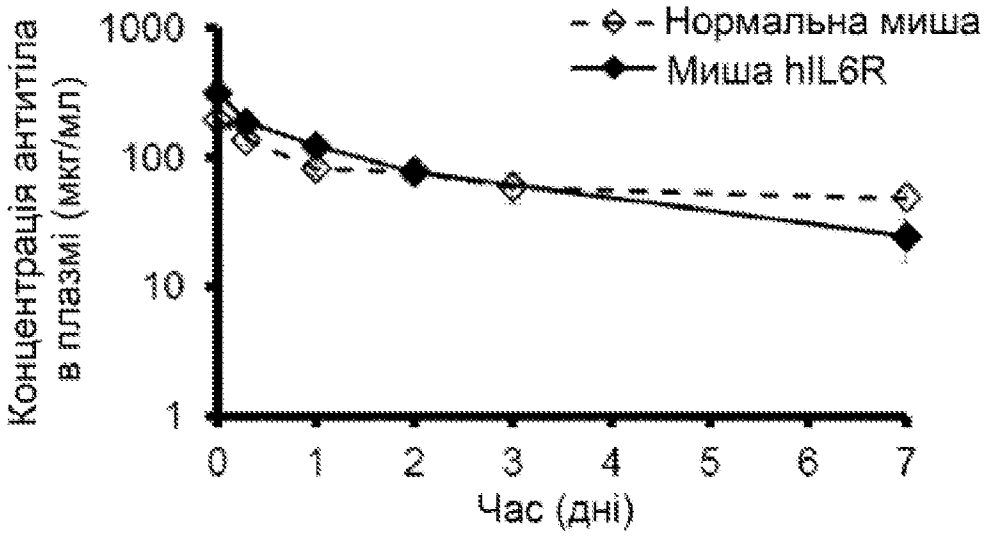
Фіг. 66


Нормальна миша
Миша hIL6R
Концентрація антитіла в плазмі (мкг/мл)
1000
100
10
1
0,1
0
1
2
3
4
5
6
7
Час (дні)

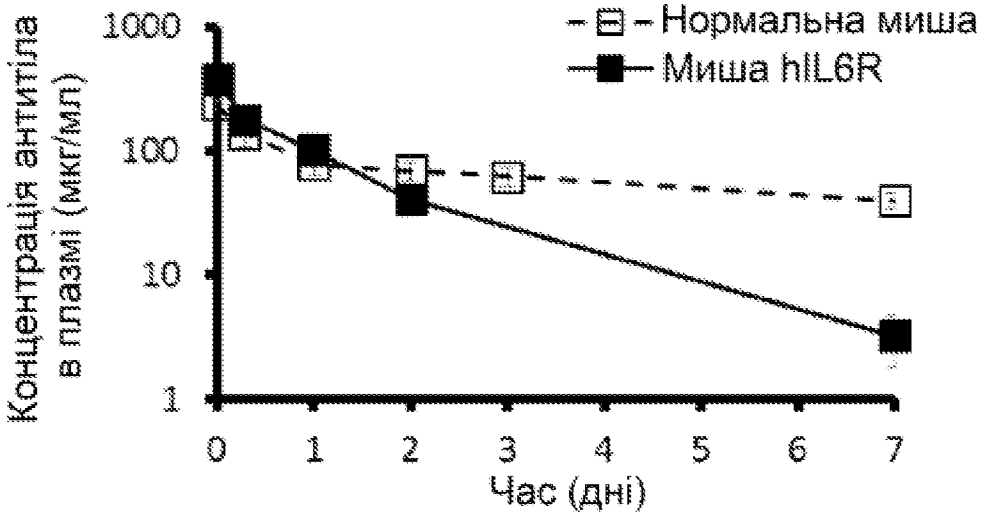
Фіг. 67


Нормальна миша
Миша hIL6R
Концентрація антитіла в плазмі (мкг/мл)
10000
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
5
6
7
Час (дні)

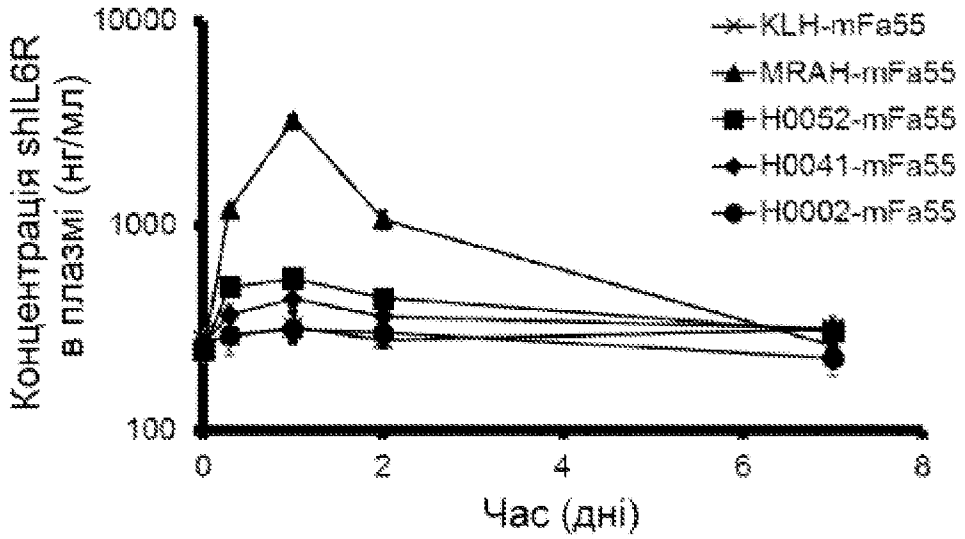
Фіг. 68


Концентрація антитіла в плазмі (мкг/мл)
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
5
6
7
Час (дні)
Нормальна миша
Миша hIL6R

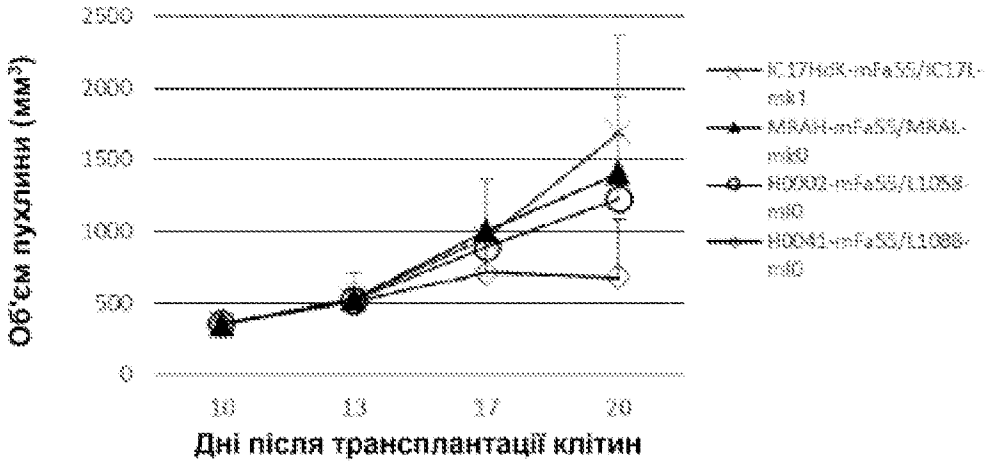
Фіг. 69


Концентрація антитіла в плазмі (мкг/мл)
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
5
6
7
Час (дні)
Нормальна миша
Миша hIL6R

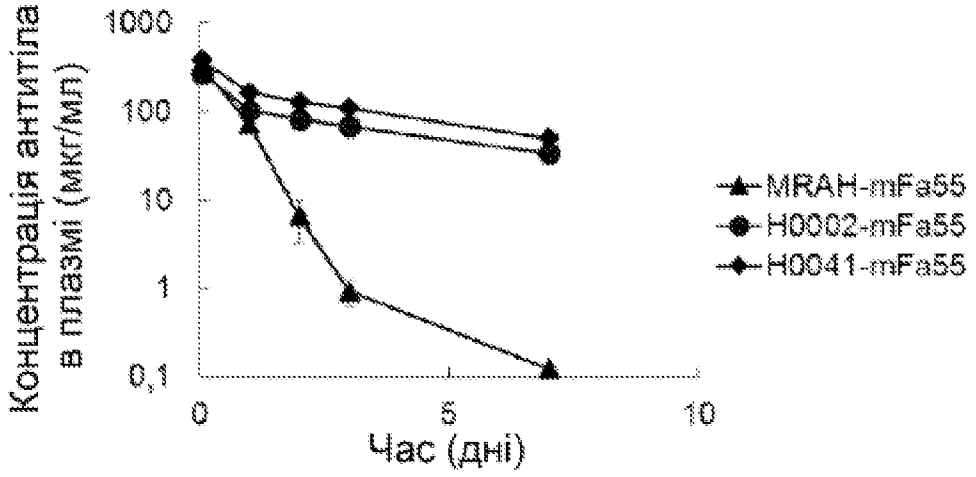
Фіг. 70


Концентрація shIL6R в плазмі (нг/мл)
10000
1000
100
0
2
4
6
8
Час (дні)
KLH-mFa55
MRAH-mFa55
H0052-mFa55
H0041-mFa55
H0002-mFa55

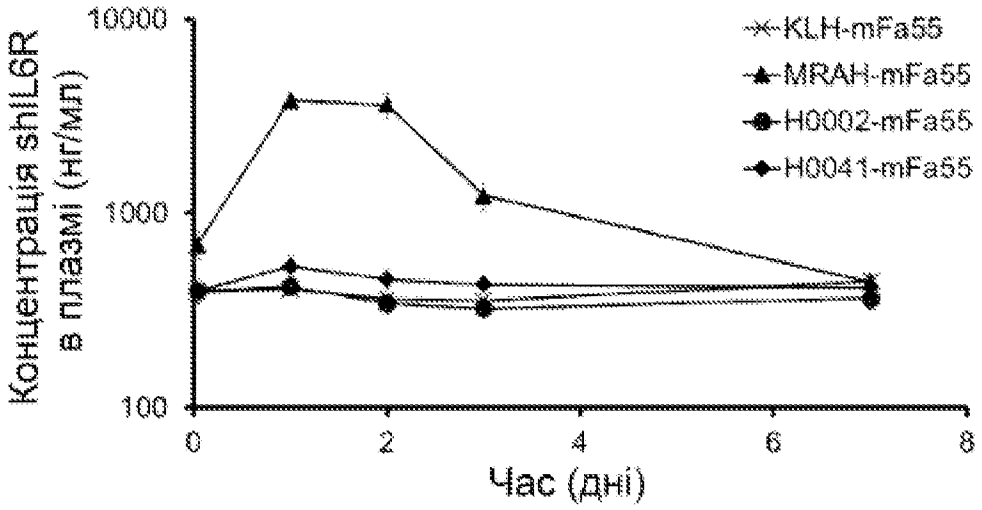
Фіг. 71


Об'єм пухлини (мм³)
2500
2000
1500
1000
500
0
10
13
17
20
Дні після трансплантації клітин

Фіг. 72


Концентрація антитіла в плазмі (мкг/мл)
1000
100
10
1
0,1
0
5
10
Час (дні)
MRAH-mFa55
H0002-mFa55
H0041-mFa55

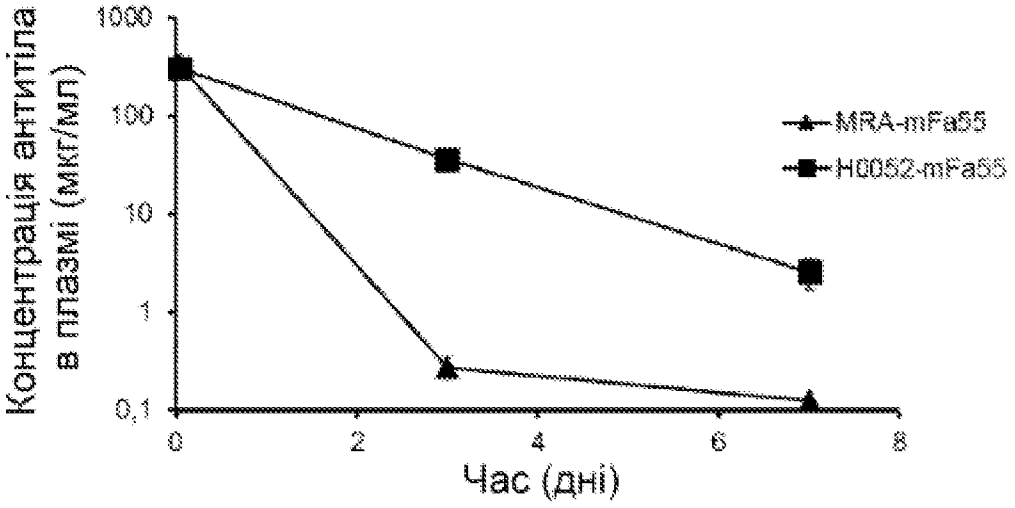
Фіг. 73


Концентрація shIL6R в плазмі (нг/мл)
10000
1000
100
0
2
4
6
8
Час (дні)
KLH-mFa55
MRAH-mFa55
H0002-mFa55
H0041-mFa55

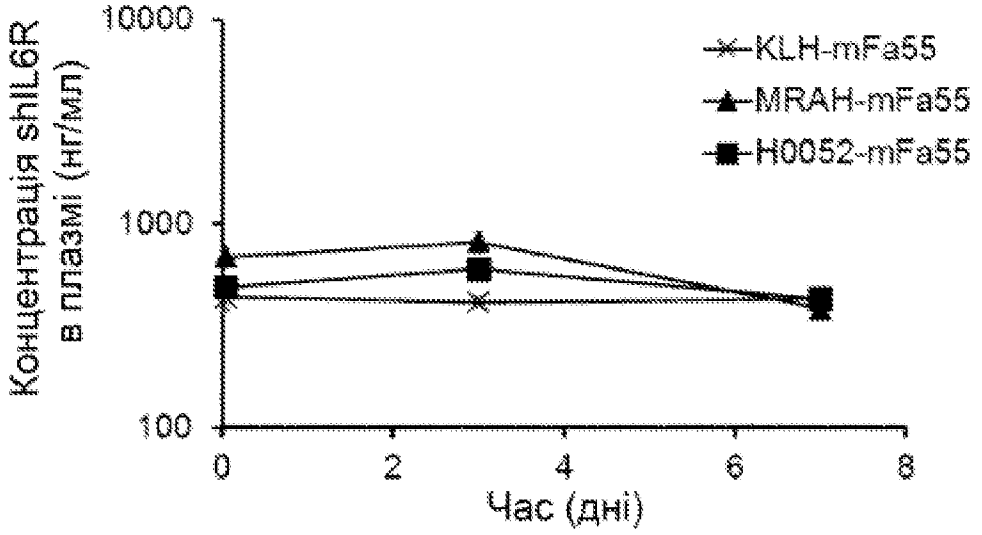
Фіг. 74


Об'єм пухлини (мм³)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
13
17
20
Дні після трансплантації клітин

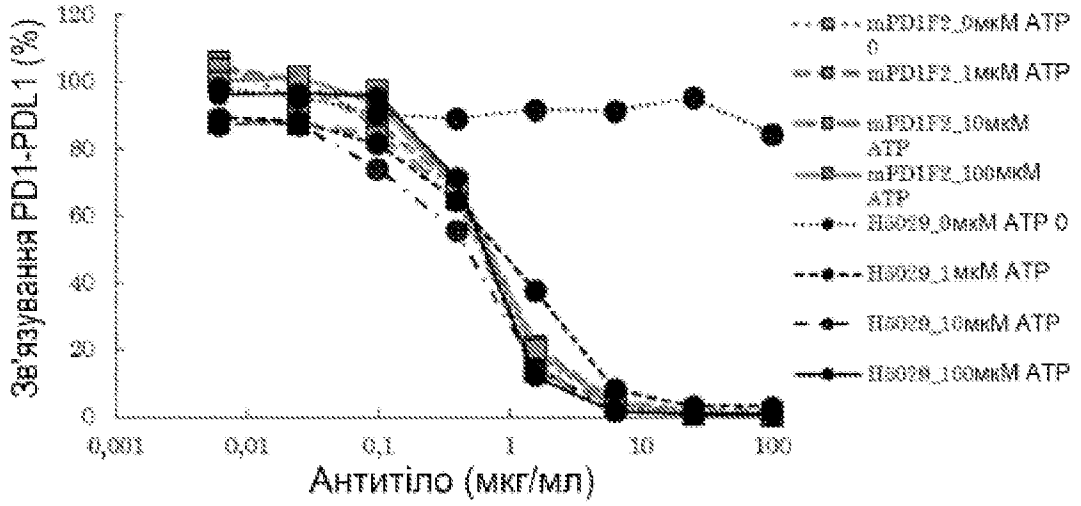
Фіг. 75


Концентрація антитіла в плазмі (мкг/мл)
1000
100
10
1
0,1
0
2
4
6
8
Час (дні)
MRA-mFa55
H0052-mFa55

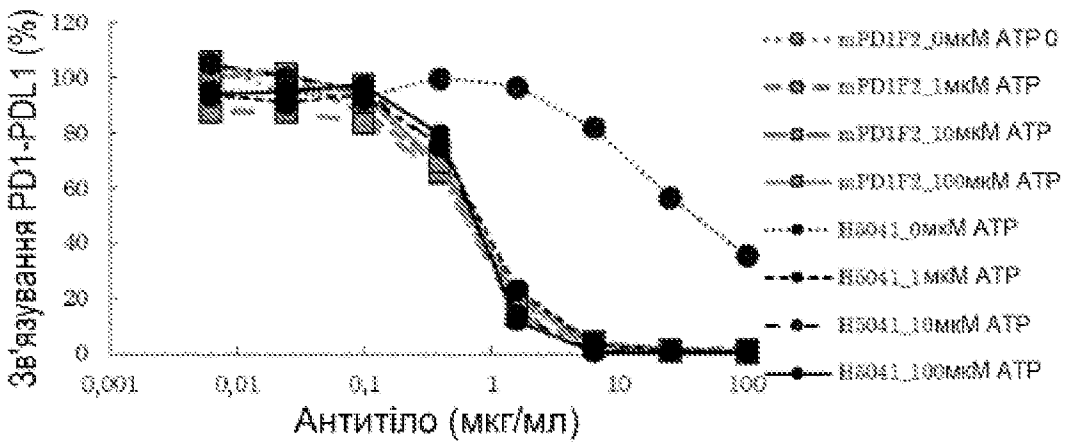
Фіг. 76


Концентрація shIL6R в плазмі (нг/мл)
10000
1000
100
0
2
4
6
8
Час (дні)
KLH-mFa55
MRAH-mFa55
H0052-mFa55

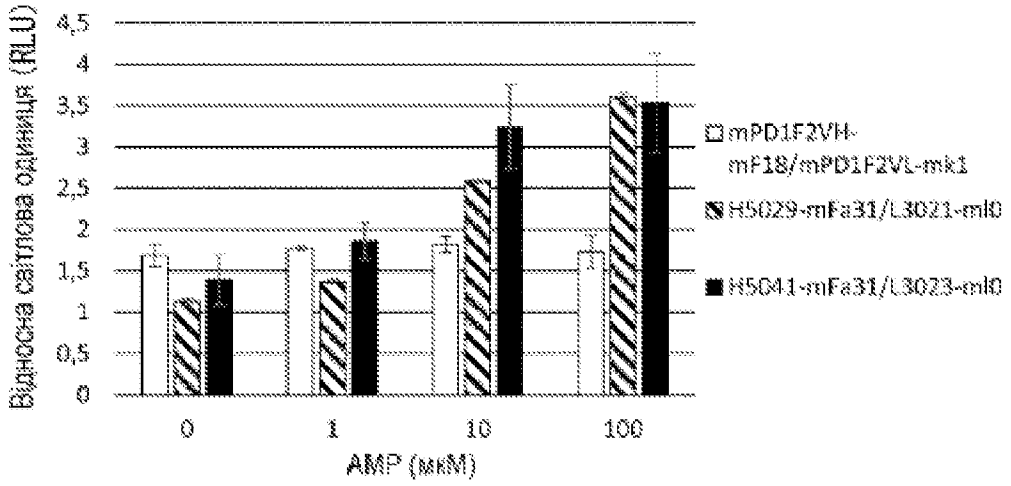
Фіг. 77


Зв'язування PD1-PDL1 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Антитіло (мкг/мл)
mPD1F2_0мкМ ATP 0
mPD1F2_1мкМ ATP
mPD1F2_10мкМ ATP
mPD1F2_100мкМ ATP
H0029_0мкМ ATP 0
H0029_1мкМ ATP
H0029_10мкМ ATP
H0029_100мкМ ATP

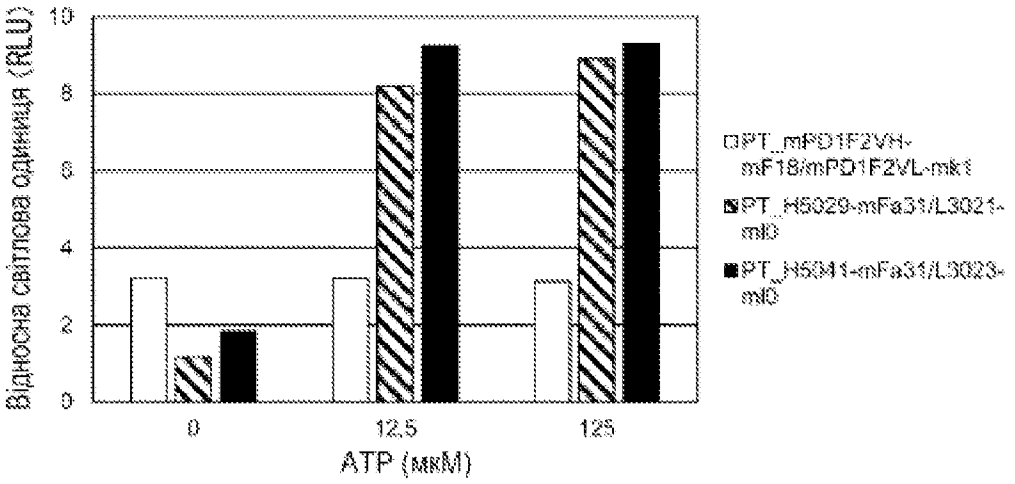
Фіг. 78


Зв'язування PD1-PDL1 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Антитіло (мкг/мл)
mPD1F2_0мкМ ATP
mPD1F2_1мкМ ATP
mPD1F2_10мкМ ATP
mPD1F2_100мкМ ATP
H5041_0мкМ ATP
H5041_1мкМ ATP
H5041_10мкМ ATP
H5041_100мкМ ATP

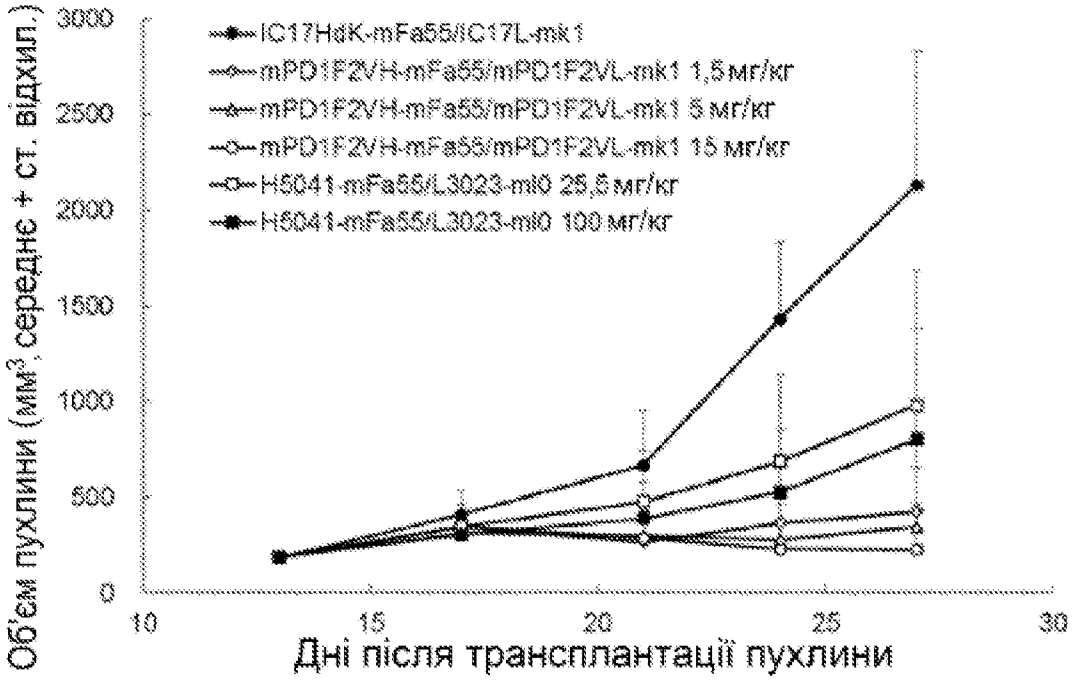
Фіг. 79


Відносна світлова одиниця (RLU)
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
1
10
100
AMP (мкМ)
mPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1
H5029-mFa31/L3021-ml0
H5041-mFa31/L3023-ml0

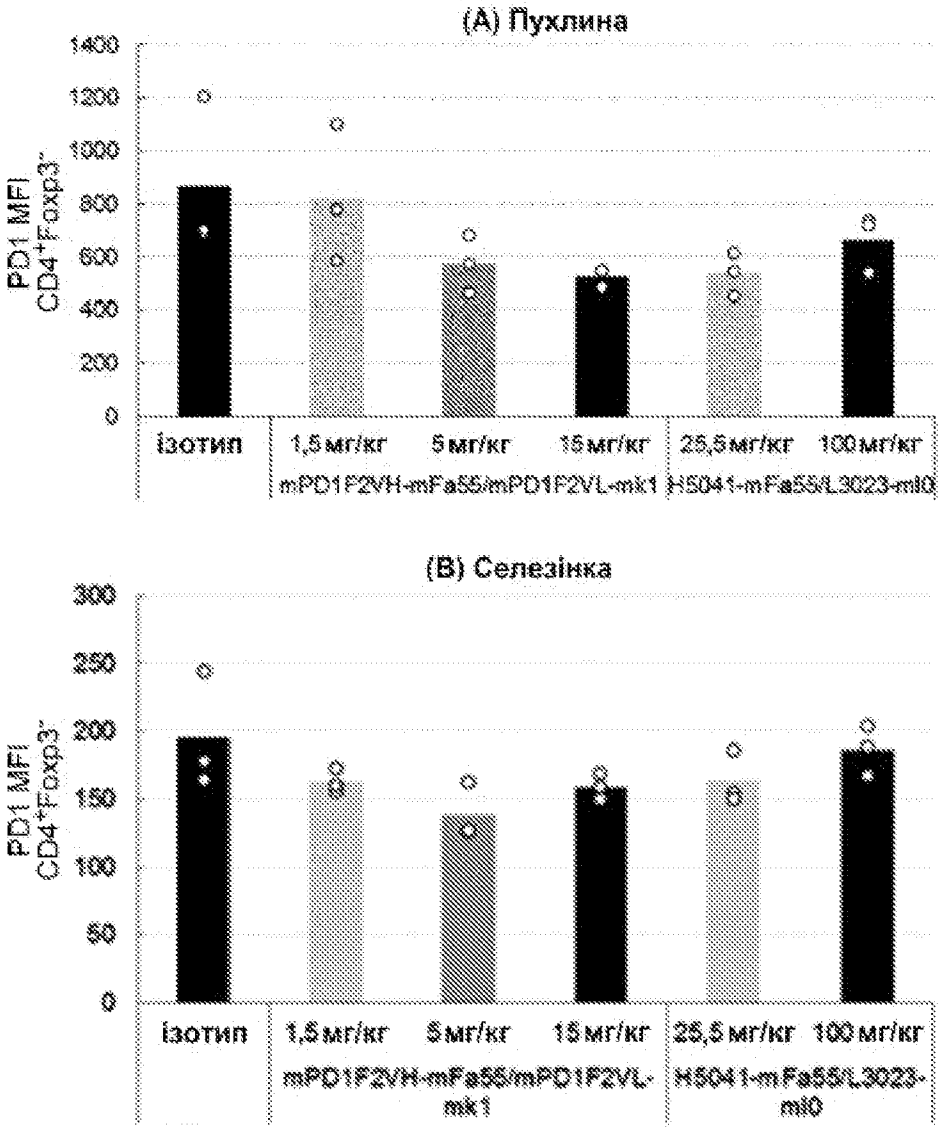
Фіг. 80


Відносна світлова одиниця (RLU)
10
8
6
4
2
0
0
12,5
125
ATP (мкМ)
PT_mPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1
PT_H5029-mFa31/L3021-ml0
PT_H5041-mFa31/L3023-ml0

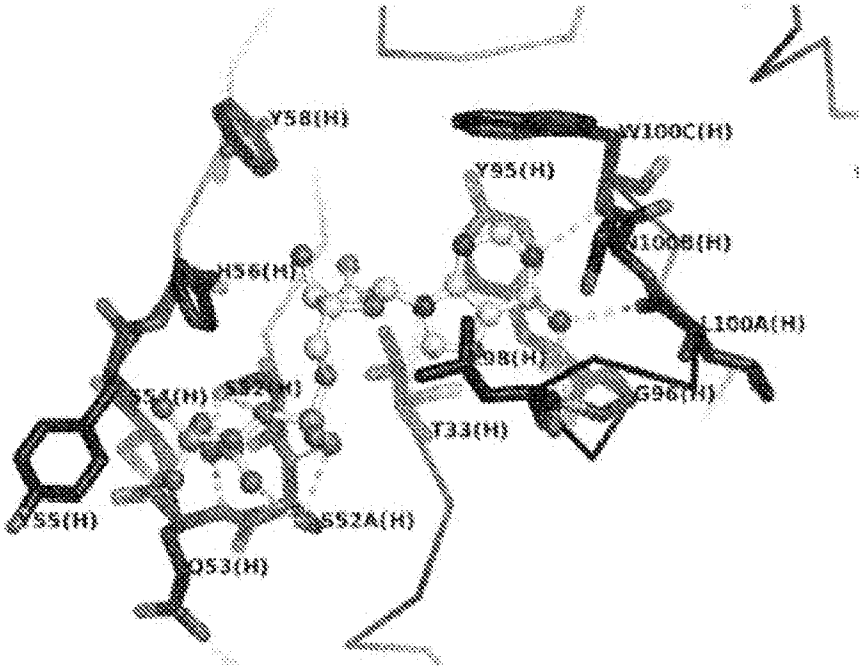
Фіг. 81


Об'єм пухлини (мм3, середнє + ст. відхил.)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
15
20
25
30
Дні після трансплантації пухлини
IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1
mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1 1,5 мг/кг
mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1 5 мг/кг
mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1 15 мг/кг
H5041-mFa55/L3023-ml0 25,5 мг/кг
H5041-mFa55/L3023-ml0 100 мг/кг

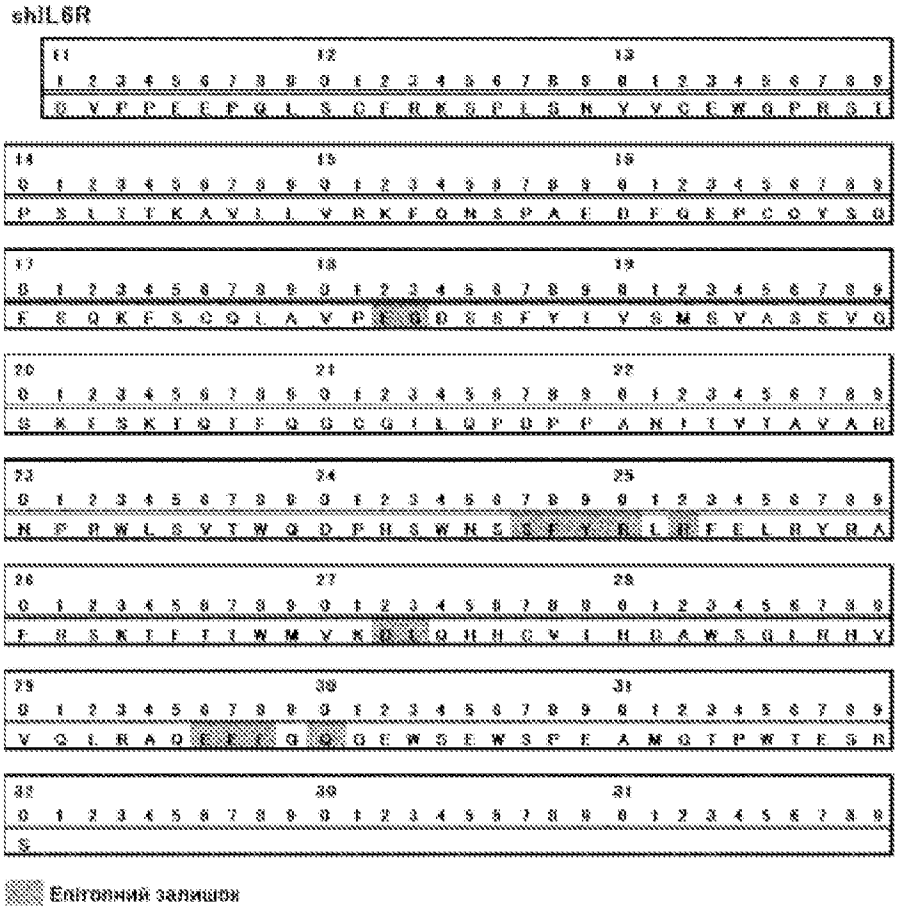
Фіг. 82


(A) Пухлина
PD1 MFI
CD4+Foxp3-
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Ізотип
1,5 мг/кг
5 мг/кг
15 мг/кг
25,5 мг/кг
100 мг/кг
mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1
H5041-mFa55/L3023-mI0
(B) Селезінка
PD1 MFI
CD4+Foxp3-
300
250
200
150
100
50
0
Ізотип
1,5 мг/кг
5 мг/кг
15 мг/кг
25,5 мг/кг
100 мг/кг
mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1
H5041-mFa55/L3023-mI0

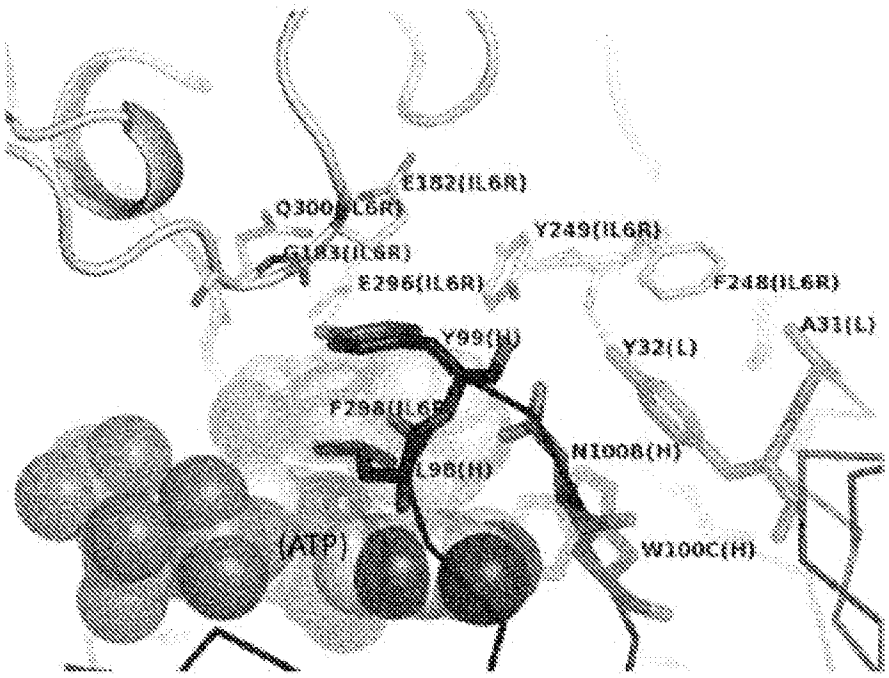
Фіг. 83


Y58(H)
V100C(H)
Y95(H)
H56(H)
100B(H)
100A(H)
98(H)
S54(H)
G96(H)
T33(H)
S55(H)
S52A(H)
Q53(H)

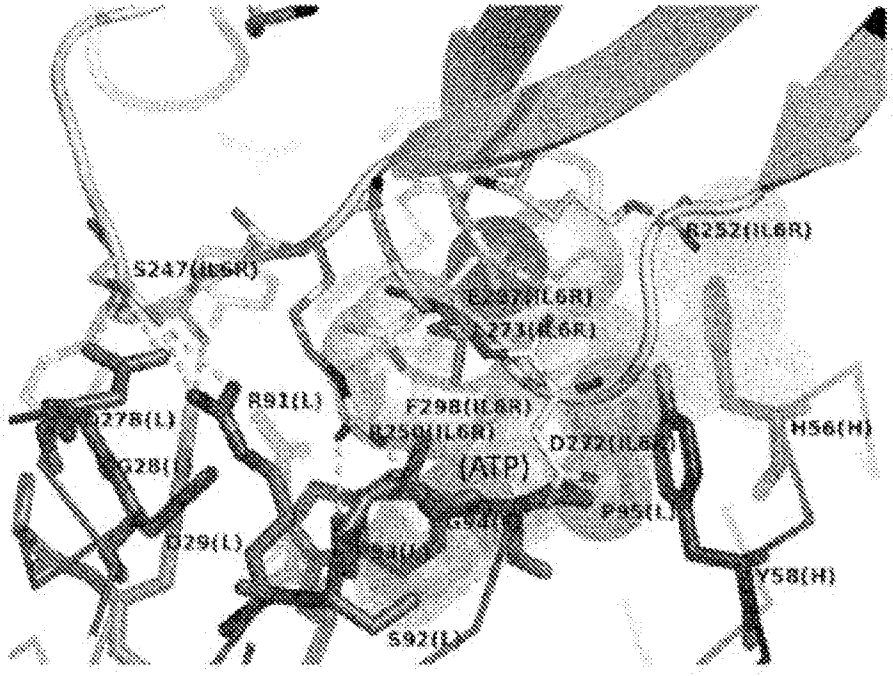
Фіг. 84



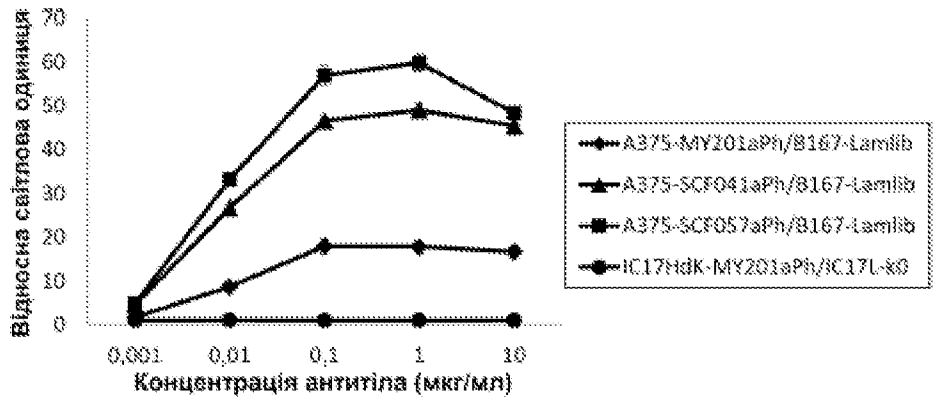
Фіг. 85


E382(IL6R)
Y249(IL6R)
E296(IL6R)
F248(IL6R)
A31(L)
Y32(L)
N100B(H)
(ATP)
W100C(H)

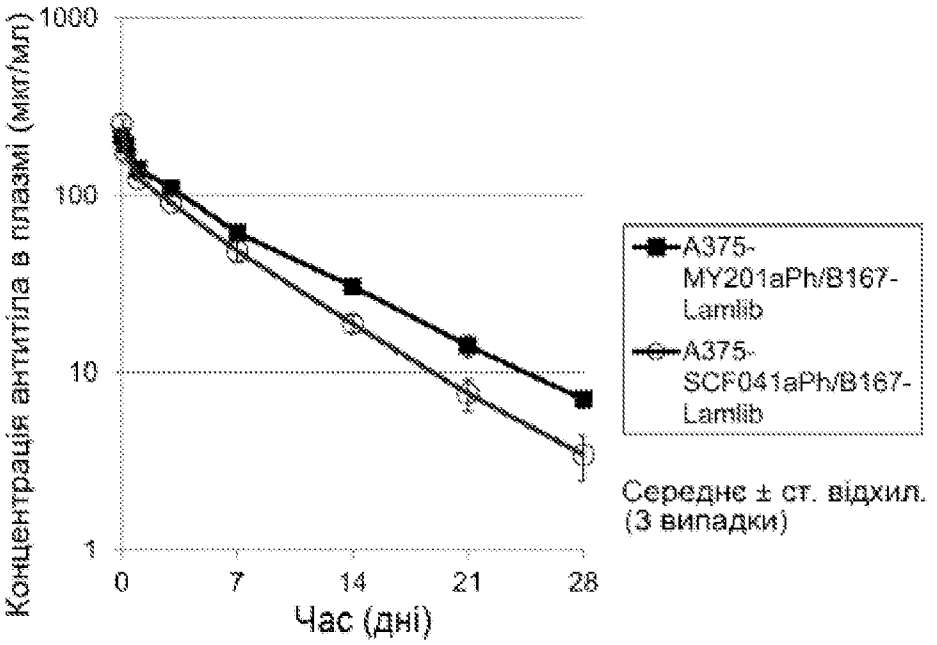
Фіг. 86


S247(IL6R)
R252(IL6R)
R931(L)
F298(IL6R)
(ATP)
H56(H)
Y58(H)
S92(L)

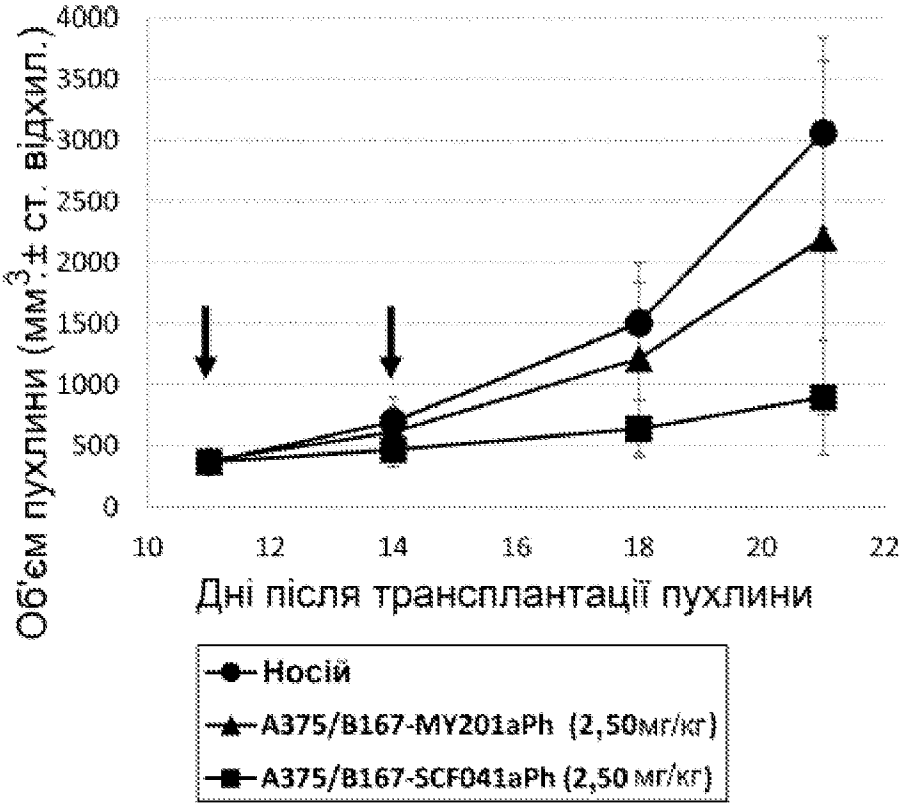
Фіг. 87


Відносна сайтлова одиниця
70
60
50
40
30
20
10
0
0,001
0,01
0,1
1
10
Концентрація антитіла (мкг/мл)
A375-MY201aPh/B167-Lamlib
A375-SCF041aPh/B167-Lamlib
A375-SCF057aPh/B167-Lamlib
IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0

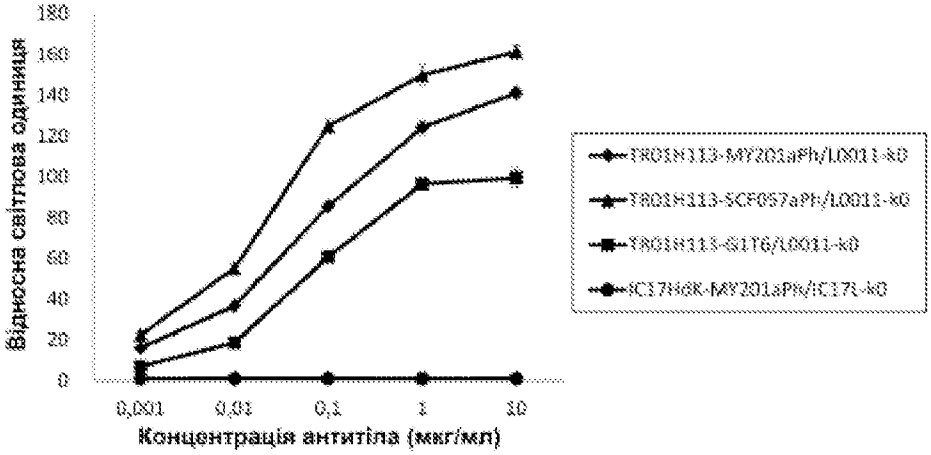
Фіг. 88


Концентрація антитіла в плазмі (мкг/мл)
1000
100
10
1
0
7
14
21
28
Час (дні)
A375-MY201aPh/B167-Lamlib
A375-SCF041aPh/B167-Lamlib
Середнє ± ст. відхил. (3 випадки)

Фіг. 89



Фіг. 90



Фіг. 91

Комп'ютерна верстка В. Мацело

ДО "Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій", вул. Дмитра Годзенка, 1, м. Київ – 42, 01601