



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115030** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61P 37/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2013 11469**
- (22) Дата подання заявки: **29.02.2012**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **11.09.2017**
- (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **11156665.9**
- (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **02.03.2011**
- (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **EP**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **10.01.2014, Бюл.№ 1**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **11.09.2017, Бюл.№ 17**
- (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ **PCT/EP2012/053390, 29.02.2012**
- (72) Винахідник(и):
**Хоффер Томас У. (CH),
Хоссе Ральф (DE/CH),
Мьосснер Еккехард (DE/CH),
Умана Пабло (CR/CH)**
- (73) Власник(и):
**РОШ ГЛІКАРТ АГ,
Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren, Switzerland (CH)**
- (74) Представник:
Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
ASHRAF S Q ET AL, "Humanised IgG1 antibody variants targeting membrane-bound carcinoembryonic antigen by antibody-dependent cellular cytotoxicity and phagocytosis", BRITISH JOURNAL OF CANCER, HARCOURT PUBLISHERS. - 17.11.2009. - Vol. 101. - № 10. - P. 1758 - 1768
CONAGHAN P J ET AL, "Targeted killing of colorectal cancer cell lines by a humanised IgG1 monoclonal antibody that binds to membrane-bound carcinoembryonic antigen", BRITISH JOURNAL OF CANCER, HARCOURT PUBLISHERS. - Vol. 98. - № 7. - 08.04.2008. - P. 1217 - 1225
STEWART L M ET AL, "Humanisation and characterisation of PR1A3, a monoclonal antibody specific for cell-bound carcinoembryonic antigen", CANCER IMMUNOLOGY AND IMMUNOTHERAPY, SPRINGER-VERLAG, BERLIN, DE. - 01.01.1999. - Vol. 47. - P. 299 - 306
GARAMBOIS VÉRONIQUE ET AL, "Fully human IgG and IgM antibodies directed against the carcinoembryonic antigen (CEA) Gold 4 epitope and designed for radioimmunotherapy (RIT) of colorectal cancers", BMC CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB. - 15.10.2004. - Vol. 4. - no. 1. - P. 75
HOLT L J ET AL, "Domain antibodies: proteins for therapy", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB. - 01.11.2003. - Vol. 21. - no. 11. - P. 484 - 490
DAVIES J ET AL, "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding", IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL. - 01.09.1996. - Vol. 2. - no. 3. - P. 169 - 179

UA 115030 C2

ZBAR A P ET AL, "Immune responses in advanced colorectal cancer following repeated intradermal vaccination with the anti-CEA murine monoclonal antibody, PR1A3: results of a phase I study", INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE ; CLINICAL AND MOLECULAR GASTROENTEROLOGY AND SURGERY, SPRINGER, BERLIN, DE.- 01.09.2005. - vol. 20. - no. 5, P. 403 - 414

DURBIN H ET AL, "An epitope on carcinoembryonic antigen defined by the clinically relevant antibody PR1A3", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. - 10.05.1994. - vol. 91. - no. 10. - P. 4313 - 4317

ROBERT WILKINSON ET AL, "Evaluation of a transgenic mouse model for anti-human CEA radioimmunotherapeutics.", THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE. - 01.10.2002. - vol. 43. - no. 10. - P. 1368 - 1376

KIM JIN C ET AL, "Enhancement of colorectal tumor targeting using a novel biparatopic monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen in experimental radioimmunoguided surgery", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, JOHN WILEY & SONS, INC, UNITED STATES, SWITZERLAND, GERMANY. - 01.02.2002. - vol. 97. - no. 4. - P. 542 - 547

YANG W-P ET AL, "CDR WALKING MUTAGENESIS FOR THE AFFINITY MATURATION OF A POTENT HUMAN ANTI-HIV-1 ANTIBODY INTO THE PICOMOLAR RANGE", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM. - 01.01.1995. - vol. 254. - P. 392 - 403

STEIDL S ET AL, "In vitro affinity maturation of human GM-CSF antibodies by targeted CDR-diversification", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB. - vol. 46. - no. 1. - 01.11.2008. - P. 135 - 144

WO 9506067 A1, 02.03.1995

WO 2011023787 A1, 03.03.2011

WO 2011039126 A1, 07.04.2011

(54) АНТИТІЛО, ЯКЕ ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ ЗІ ЗВ'ЯЗАНИМ З МЕМБРАНОЮ КАРЦИНОЕМБРІОНАЛЬНИМ АНТИГЕНОМ (СЕА)

(57) Реферат:

Винахід стосується виділеного антитіла, яке зв'язується зі зв'язаним з мембраною карциноембріональним антигеном (СЕА), виділеного полінуклеотиду, що кодує таке антитіло, вектора, що містить вказаний полінуклеотид, клітини-хазяїна, що містить вектор, композиції, способу індукції лізису пухлинної клітини, способу лікування індивідуума, який страждає на рак, способу подовження тривалості життя індивідуума, який страждає на рак та застосування такого антитіла або композиції для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування раку, при якому відбувається аномальна експресія СЕА.

Посилання на споріднені заявки

Дана заявка претендує на пріоритет заявки на європейський патент № 11156665.9, зареєстрованої 2 березня 2011 р., повний опис якої включено в даний опис як посилання.

Область техніки, до якої належить винахід

5 Даний винахід належить до антигензв'язуючих молекул (АЗМ). Конкретні варіанти здійснення даного винаходу відносяться до рекомбінантних моноклональних антитіл, включаючи химерні, приматзовані або гуманізовані антитіла, які мають здатність до зв'язування з людським карциноембріональним антигеном (СЕА).

Передумови створення винаходу

10 Карциноембріональний антиген (СЕА) і антитіла до СЕА

Карциноембріональний антиген (СЕА, який позначають також як CEACAM-5 або CD66e) являє собою глікопротеїн з молекулярною масою приблизно 180 кДа. СЕА є представником суперсімейства імуноглобулінів і містить сім доменів, які пов'язані з клітинною мембраною за допомогою глікозилфосфатидилінозитольного якоря (GPI) (Thompson J.A., J Clin Lab Anal. 5, 1991, сс. 344–366). Сім доменів являють собою одну N-кінцеву варіабельну ділянку Ig і шість доменів (A1-B1-A2-B2-A3-B3), гомологічних константностей домену Ig (Hefta LJ та ін., Cancer Res. 52, 1992, сс. 5647-5655).

Сімейство людських СЕА містить 29 генів, з яких 18 точно визначені: 7 належать до підгрупи СЕА і 11 до підгрупи специфічних глікопротеїнів вагітності. Кілька представників підгрупи СЕА, ймовірно, мають здатність до клітинної адгезії. СЕА, ймовірно, бере участь у розвитку вродженого імунітету (Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9(2), 1999, сс. 67-81). У зв'язку з наявністю білків, близькоспоріднених до СЕА, може виникати задача отримання антитіл до СЕА, специфічних щодо СЕА, які мають при цьому мінімальну перехресну реактивність до інших близькоспоріднених білків.

25 СЕА раніше був ідентифікований як асоційований з пухлиною антиген (Gold і Freedman, J Exp Med., 121, 1965, сс. 439-462; Berinstein NL, J Clin Oncol., 20, 2002, сс. 2197-2207). Хоча СЕА спочатку був класифікований як білок, який експресується тільки в ембріональній тканині, в даний час СЕА виявлений в деяких типах здорових тканин дорослих особин. Ці тканини мають в основному епітеліальне походження і включають клітини шлунково-кишкової, респіраторної та сечостатевої систем, а також клітини ободової кишки, шийки матки, потових залоз і передміхурової залози (Nap та ін., Tumour Biol., 9 (2-3), 1988, сс. 145-153; Nap та ін., Cancer Res., 52(8), 1992, сс. 2329-2339).

30 У пухлинах епітеліального походження, а також їх метастазах СЕА присутній в якості асоційованого з пухлиною антигену. Хоча присутність СЕА саме по собі не свідчить про перетворення в ракову клітину, розподіл СЕА є показовим. У здорової тканини СЕА, як правило, експресується на апікальній поверхні клітини (Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9(2), 1999, сс. 67-81), роблячи її недоступною для антитіла, присутнього в кровотоці. На відміну від здорової тканини у випадку ракових клітин СЕА має тенденцію до експресії по всій їх поверхні (Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9 (2), 1999, сс. 67-81). Вказана зміна схеми експресії робить СЕА доступним для зв'язування з антитілом в ракових клітинах. Крім цього, в ракових клітинах зростає рівень експресії СЕА. Крім того, підвищений рівень експресії СЕА стимулює підвищену міжклітинну адгезію, що може призводити до метастазів (Marshall J., Semin Oncol., 30 (додаток 8), 2002, сс. 30-36).

45 СЕА легко відщеплюється від клітинної поверхні і проникає в кровоток з пухлин або безпосередньо, або через лімфатичні судини. Завдяки цій особливості рівень СЕА в сироватці використовували в якості клінічного маркера для діагностики різних видів раку та скринінгу щодо рецидиву різних видів раку, перш за все колоректального раку (Goldenberg D M., The International Journal of Biological Markers, 7, 1992, сс. 183-188; Chau I. та ін., J Clin Oncol., 22, 2004, сс. 1420-1429; Flamini та ін., Clin Cancer Res; 12(23), 2006, сс. 6985-6988). Ця особливість визначає також одну з можливостей застосування СЕА як мішень, оскільки присутній у сироватці СЕА зв'язується з більшістю доступних в даний час антитіл до СЕА, перешкоджаючи їх взаємодії з їх мішенями на клітинній поверхні і обмежуючи тим самим потенційні клінічні впливи.

55 Створені численні моноклональні антитіла до СЕА, придатні для дослідницьких цілей, в якості діагностичних "інструментів" і для терапевтичних цілей (див., наприклад, Nap та ін., Cancer Res., 52 (8), 1992, сс. 2329-2339; Sheahan та ін., Am. J. Clin. Path. 94, 1990, сс. 157-164; Sakurai та ін., J. Surg. Oncol., 42, 1989, сс. 39-46; Goldenberg D. M., The International Journal of Biological Markers, 7, 1992, сс. 183-188; Ledermann J. A., Br. J. Cancer, 58, 1988, с. 654; Ledermann J. A., Br. J. Cancer, 68, 1993, сс. 69-73; Pedley R. B. та ін., Br. J. Cancer, 68, 1993, сс. 69-73; Boxer G.M. та ін., Br. J. Cancer, 65, 1992, сс. 825-831). Chester з співавторами виділили

одноланцюгове антитіло до CEA з фаговою дисплейною бібліотекою з метою використання для радіоімунотестування і радіоімунотерапії (US 5876691), і в подальшому це антитіло було гуманізовано (US 7232888). Антитіла до CEA виділяли також з людських фагових дисплейних бібліотек (US 5872215).

Мишаче моноклональне антитіло PR1A3 отримували шляхом злиття клітин мієломи NS1 (P3/NS1/I-Ag-4-1) зі спленоцитами мишей, імунізованих здоровим колоректальним епітелієм (Richman PI і Bodmer WF, *Int. J. Cancer*, 39, 1987, сс. 317-328). Для PR1A3 характерно сильна взаємодія, як з добре, так і зі слабо диференційованими колоректальними карциномами, і воно має перевагу в порівнянні з іншими антитілами, які дають реакцію з колоректальним епітелієм, оскільки його антиген, ймовірно, фіксований на пухлині і не присутній в лімфатичних судинах або здорових лімфатичних вузлах, дренажних пухлину (Granowska M. та ін, *Eur. J. Nucl. Med.*, 20, 199, сс. 690-698, 1989). Наприклад, встановлено, що PR1A3 вступає у взаємодію з 59 з 60 колоректальних пухлин (Richman PI і Bodmer WF, *Int. J. Cancer*, 39, 1987, сс. 317-328), в той час як реактивне у відношенні CEA антитіло B72. 3 взаємодіяло тільки з 75 % колоректальних пухлин (Mansi L. та ін., *Int J Rad Appl Instrum B.*, 16(2), 1989, сс. 127-135).

Епітопне картування PR1A3 продемонструвало, що мішенню антитіла є B3-домен і GPI-якір молекули CEA (Durbin H. та ін, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1994, сс. 4313-4317). Таким чином, антитіло PR1A3 зв'язується тільки зі зв'язаним з мембраною CEA, але не з розчинною формою CEA, яка може бути присутньою в кровотоці які страждають на рак пацієнтів. Завдяки зазначеній особливості зв'язування мало ймовірно, щоб антитіло PR1A3 секвеструвалося сироватковим CEA; навпаки, його мішенню може бути CEA, експресований на ракових клітинах. Епітоп, з яким зв'язується PR1A3, являє собою конформаційний епітоп, а не лінійний епітоп, що, ймовірно, обумовлює зниження зв'язування PR1A3 з розчинною CEA (Stewart та ін., *Cancer Immunol Immunother*, 47, 1999, сс. 299-306).

Раніше антитіло PR1A3 гуманізували шляхом трансплантації CDR мишачого батьківського антитіла в каркасні ділянки 1-3 важкого ланцюга людського антитіла RF-TS3'CL (у якого зберігали мишачу каркасну ділянку 4 PR1A3) і в каркасні ділянки легкого ланцюга антитіла REI (Stewart та ін, *Cancer Immunol Immunother*, 47, 1999, сс. 299-306). Зазначена гуманізована версія PR1A3 зберігала специфічність і пов'язувалася з експресованими на поверхні CEA з афінністю, подібною з афінністю мишачого антитіла (Stewart та ін, *Cancer Immunol Immunother*, 47, 1999, сс. 299-306; US 5965710). Встановлено, що гуманізоване антитіло PR1A3 (hPR1A3) індукувало цілеспрямоване знищення ліній клітин колоректального раку (Conaghghan PJ та ін, *Br. J. Cancer*, 98 (7), сс. 1217-1225). Однак афінність hPR1A3 до CEA виявилася відносно низькою.

Мічені за допомогою радіоактивних ізотопів антитіла до CEA застосовували в клінічних випробуваннях на пацієнтах, що страждають на колоректальний рак. Наприклад, мічене за допомогою ¹²³I химерне мінітіло T84.66 (сТ84.66) застосовували в пілотному клінічному дослідженні на пацієнтах, що страждають на колоректальний рак. Мічене за допомогою радіоактивних ізотопів мінітіло мало здатність направлено впливати на ракові клітини (Wong JY та ін, *Clin Cancer Res.* 10 (15), 2004, сс. 5014-5021). В іншому прикладі ¹³¹I-лабетузамаб, тобто мічене за допомогою радіоактивного ізотопу антитіло до CEA, оцінювали як засіб допоміжної терапії на пацієнтах, які страждали на колоректальний рак, що дає метастази в печінку, і були отримані обнадійливі результати, що стосуються виживаності (Liersch T. та ін., *Ann. Surg. Oncol.* 14(9), 2007, сс. 2577-2590).

Глікозилювання антитіл

Олігосахаридний компонент може мати суттєвий вплив на властивості, що мають відношення до ефективності терапевтичного глікопротеїну, включаючи фізичну стабільність, стійкість до впливу протеаз, взаємодії з імунною системою, фармакокінетичні параметри і специфічну біологічну активність. Зазначені властивості можуть залежати не тільки від присутності або відсутності олігосахаридів, але також від їх специфічних структур. Можна зробити певні узагальнення, що стосуються взаємозв'язку між структурою олігосахариду і функцією глікопротеїну. Наприклад, деякі структури олігосахариду опосередковують швидкий кліренс глікопротеїну з кровотоку в результаті взаємодій зі специфічними зв'язуючими вуглеводи білками, а інші можуть зв'язуватися антитілами, і запускати небажані імунні реакції (Jenkins N. та ін., *Nature Biotechnol.* 14, 1996, сс. 975-981).

Було встановлено, що клітини ссавців є кращими хазяїнами для виробництва терапевтичних глікопротеїнів завдяки їх здатності глікозилювати білки з отриманням найбільш прийнятної для застосування на людині форми (Cumming DA та ін, *Glycobiology* 1, 1991, сс. 115-130; Jenkins N. та ін., *Nature Biotechnol.* 14, 1996, сс. 975-981). Бактерії дуже рідко глікозилюють білки, і подібно іншим типам звичайних хазяїнів, таких як клітини дріжджів, нитчастих грибів, комах і рослин, забезпечують схеми глікозилювання, асоційовані з швидким кліренсом з кровотоку, небажаними

імунними взаємодіями і в деяких випадках зниженою біологічною активністю. Серед клітин ссавців клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) знайшли найбільш широке застосування протягом двох останніх десятиліть. Крім забезпечення прийнятних схем глікозилування ці клітини дозволяють стійко отримувати генетично стабільні, високопродуктивні клональні клітинні лінії. Їх можна культивувати, досягаючи високої щільності, в простих біореакторах з використанням бессироваткових середовищ, і на їх основі можна розробляти безпечні та відтворювані біопроцеси. Іншими застосовуваними зазвичай клітинами тварин є клітини нирки дитинчати хом'яка (ВНК), клітини мишачої міеломи NSO і SP2 / 0. В останні роки вивчали також можливість їх виробництва у трансгенних тваринах (Jenkins N. та ін... *Nature Biotechnol.* 14, 1996, сс. 975-981).

Всі антитіла містять вуглеводні структури в консервативних положеннях в константних ділянках важкого ланцюга, при цьому кожен ізотип характеризується різною організацією N-пов'язаних вуглеводних структур, які надають різну дію на складання, секрецію і функціональну активність білка (Wright A. і Monison S.L., *Trends Biotech.* 15, 1997, сс. 26-32). Структура приєднаного N-зв'язаного вуглеводу значно варіюється залежно від ступеня процесування і може включати такі, що мають високий вміст манози, безліч розгалужень, а також біантенні складні олігосахариди (Wright A. і Morrison S.L., *Trends Biotech.* 15, 1997, сс. 26-32). Як правило, має місце гетерогенний процесинг корових олігосахаридних структур, приєднаних у конкретному сайті глікозилування, в результаті чого навіть моноклональні антитіла існують у вигляді декількох глікоформ. Було встановлено також, що основні відмінності в глікозилуванні антитіл мають місце між клітинними лініями, і навіть при вирощуванні даної клітинної лінії в інших умовах культивування виявлені невеликі відмінності (Lifely M.R. та ін., *Glycobiology* 5(8), 1995, сс. 813-22).

Одним із шляхів досягнення значного підвищення ефективності при збереженні простого процесу одержання і, який, мабуть, може забезпечувати відсутність значних небажаних побічних дій, є посилення що зустрічаються в природних умовах обумовлених клітиною ефекторних функцій моноклональних антитіл шляхом конструювання їх олігосахаридного компонента згідно з методом, описаним у Umana P. та ін., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, сс. 176-180; і US 6602684; повний зміст зазначених документів включено в даний опис як посилання. Антитіла IgG1-типу, які найбільш часто застосовують в імунотерапії раку, являють собою глікопротеїни, такі, що мають консервативний N-зв'язаний сайт глікозилування на Asn297 в кожному CH2-доміні. Два складних біантенних олігосахариду, приєднаних до Asn297, розташовуються між CH2-доменами, формуючи великі контакти з поліпептидним каркасом, і їх присутність є важливим для того, щоб антитіло могло здійснювати ефекторні функції, такі як антитіло-обумовлена клітинозалежна цитотоксичність (ADCC) (Lifely M.R. та ін., *Glycobiology* 5, 1995, сс. 813-822; Jefferis R. та ін., *Immunol. Rev.* 163, 1998, сс. 59-76; Wright A. і Morrison S.L., *Trends Biotechnol.* 15, 1997, сс. 26-32).

Раніше Umana з співавторами встановили, що надекспресія $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозамінілтрансферази III ("GnTIII"), тобто глікозилтрансферази, яка каталізує утворення бісекційних олігосахаридів в клітинах яєчника китайського хом'яка (CHO), значно підвищує *in vitro* ADCC-активність антинейробластомного химерного моноклонального антитіла (chCE7), продукованого сконструйованими CHO-клітинами (див. Umana P. та ін., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, сс. 176-180; та публікацію міжнародної заявки на патент WO 99/154342, повний зміст яких включено в даний опис як посилання). Антитіло chCE7 належить до великого класу некон'югованих МАт, які мають високий рівень афінності та специфічності відносно пухлин, але мають занадто низьку ефективність для їх клінічного застосування при виробництві в стандартних вживаних в промисловості клітинних лініях, в яких відсутній фермент GnTIII (Umana P. та ін., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, сс. 176-180). У цьому дослідженні вперше було продемонстровано, що значне підвищення ADCC-активності можна досягати шляхом створення продукуючих антитіла клітин, які експресують GnTIII, що призводить також до підвищення відносного вмісту асоційованих з константною ділянкою (Fc) бісекційних олігосахаридів, включаючи бісекційні нефукозильовані олігосахариди, порівняно з рівнями, характерними для таких, що зустрічаються в природних умовах антитіл.

Таким чином, зберігається необхідність у поліпшених терапевтичних підходах, заснованих цілеспрямованій дії на CEA, зокрема, на пов'язаний з мембраною CEA, для лікування різних видів раку.

Короткий виклад суті винаходу

Одним з об'єктів винаходу є варіант антигензв'язуючої молекули (АЗМ), такої як антитіло, який зв'язується зі зв'язаним з мембраною карциномембранальним антигеном (CEA). В одному з варіантів здійснення винаходу АЗМ має підвищену стабільність в порівнянні з її батьківською

молекулою. В одному з варіантів здійснення винаходу АЗМ має підвищену стабільність і зберігає або має поліпшену афінність зв'язування зі зв'язаним з мембраною СЕА в порівнянні з її батьківською молекулою. В одному з варіантів здійснення винаходу АЗМ є стабільною при температурі, яка щонайменше на 0,5, 1,0, 1,5 або 2,0 °C вище, ніж температура, при якій зберігає стабільність її батьківська молекула. В одному з варіантів здійснення винаходу підвищену стабільність оцінюють за допомогою аналізу динамічного розсіювання світла. В одному з варіантів здійснення винаходу батьківська молекула, з якою проводять порівняння, являє собою антитіло PR1A3 або гуманізовану версію антитіла PR1A3. В одному з варіантів здійснення винаходу батьківська молекула, з якою проводять порівняння, являє собою гуманізовану версію антитіла PR1A3, яка містить варіабельну ділянку важкого ланцюга CH7A (SEQ ID NO: 101) і варіабельну ділянку легкого ланцюга 2F1 (SEQ ID NO: 209). В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули є стабільним при температурі 67 °C або вище при оцінці, наприклад, за допомогою аналізу методом динамічного розсіювання світла. В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язування варіанту антигензв'язуючої молекули зі зв'язаним з мембраною СЕА характеризується величиною Kd 100нм-менш. В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язування варіанту антигензв'язуючої молекули зі зв'язаним з мембраною СЕА характеризується величиною Kd 10нм- або менше.

В одному з варіантів здійснення винаходу АЗМ містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить CDR1 важкого ланцюга, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 і SEQ ID NO: 12, CDR2 важкого ланцюга, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 і SEQ ID NO: 24, і CDR3 важкого ланцюга, вибраний з групи, що складається із SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 219 SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 223 і SEQ ID NO: 224. В одному з варіантів здійснення винаходу АЗМ містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить CDR1 легкого ланцюга, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 і SEQ ID NO: 45, і CDR2 легкого ланцюга, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 46 і SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 і SEQ ID NO: 55, і CDR3 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 56. В іншому варіанті здійснення винаходу варіабельна ділянка важкого ланцюга АЗМ містить CDR1 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 1, CDR2 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 13, CDR3 важкого ланцюга, вибраний з групи, що складається із SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 219 SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 223 і SEQ ID NO: 224; і варіабельна ділянка легкого ланцюга АЗМ містить CDR1 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 39, CDR2 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 49, і CDR3 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 56. У наступному варіанті здійснення винаходу АЗМ містить каркасні ділянки CH1A1A (SEQ ID NO: 261) або CH1A1B (SEQ ID NO: 262).

В одному з варіантів здійснення винаходу варіабельна ділянка важкого ланцюга АЗМ містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична послідовності, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 і SEQ ID NO: 247, і варіабельна ділянка легкого ланцюга АЗМ містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична послідовності SEQ ID NO: 209. В одному з варіантів здійснення винаходу варіабельна ділянка важкого ланцюга АЗМ містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 і SEQ ID NO: 247, і варіабельна ділянка легкого ланцюга АЗМ містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 209. У деяких варіантах здійснення винаходу АЗМ містить Fc-ділянку, наприклад, Fc-ділянку людського IgG. У деяких варіантах здійснення винаходу АЗМ є або антитілом або його фрагментом, наприклад, повне антитіло, scFv-фрагмент, Fv-фрагмент, F (ab ') 2-фрагмент, мінітіла, димерне антитіло (діабоді), тримерне антитіло (тріабоді) або тетрамерне антитіло (тетрабоді).

Іншим об'єктом винаходу є виділене антитіло, яке зв'язується зі зв'язаним з мембраною СЕА, де антитіло містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає CDR1 важкого ланцюга, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 і SEQ ID NO: 12, CDR2 важкого ланцюга, вибраний з групи, що складається із SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20,

SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 і SEQ ID NO: 24, і CDR3 важкого ланцюга, вибраний з групи, що складається із SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 219 SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 223 і SEQ ID NO: 224.

В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло має більш високу стабільність в порівнянні з його батьківською молекулою. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло є стабільним при температурі, яка щонайменше на 0,5, 1,0, 1,5 або 2,0 °C вища, ніж температура, при якій зберігає стабільність його батьківська молекула. В одному з варіантів здійснення винаходу підвищену стабільність оцінюють за допомогою аналізу динамічного розсіювання світла. В одному з варіантів здійснення винаходу батьківська молекула, з якою проводять порівняння, являє собою антитіло PR1A3 або гуманізовану версію антитіла PR1A3. В одному з варіантів здійснення винаходу батьківська молекула, з якою проводять порівняння, являє собою гуманізовану версію антитіла PR1A3, яка містить варіабельну ділянку важкого ланцюга CH7A (SEQ ID NO: 101) і варіабельну ділянку легкого ланцюга 2F1 (SEQ ID NO: 209). В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло є стабільним при температурі 67°C або вище при оцінці, наприклад, за допомогою аналізу методом динамічного розсіювання світла. В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язування антитіла зі зв'язаним з мембраною CEA характеризується величиною K_d 100нМ або менше. В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язування антитіла зі зв'язаним з мембраною CEA характеризується величиною K_d 10нМ або менше.

В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло містить також варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає CDR1 легкого ланцюга, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 і SEQ ID NO: 45, і CDR2 легкого ланцюга, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 46 і SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 і SEQ ID NO: 55, і CDR3, що має SEQ ID NO: 56. В одному з варіантів здійснення винаходу варіабельна ділянка важкого ланцюга антитіла містить CDR1 важкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 1, CDR2 важкого ланцюга, який має SEQ ID NO: 13, CDR3 важкого ланцюга, вибраний з групи, що складається із SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 219 SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 223 і SEQ ID NO: 224; і варіабельна ділянка легкого ланцюга антитіла містить CDR1 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 39, CDR2 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 49, і CDR3 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 56. У наступному варіанті здійснення винаходу антитіло містить каркасні залишки CH1A1A (SEQ ID NO: 261) або CH1A1B (SEQ ID NO: 262). В одному з варіантів здійснення винаходу варіабельна ділянка важкого ланцюга антитіла містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична послідовності, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 24 і SEQ ID NO: 247, та варіабельна ділянка легкого ланцюга антитіла містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична послідовності SEQ ID NO: 209. В одному з варіантів здійснення винаходу варіабельна ділянка важкого ланцюга антитіла містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 і SEQ ID NO: 247, і варіабельна ділянка легкого ланцюга антитіла містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 209.

У деяких варіантах здійснення винаходу АЗМ або антитіло з вищевказаних варіантів здійснення винаходу пов'язується з тим же епітопом, що і мишаче моноклональне антитіло PR1A3, або має здатність конкурувати за зв'язування з ним з мишачим моноклональним антитілом PR1A3.

В одному з варіантів здійснення винаходу АЗМ або антитіло містить Fc-ділянку, піддану глікоінженерії. В одному з варіантів здійснення винаходу щонайменше від приблизно 20 % до приблизно 100 % N-пов'язаних олігосахаридів в Fc-ділянці створеного за допомогою глікоінженерії антитіла є нефукозильованими. В одному з варіантів здійснення винаходу щонайменше від приблизно 20 % до приблизно 100 % N-пов'язаних олігосахаридів у створеній за допомогою глікоінженерії Fc-ділянці є бісекційними. В одному з варіантів здійснення винаходу щонайменше від приблизно 20 % до приблизно 50 % N-пов'язаних олігосахаридів у створеній за допомогою глікоінженерії Fc-ділянці є бісекційними, нефукозильованими. В одному з варіантів здійснення винаходу створена / створене за допомогою глікоінженерії АЗМ або антитіло має щонайменше одну підвищену ефекторну функцію. Підвищена ефекторна функція являє собою, наприклад, підвищену афінність зв'язування з Fc-рецептором, підвищену антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність (ADCC), підвищену здатність зв'язуватися з NK-клітинами, підвищену здатність зв'язуватися з макрофагами, підвищену здатність

зв'язуватися з моноцитами, підвищену здатність зв'язуватися з поліморфноядерними клітинами, контролювання передачі сигналів, які індукують апоптоз, підвищене дозрівання дендритних клітин і підвищене примірування Т-клітин. В одному з варіантів здійснення винаходу створена / створене за допомогою глікоінженерії АЗМ або антитіло має ADCC, підвищену від приблизно на 40 % до приблизно на 100 % в порівнянні з не підданою глікоінженерії батьківською антигензв'язуючою молекулою.

Іншим об'єктом винаходу є виділений полінуклеотид, який кодує АЗМ або антитіло по одному з описаних вище варіантів здійснення винаходу. Іншим об'єктом винаходу є вектор, що містить полінуклеотид, який кодує АЗМ або антитіло по одному з описаних вище варіантів здійснення винаходу. Іншим об'єктом винаходу є клітина-хазяїн, що містить вказаний вектор.

Іншим об'єктом винаходу є композиція, що містить АЗМ або антитіло по одному з описаних вище варіантів здійснення винаходу і фармацевтично прийнятний носій.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб індукції клітинного лізису пухлинної клітини, що полягає в тому, що приводять у контакт пухлинну клітину з АЗМ або антитілом по одному з описаних вище варіантів здійснення винаходу. В одному з варіантів здійснення винаходу пухлинна клітина являє собою клітину колоректального раку, NSCLC (недрібноклітинний рак легені), клітину раку шлунка, клітину раку підшлункової залози чи клітинку раку молочної залози. В одному з варіантів здійснення винаходу клітинний лізис індукується антитілозалежною клітинною цитотоксичністю АЗМ або антитіла.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб лікування індивідуума, який страждає на рак, при якому відбувається аномальна експресія СЕА, що полягає в тому, що вводять індивідууму в терапевтично ефективній кількості АЗМ або антитіло за одним з описаних вище варіантів здійснення винаходу.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб подовження часу доживання індивідуума, який страждає на рак, при якому відбувається аномальна експресія СЕА, що полягає в тому, що вводять вказаному індивідууму в терапевтично ефективній кількості АЗМ або антитіло за одним з описаних вище варіантів здійснення винаходу. В одному з варіантів здійснення винаходу рак являє собою колоректальний рак, NSCLC (недрібноклітинний рак легені), рак шлунка, рак підшлункової залози або рак молочної залози.

У деяких варіантах цих способів АЗМ, антитіло або композицію застосовують у поєднанні з хіміотерапією або променевою терапією. В одному з варіантів здійснення винаходу індивідуум являє собою людину.

Іншим об'єктом винаходу є застосування АЗМ або антитіла за одним з описаних вище варіантів здійснення винаходу для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування індивідуума, який страждає на рак, при якому відбувається аномальна експресія СЕА. В одному з варіантів здійснення винаходу рак вибирають з групи, що включає колоректальний рак, NSCLC (недрібноклітинний рак легені), рак шлунка, рак підшлункової залози та рак молочної залози.

Короткий опис креслень

На кресленнях показано:

на фіг. 1 - схематична діаграма антигену СЕА (CEACAM-5, CD66e). Антитіло PR1A3 зв'язується специфічно з В3-доменом антигену в тому випадку, коли він пов'язаний з клітинною мембраною;

на фіг. 2 - дані, що демонструють більш високу ADCC-активність створеного за допомогою глікоінженерії химерного антитіла PR1A3 в порівнянні з не підданим глікоінженерії химерним антитілом PR1A3 при використанні людських РВМС в якості клітин-ефекторів;

на фіг. 3 - порівняння антигензв'язуючої активності гуманізованого антитіла PR1A3, яке містить конструкцію варіабельної ділянки важкого ланцюга, а саме CH7A, і конструкцію варіабельної ділянки легкого ланцюга, а саме CL1A, і химерного антитіла PR1A3;

на фіг. 4 - сайти рандомізації, призначені для створення бібліотекою антитіл для дозрівання афінності легкого ланцюга гуманізованого антитіла PR1A3. Рандомізовані позиції позначені символом Х;

на фіг. 5 - сайти рандомізації, призначені для створення бібліотекою антитіл для дозрівання афінності важкого ланцюга гуманізованого антитіла PR1A3. Рандомізовані позиції позначені символом Х;

на фіг. 6 - дані про активність зв'язування антитіл до СЕА з дозрілою афінністю, виведених з гуманізованого антитіла PR1A3, яке містить конструкцію варіабельної ділянки важкого ланцюга CH7ArF9 і конструкцію варіабельної ділянки легкого ланцюга CL1ArH11;

на фіг. 7 - результати дослідження з оцінки ефективності, проведеного на SCID / bg-мишах, яким вводили всередину селезінки клітини людської колоректальної карциноми лінії LS174T для

створення ортотопічної моделі пухлини. Лікування антитілом починали через сім днів шляхом ін'єкції антитіла в дозі 25 мг / кг ваги тіла з наступним здійсненням двох додаткових ін'єкцій один раз на тиждень. "CH7A" означає представлене в даному описі гуманізоване антитіло, що містить CDR PR1A3. "SM3E" означає раніше створене антитіло до CEA. "GA201" означає гуманізоване антитіло до EGF, яке застосовували в якості позитивного контролю. "ЗФР" означає забуферений фосфатом фізіологічний розчин, який застосовували в якості негативного контролю. Виживання оцінювали з використанням критеріїв завершення, встановлених швейцарськими регулюючими органами;

на фіг. 8 - результати дослідів з оцінки ефективності, проведеного на SCID / bg-мишах, яким вводили внутрішньовенно клітини карциноми легені лінії A549, підживлюючи пухлини в легені тварин. Лікування антитілом починали через сім днів шляхом ін'єкції антитіла в дозі 25 мг / кг ваги тіла з наступним здійсненням двох додаткових ін'єкцій один раз на тиждень. "CH7A", "SM3E" і "GA201" мають значення, подані вище на фіг. 7. "CH7ArF9 CL1A rH11" означає варіант антитіла CH7A з важкими і легкими ланцюгами з дозрілою афінністю. Скорочення "ge" означає, що антитіло створено за допомогою глікоінженерії, в результаті у нього знижено кількість фукозильованих олігосахаридів в Fc-ділянці. "Наповнювач" означає негативний контроль. Клітини карциноми легені лінії A549 є виражено позитивними відносно експресії EGFR і слабо позитивними відносно експресії CEA;

на фіг. 9 - результати дослідів з оцінки ефективності, проведеного на SCID / bg-мишах, яким вводили всередину селезінки клітини шлункової карциноми лінії MKN45, отримуючи метастази пухлин в печінці тварин. "CH7ArF9 CL1A rH11", "SM3E", "ge" і "ЗФР" мають значення, подані на фіг. 7 і 8, вище;

на фіг. 10 - результати аналізу кінетичних характеристик клонів з дозрілою афінністю: (а)-сенсограми Fab-фрагментів антитіл до CEA, мають важкий ланцюг з дозрілою афінністю CH7A H4E9 (SEQ ID NO: 199) у поєднанні з легким ланцюгом з недозрілою афінністю CL1A (SEQ ID NO: 105); легкий ланцюг з дозрілою афінністю CL1A pAC18 (SEQ ID NO: 209), об'єднану з важким ланцюгом з недозрілою афінністю CH7A; та їх комбінації, а саме CH7A H4E9 і CL1A pAC18 (SEQ ID NO: 199 і 209); (б) узагальнення результатів аналізу кінетичних характеристик клонів з дозрілою афінністю;

на фіг. 11 - схематичне зображення заснованої на ПЛП стратегії (ПЛП-стратегії) рандомізації CDR1 і CDR2 гуманізованого важкого ланцюга CH7A антитіла до CEA;

на фіг. 12 - схематичне зображення ПЛП-стратегії рандомізації CDR1 і CDR2 гуманізованого легкого ланцюга CL1A антитіла до CEA;

на фіг. 13 - схематичне зображення ПЛП-стратегії рандомізації CDR3 гуманізованого важкого ланцюга CH7A антитіла до CEA;

на фіг. 14 - схематичне зображення ПЛП-стратегії рандомізації CDR3 гуманізованого легкого ланцюга CL1A антитіла до CEA;

на фіг. 15 - дані про афінність зв'язування антитіл до CEA зі зв'язаним з мембраною CEA на клітинах-мішенях лінії MKN45. Гуманізовані антитіла до CEA мали або легкі ланцюги з дозрілою афінністю (панель А, CH7A, CL1ArH7 або CH7A, CL1ArH11), або і важкі, і легкі ланцюги з дозрілою афінністю (панель Б, CH7A rB9, CL1A rH11 G2 (1)), які при перетворенні на формат IgG відрізнялися поліпшеною здатністю до зв'язування в порівнянні з контрольним антитілом (CH7A, CL1A);

на фіг. 16 - порівняння результатів аналізу антитіло-обумовленої клітинозалежної цитотоксичності (ADCC) антитіл з дозрілою афінністю (CH7ArB9, CL1A rH11G2 (1), CH7Arf9, CL1A rH11G2 (1) і CH7A, CL1A rH11 G2 (1)) і контрольних антитіл (CH7A, CL1A G2(R2));

на фіг. 17 - порівняння результатів аналізу клітинного зв'язування антитіла до CEA, що має важкий ланцюг CH1A, і мишачого-людського химерного антитіла chPR1A3;

на фіг. 18 - результати аналізу клітинного зв'язування антитіл до CEA, які мають важкий ланцюг CH1A1, CH1A2, CH1A3 або CH1A4 і легкий ланцюг 2F1;

на фіг. 19 - результати оцінки стабільності антитіл до CEA, які мають важкий ланцюг CH1A1, CH1A2, CH1A3 або CH1A4;

на фіг. 20 - результати аналізу методом резонансу поверхневого плазмону (SPR) антитіл до CEA, отриманих з CH1A1;

на фіг. 21 - результати аналізу клітинного зв'язування антитіл до CEA, отриманих з CH1A1;

на фіг. 22 - дані про афінність, отримані методом резонансу поверхневого плазмону (SPR) (при оцінці в двовалентній формі), стабільно сконструйованих антитіл до CEA в порівнянні з батьківським антитілом з важким ланцюгом 5HFF12;

на фіг. 23 і 24 - результати оцінки стабільності антитіла з дозрілою афінністю 5HFF12 в порівнянні з його батьківським антитілом з важким ланцюгом CH7A з вибраними

індивідуальними інтродукованими точковими мутаціями в 5HFF12;

на фіг. 25 - результати аналізу методом резонансу поверхневого плазмону об'єднаних варіантів каркасної ділянки та CDR-H3;

на фіг. 26 - дані про ADCC-активності варіантів каркасної ділянки на основі CHA1A;

5 на фіг. 27 - дані про ADCC-активності варіантів каркасної ділянки на основі CHA1A;

на фіг. 28 - дані про ADCC-активності об'єднаних варіантів каркасної ділянки CDR-H3;

на фіг. 29 - дані про ADCC-активності об'єднаних варіантів каркасної ділянки CDR-H3;

на фіг. 30 - дані про ефективність створеного за допомогою глікоінженерії антитіла до CEA CH1A1A (Y98A/D99Y) x 2F1, отримані на моделі колоректальної карциноми, яка створена з використанням ксенотрансплантата на SCID-мишах, трансгенних за людським CD16;

10 на фіг. 31 - дані про ефективність створеного за допомогою глікоінженерії антитіла до CEA CH1A1A (Y98A/D99Y) x 2F1, отримані на моделі карциноми легені A549, яка створена з використанням ксенотрансплантата на SCID-мишах, трансгенних за людським CD16;

на фіг. 32 - амінокислотні послідовності CDR різних анти-CEA A3M;

15 на фіг. 33 - амінокислотні послідовності конструкцій легких ланцюгів різних анти-CEA A3M;

на фіг. 34A-B - амінокислотні послідовності CDR важких і легких ланцюгів з дозрілою афінністю і дані про відповідні афінності зв'язування;

на фіг. 35 - константи афінності антитіл з дозрілою афінністю з різними послідовностями;

на фіг. 36 - амінокислотні послідовності CDR-H3 різних анти-CEA A3M;

20 на фіг. 37A-B - амінокислотні послідовності VH-ділянок різних анти-CEA A3M;

на фіг. 38 - результати порівняльного аналізу амінокислотних послідовностей VH-ділянок зрілих антитіл до CEA, які мають різну стабільність.

Докладний опис винаходу

Визначення

25 Поняття, що застосовуються в даному описі, мають значення, загальноприйняті в даній галузі, якщо із контексту не випливає інше.

У контексті даного опису поняття "антигензв'язуюча молекула" в найбільш широкому сенсі відноситься до молекули, яка специфічно зв'язується з антигенною детермінантою. Прикладом антигензв'язуючої молекули є (але, не обмежуючись лише ним) антитіло або його фрагмент, який зберігає здатність специфічно зв'язуватися зі специфічним антигеном. Більш конкретно, в контексті даного опису "антигензв'язуюча молекула, яка зв'язується зі зв'язаним з мембраною людським карциноємбріональним антигеном (CEA)», являє собою A3M, яка специфічно зв'язується з CEA, більш конкретно, з присутнім на клітинній поверхні або пов'язаним з мембраною CEA. Поняття "специфічно зв'язується" означає, що зв'язування є виборчим відносно антигену і його можна відрізнити від небажаних або неспецифічних взаємодій.

35 У контексті даного опису поняття "антитіло" відноситься до повних молекул антитіл, включаючи моноклональні, поліклональні і мультиспецифічні (наприклад, біспецифічні) антитіла, а також фрагменти антитіл, які мають Fc-ділянку і зберігають специфічність зв'язування, і до злитих білків, які включають ділянку, еквівалентну Fc-ділянки імуноглобуліну, і які зберігають специфічність зв'язування. Під обсяг винаходу підпадають також фрагменти антитіл, які зберігають специфічність зв'язування, такі як (але, не обмежуючись лише ними) VH-фрагменти, VL-фрагменти, Fab-фрагменти, F (ab ') 2-фрагменти, scFv-фрагменти, Fv-фрагменти, мінітіла, димерні, тримерні і тетрамерні антитіла (див., наприклад, Hudson і Souriau, Nature Med. 9, 2003, сс. 129-134).

45 У контексті даного опису поняття "антигензв'язуючий домен" належить до частини антигензв'язуючої молекули, яка містить ділянку, специфічно зв'язуватися і яка є комплементарною частини антигену або повного антигену. Якщо антиген є великим, то антигензв'язуюча молекула може зв'язуватися тільки з конкретною частиною антигену, яку називають епітопом. Антигензв'язуючий центр може являти собою, наприклад, один або кілька варіабельних доменів антитіла. Переважно антигензв'язуючий центр містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL) антитіла та варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH) антитіла.

50 У контексті даного опису поняття "з дозрілою афінністю" щодо антигензв'язуючих молекул (наприклад, антитіл) відноситься до антигензв'язуючої молекули, отриманої з антигензв'язуючої референс-молекули, наприклад, за допомогою мутацій, яка зв'язується з тим же антигеном, переважно пов'язується з тим же епітопом, що і референс-антитіло; і яка має більш високу афінність до антигену в порівнянні з антигензв'язуючою референс-молекулою. Дозрівання афінності, як правило, включає модифікацію одного або декількох амінокислотних залишків в одному або декількох CDR антигензв'язуючої молекули. Як правило, антигензв'язуюча молекула з дозрілою афінністю пов'язується з тим же епітопом, що і початкова антигензв'язуюча референс-молекула.

60

У контексті даного опису "афінність зв'язування", як правило, описують за допомогою понять констант асоціації або дисоціації (K_a або K_d відповідно), які, в свою чергу, являють собою зворотні відносини величин констант швидкості дисоціації та асоціації (k_d і k_a відповідно). Таким чином, еквівалентні афінності можуть відповідати різним константам швидкості, якщо співвідношення констант швидкості залишається таким же.

У контексті даного опису поняття "Fc-ділянка" відноситься до C-кінцевий ділянки важкого ланцюга IgG. Хоча прилеглі до Fc-ділянки ділянки важкого ланцюга IgG можуть злегка відрізнятися, Fc-ділянка важкого ланцюга людського IgG, як правило, являє собою ділянку ланцюга, що тягнеться від амінокислоти Cys226 до карбоксильного кінця.

У контексті даного опису поняття "ділянка, еквівалентна Fc-ділянки імуноглобуліну" відноситься до алейних варіантів що зустрічаються в природних умовах Fc-ділянки імуноглобуліну, а також варіантів, які мають зміни, які отримують в результаті заміни, додавань або делецій, але які не знижують в значній мірі здатність імуноглобуліну опосередковувати ефекторні функції (такі як антитіло-обумовлена клітинозалежна цитотоксичність). Наприклад, одну або кілька амінокислот можна вилучати шляхом делеції з N-кінця або C-кінця Fc-ділянки імуноглобуліну без істотного зниження біологічної функції. Такі варіанти можна відбирати згідно з загальними правилами, які відомі в даній галузі, так, щоб надавати мінімальний вплив на активність (див., наприклад, Bowie J. U. та ін., Science 247, 1990, сс. 1306-1310).

У контексті даного опису поняття "пов'язаний з мембраною людський CEA" відноситься до людського карциноембріонального антигену (CEA) », який пов'язаний з що представляє собою мембрану ділянкою клітини або з поверхнею клітини, зокрема, поверхнею пухлинної клітини. Поняття "пов'язаний з мембраною людський CEA" може в певних обставинах відноситися до CEA, який не пов'язаний з мембраною клітини, але який був сконструйований так, щоб оберігати епітоп від зв'язування з антитілом PR1A3. Поняття "розчинна CEA" відноситься до людського карциноембріонального антигену, який не пов'язаний або відщеплений від клітинної мембрани або клітинної поверхні (наприклад, поверхні пухлинної клітини), та / або який, як правило, не оберігає конформаційний епітоп, з яким зв'язується антитіло PR1A3. Розчинна CEA, наприклад, може бути присутньою в кровотоці або лімфатичних судинах індивідуума який страждає на рак.

У контексті даного опису поняття "не має істотну перехресну реактивність до розчинного CEA" означає, що молекула (наприклад, антигензв'язуюча молекула) не може розпізнавати або не зв'язується специфічно з розчинною CEA, насамперед порівняно зі зв'язаним з мембраною CEA. Наприклад, антигензв'язуюча молекула може зв'язувати від менше ніж приблизно 10 % до менше ніж приблизно 5 % розчинного CEA, або може зв'язувати розчинний CEA в кількості, вибраній з групи, що включає кількості розчинного CEA, що становлять менш ніж приблизно 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,2 % і 0,1 %, переважно менше ніж приблизно 2 %, 1 % або 0,5 % розчинного CEA, і найбільш переважно менше ніж приблизно 0,2 % або 0,1 % розчинного CEA.

У контексті даного опису поняття "злитий" і "химерний" щодо поліпептидів, таких як АЗМ, належить до поліпептидів, які містять амінокислотні послідовності, виведені з двох або більшої кількості гетерологічних поліпептидів, таких як фрагменти антитіл з різних видів. Для химерних АЗМ, наприклад, незв'язуючі антиген компоненти можна отримувати з широкого розмаїття видів, включаючи приматів, таких як шимпанзе, і люди. Константна ділянка химерної АЗМ, як правило, є практично ідентичною константній ділянці який зустрічає в природних умовах людського антитіла; варіабельна ділянка химерного антитіла, як правило, містить послідовність, яка виведена з рекомбінантного антитіла до CEA, що має амінокислотну послідовність варіабельної ділянки мишачого антитіла PR1A3. Найбільш кращою формою злитого або химерного антитіла є гуманізовані антитіла.

У контексті даного опису поняття "гуманізована" відноситься до антигензв'язуючої молекули, отриманої з антигензв'язуючої молекули з організму крім людини, наприклад, мишачого антитіла, яка зберігає або практично зберігає антигензв'язуючі властивості батьківської молекули, але яка є менш імуногенною для людей. Це можна досягати за допомогою різних методів (позначені в контексті даного опису як методи "гуманізації"), які включають (але, не обмежуючись тільки ними) (а) трансплантацію повних нелюдських варіабельних ділянок в людські константні ділянки з отриманням химерних антитіл, (б) трансплантацію тільки нелюдських (наприклад, з антигензв'язуючої молекули-донора) CDR в людський (наприклад, в антигензв'язуючу молекулу-реципієнта) каркасну ділянку і константні ділянки із збереженням таких, що мають вирішальне значення залишків каркасної ділянки (наприклад, залишків, важливих для збереження гарної афінності до зв'язування антигену або функцій антитіла) або без їх збереження, або (в) трансплантацію повних нелюдських варіабельних ділянок, але з їх "маскуванням" ділянкою, що нагадує людську, шляхом заміни тих, що знаходяться на поверхні

залишків. Такі методи описані у Jones та ін., Morrison та ін., Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 1984, сс. 6851-6855; Morrison і Oi, Adv. Immunol., 44, 1988, сс. 65-92; Verhoeyen та ін., Science, 239, 1988, сс. 1534-1536; Padlan, Molec. Immun., 28, 1991, сс. 489-498; Padlan, Molec. Immun., 31(3), 1994, сс. 169-217, всі зазначені публікації повністю включені в даний опис як посилання. У кожній з варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюга антитіла, як правило, присутні 3 гіперваріабельних ділянки або CDR (CDR1, CDR2 і CDR3), які фланковані чотирма каркасними підобластями (ділянками) (тобто, FR1, FR2, FR3 і FR4) в кожній з варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюга антитіла: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Обговорення гуманізованих антитіл представлено серед іншого в US 6632927, і в опублікованій заявці на патент США №. 2003/0175269, обидва документи повністю включені в даний опис в якості посилання. Для досягнення гуманізації можна трансплантувати також укорочені CDR, які містять тільки визначають специфічність амінокислотні залишки даного CDR, у вибрану каркасну ділянку. Під "залишками, які визначають специфічність" мають на увазі залишки, які безпосередньо беруть участь в специфічній взаємодії з антигеном і / або які необхідні для специфічного зв'язування антигену. В цілому, у зв'язуванні з антигеном беруть участь тільки приблизно від однієї п'ятої до однієї третини залишків у конкретному CDR. Залишки, які визначають специфічність, в конкретному CDR можна ідентифікувати, наприклад, шляхом розрахунку внутрішньоатомних контактів на основі тривимірних моделей і визначення варіабельності послідовностей в даному положенні залишку згідно методів, описаних у Padlan та ін., FASEB J. 9 (1), 1995, сс. 133-139, зміст публікації повністю включено в даний опис в якості посилання.

У деяких випадках залишки каркасної ділянки (FR) людського імуноглобуліну замінюють на відповідні залишки нелюдського імуноглобуліну. Крім того, гуманізовані антигензв'язуючі молекули можуть містити залишки, відсутні в антитілі-реципієнті або антитілі-донорі. Ці модифікації здійснюють з метою додаткового поліпшення характеристик антигензв'язуючих молекул. Як правило, гуманізована антигензв'язуюча молекула може містити практично всю щонайменше одну і, як правило, дві варіабельних ділянки, в яких щонайменше один або практично все, або все гіперваріабельні ділянки відповідають ділянкам нелюдського імуноглобуліну, і все або практично все FR являють собою ділянки, що мають послідовність людського імуноглобуліну. Гуманізована антигензв'язуюча молекула необов'язково може містити також щонайменше частину константної ділянки (Fc) імуноглобуліну, як правило, людського імуноглобуліну (див., наприклад, Jones та ін., Nature 321, 1986, сс. 522-525; Reichmann та ін., Nature 332, 1988, сс. 323-329; і Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 1992, сс. 593-596).

Аналогічно цьому, в контексті даного опису поняття "приматизована" відноситься до антигензв'язуючої молекули, отриманої з антигензв'язуючої молекули організму крім примату, наприклад, мишачого антитіла, яка зберігає або практично зберігає антигензв'язуючі властивості батьківської молекули, але яка є менш імуногенною для приматів.

У контексті даного опису поняття "варіант" (або "аналог") поліпептиду або поліпептиду належить до поліпептиду або поліпептиду, який відрізняється від конкретного зазначеного поліпептиду або поліпептиду, запропонованого у винаході, наявністю інсерцій, делецій і заміни, створених наприклад, за допомогою методу рекомбінантної ДНК. Зокрема, рекомбінантні варіанти, що кодують такі ж або подібні поліпептиди, можна синтезувати або відбирати на основі "надмірності" генетичного коду. Різні заміни кодонів, такі як "мовчазні" заміни, які призводять до отримання різних сайтів рестрикції, можна інтродуціювати з метою оптимізації клонування в плазмідному або вірусному векторі або експресії в конкретній прокаріотичній або еукаріотичній системі. Мутації в поліпептидній послідовності можуть проявлятися в поліпептиді або доменах інших пептидів, доданих до поліпептиду для модифікації властивостей будь-якого фрагмента поліпептиду з метою зміни характеристик, таких як афінність зв'язування ліганда, міжланцюгова афінність або швидкість розщеплення / оновлення.

У контексті даного опису поняття "варіант антигензв'язуючої молекули, мішенню якої є СЕА" відноситься до молекули, яка відрізняється за амінокислотною послідовністю від "батьківської" антигензв'язуючої молекули, мішенню якої є СЕА, завдяки додаванню, делеції та / або заміні одного або декількох амінокислотного (их) залишку (ів) в послідовності батьківського антитіла. У конкретному варіанті здійснення винаходу варіант містить одну або кілька амінокислотну (их) заміну (н) в одному або декількох гіперваріабельному (их) ділянці (ах) або CDR важкого і / або легкого ланцюга батьківської антигензв'язуючої молекули. Наприклад, варіант може містити щонайменше одну, наприклад, від приблизно однієї до приблизно десяти (тобто приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10) і переважно від приблизно двох до приблизно п'яти заміни в одному або декількох гіперваріабельних ділянках або CDR (тобто в 1, 2, 3, 4, 5 або 6 гіперваріабельних ділянках або CDR) батьківської антигензв'язуючої молекули. Варіант антигензв'язуючої

молекули, мішенню якої є CEA, може нести одне (одну) або кілька додавань, делецій та / або замінів в одному або декількох каркасних ділянках або важкого, або легкого ланцюга. Як правило, варіант повинен мати амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотним послідовностям варіабельних ділянок важкого або легкого ланцюга батьківської антигензв'язуючої молекули, як правило, ідентична щонайменше приблизно на 80 %, 90 %, 95 % або 99 %. Ідентичність послідовностей згідно з цим описом визначають як відсоток амінокислотних залишків у послідовності-кандидаті, які ідентичні залишкам батьківського антитіла після вирівнювання послідовності та інтродукції при необхідності проломів для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовностей. Ні N-кінцеві, ні C-кінцеві, ні внутрішні подовження, делеції або інсерції в послідовності антитіла не слід розглядати як такі, які роблять вплив на ідентичність або гомологію послідовностей. Варіант антигензв'язуючої молекули зберігає здатність зв'язуватися зі зв'язаним з мембраною людським CEA. В одному з варіантів здійснення винаходу анти-CEA АЗМ пов'язується з тим же епітопом, що і батьківська антигензв'язуюча молекула. В одному з варіантів здійснення винаходу анти-CEA АЗМ конкурує за зв'язування зі зв'язаним з мембраною людським CEA з батьківською антигензв'язуючою молекулою. В одному з варіантів здійснення винаходу анти-CEA АЗМ зв'язується зі зв'язаним з мембраною CEA і не зв'язується з розчинним людським CEA. Анти-CEA АЗМ має властивості, поліпшені порівняно з властивостями батьківської антигензв'язуючої молекули. Наприклад, варіант може характеризуватися більш сильною афінністю зв'язування, підвищеною стабільністю та / або підвищеною здатністю індукувати антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність *in vitro* і *in vivo*. В одному з варіантів здійснення винаходу анти-CEA АЗМ має підвищеною стабільністю і зберігає афінність зв'язування або має поліпшену афінність зв'язування зі зв'язаним з мембраною CEA і зберігає здатність або має підвищену здатність індукувати антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність *in vitro* і *in vivo*.

Для аналізу зазначених властивостей, як правило, потрібно проводити порівняння варіанту антигензв'язуючої молекули і батьківської антигензв'язуючої молекули в одному і тому ж форматі; наприклад, Fab-форму варіанту антигензв'язуючої молекули з Fab-формою батьківської антигензв'язуючої молекули або повнорозмірну форму варіанту антигензв'язуючої молекули з повнорозмірною формою батьківської антигензв'язуючої молекули. В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули має підвищену щонайменше приблизно в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 разів біологічну активність в порівнянні з біологічною активністю батьківської антигензв'язуючої молекули. В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули являє собою варіант зі сконструйованою стабільністю, що має підвищену стабільність в порівнянні з батьківською антигензв'язуючою молекулою. Стабільність можна оцінювати за допомогою будь-якого методу, відомого в даній галузі, і за допомогою методів, представлених в даному описі, зокрема, в прикладах 3-6. У конкретних варіантах здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули має підвищену щонайменше приблизно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 40, 50, 100 раз стабільністю в порівнянні з батьківською антигензв'язуючою молекулою.

У деяких варіантах здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули має підвищену стабільність, яку визначають по зміні параметра стабільності в порівнянні з батьківською антигензв'язуючою молекулою. У деяких варіантах здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули має змінений щонайменше приблизно 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 40, 50, 100 раз параметром стабільності в порівнянні з батьківською антигензв'язуючою молекулою. Параметр стабільності являє собою, наприклад, температуру, при якій варіант антигензв'язуючої молекули розгортається (втрачає укладку) або відбувається його денатурація, тиск, при якому варіант антигензв'язуючої молекули втрачає укладку або відбувається його денатурація, або час, необхідний для денатурації або втрати укладання варіанту антигензв'язуючої молекули, в умовах, створених для додання варіанту антигензв'язуючої молекули нестабільності. В одному з варіантів здійснення винаходу підвищення стабільності визначають за допомогою термічного аналізу денатурації, наприклад, диференціальної скануючої калориметрії (ДСК). В одному з варіантів здійснення винаходу підвищення стабільності визначають за допомогою аналізу хімічної денатурації. В одному з варіантів здійснення винаходу підвищення стабільності визначають, використовуючи аналіз при підвищеному тиску. В іншому варіанті здійснення винаходу стабільність варіанту антигензв'язуючої молекули визначають з використанням поляризаційного флуоресцентного аналізу. В одному з варіантів здійснення винаходу стабільність варіанту антигензв'язуючої молекули визначають з використанням аналізу динамічного розсіювання світла (ДРС) (див.

розділ "Приклади" і, наприклад, у Nobbmann U. та ін., Biotech. Genetic Eng. Rev. 24, 2007, сс. 117-128). ДРС дозволяє здійснювати моніторинг цілісності молекули, такої як антитіло, для якої, в цілому, підвищення показника розсіювання світла свідчить про втрату укладання або денатурації білку. За допомогою ДРС можна здійснювати оцінку молекул залежно від температури або хімічних денатуруючих агентів для порівняння відносної стабільності. Ті молекули, які зберігають їх нативну конформацію (невелике підвищення або відсутність підвищення показників ДРС), розглядаються як стабільні в умовах проведення випробувань. В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули був стабільним при температурі, яка щонайменше на 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4, 0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 або 10,0 °C була вище, ніж для батьківської АЗМ чи іншої придатної референс-молекули, при аналізі з використанням динамічного розсіювання світла. В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули був стабільним при температурі 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 °C або вище. Термічну стабільність можна оцінювати, наприклад, за допомогою ДРС, ДСК або поляризаційної флуоресценції. В одному з варіантів здійснення винаходу термічну стабільність варіанту антигензв'язуючої молекули оцінюють за допомогою ДРС. В одному з варіантів здійснення винаходу ДРС-аналіз здійснюють, використовуючи 1 мг / мл АЗМ або варіанта АЗМ в буфері, що містить 20мм гістидин і 140мм NaCl, при рН 6,0. ДРС-аналіз здійснюють, починаючи з 25 °C, збільшуючи температуру зі швидкістю 0,05 °C / хв.

Поняття "батьківська" антигензв'язуюча молекула належить до АЗМ, яку застосовують в якості вихідної або основи для отримання варіанту. У конкретному варіанті здійснення винаходу батьківська антигензв'язуюча молекула має людську каркасну ділянку і, якщо присутня (і), людську (і) константну (і) ділянку (и) антитіла. Наприклад, батьківське антитіло може представляти собою гуманізоване або людське антитіло.

Амінокислотні "заміни" можуть бути результатом заміни однієї амінокислоти іншою амінокислотою, яка має подібні структурні та / або хімічні властивості, тобто можуть являти собою консервативні амінокислотні заміни. "Консервативні" амінокислотні заміни можна створювати на основі подібності в полярності, заряді, розчинності, гідрофобності, гідрофільності і / або амфіпатичної природи використовуваних для цієї мети залишків. Наприклад, до неполярних (гідрофобних) амінокислот відносяться аланін, лейцин, ізолейцин, валін, пролін, фенілаланін, триптофан і метіонін; до полярних нейтральних амінокислот відносяться гліцин, серин, треонін, цистеїн, тирозин, аспарагін і глутамін; до позитивно заряджених (основних) амінокислот відносяться аргінін, лізин та гістидин; і до негативно заряджених (кислотних) амінокислот відносяться аспарагінова кислота і глутамінова кислота. "Інсерції" або «делеції» бажано зачіпають приблизно 1-20 амінокислот, більш краще 1-10 амінокислот і ще більш краще від приблизно 2 до приблизно 5 амінокислот. Неконсервативні заміни передбачають заміну представника одного з цих класів на представника іншого класу. Наприклад, амінокислотні заміни можуть бути також результатом заміни однієї амінокислоти на іншу амінокислоту, яка має інші структурні / або хімічні властивості, наприклад заміни амінокислоти з однієї групи (наприклад, полярної) на іншу амінокислоту з відмінної від першої групи (наприклад, основної). Прийнятну варіацію можна визначати експериментально, систематично створюючи інсерції, делеції або заміни амінокислот у поліпептидній молекулі за допомогою методів рекомбінантної ДНК і аналізуючи активність одержаних рекомбінантних варіантів.

У контексті даного опису поняття "одноланцюговий Fv" або "scFv" відноситься до фрагмента антитіла, який містить VH-домен і VL-домен у вигляді одного поліпептидного ланцюга. Як правило, VH-і VL-домени з'єднані лінкерною послідовністю (див., наприклад, Pluckthun, в: Pharmacology of Monoclonal Antibodies, т. 113, під ред. Rosenberg і Moore, вид-во Springer-Verlag, New York, 1994, сс. 269-315).

У контексті даного опису поняття "мінітіло" відноситься до двовалентного гомодимерного похідному scFv, яке містить константну ділянку, як правило, CH3-домен імуноглобуліну, переважно IgG-типу, більш краще IgG1, в якості області димеризації. Як правило, константна ділянка пов'язана з scFv через шарнірну ділянку і / або лінкерну ділянку. Приклади білків мінітіл представлені у Hu та ін., Cancer Res. 56, 1996, сс. 3055-3061.

У контексті даного опису поняття "димерне антитіло, (діабоді)" відноситься до невеликих фрагментів антитіл, які містять два антигензв'язуючих центри, вказані фрагменти містять варіабельний домен важкого ланцюга (VH), зчеплений з варіабельний доменом легкого ланцюга (VL), у одному й тому ж поліпептидному ланцюзі (VH-VL). Завдяки застосуванню лінкера, який є занадто коротким, щоб могло відбуватися спарювання двох доменів на одного ланцюга, домени повинні злучатися з комплементарними доменами іншого ланцюга і в результаті відбувається утворення двох антигензв'язуючих центрів. Димерні антитіла описані більш детально,

наприклад, в EP 404097; WO 93/11161 і у Hollinger та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 6444-6448. Тримерне антитіло (тріабоді) утворюється в результаті формування тривалентного тримера, що складається з трьох scFv, що призводить до отримання трьох сайтів зв'язування, а тетрамерне антитіло (тетрабоді) являє собою чотирьохвалентний тетрамер, що складається з чотирьох scFv, що призводить до отримання чотирьох сайтів зв'язування.

У тому випадку, коли в даній галузі застосовують і / або вживають два або більшу кількість визначень конкретного поняття, то в контексті даного опису мається на увазі, що застосовується визначення зазначеного поняття включає всі такі значення, якщо спеціально не вказано інше. Конкретним прикладом є застосування поняття "ділянка, що визначає компліментарність" ("CDR") для опису антигензв'язуючих центрів, які не доторкаються (які позначають також як антигензв'язуючі ділянки), присутніх у поліпептидах варіабельної ділянки як важкого, так і легкого ланцюга. CDR Позначають також як "гіперваріабельні ділянки", і зазначене поняття в контексті даного опису застосовують взаємозаміно з поняттям "CDR" щодо ділянок варіабельної галузі, які утворюють антигензв'язуючі центри. Ця конкретна ділянка, описана у Kabat та ін., "Sequences Proteins of Immunological Interest", вид-во U.S. Dept. of Health and Human Services, (1983); і у Chothia та ін., J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917, зазначені публікації включені в даний опис в якості посилання, причому ці визначення відносяться до амінокислотних залишків перекриваються або піднабором амінокислотних залишків при їх порівнянні один з одним. Проте в контексті даного опису мається на увазі можливість застосування будь-якого визначення CDR антитіла або його варіантів. Відповідні амінокислотні залишки, з яких складаються CDR, як вони визначені у кожному з процитованих вище посилань, представлені в порівнянні нижче в таблиці 1. Точні номери залишків, які утворюють конкретний CDR, повинні варіюватися залежно від послідовності та розміру CDR. Фахівці в даній галузі легко можуть визначити, які залишки входять в конкретний CDR, на основі даних про амінокислотну послідовність варіабельної галузі антитіла.

Таблиця 1

Визначення CDR¹

	Кебот	Хотіа	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-32
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹ Нумерація всіх вхідних в CDR залишків у таблиці 1 дана відповідно до нумерації, запропонованої Кеботом та ін (див. нижче).

² Позначення "A3M" з великої буквою "b", використане в таблиці 1, належить до CDR, як вони визначені програмою для моделювання антитіл Oxford Molecular's "A3M".

Кебот із співавторами запропонували також систему нумерації (номенклатуру) послідовностей варіабельних ділянок, яку можна застосовувати для будь-якого антитіла. Звичайний фахівець у даній галузі може однозначно застосовувати цю систему "нумерації за Кеботом" до будь-якої послідовності варіабельної галузі, не маючи ніяких експериментальних даних, крім відомостей про саму послідовність. У контексті даного опису поняття "нумерація за Кеботом" відноситься до системи нумерації, описаної у Kabat та ін., "Sequence of Proteins of Immunological Interest", вид-во US Dept. of Health and Human Services, 1983. Якщо не вказано інше, то посилання на нумерацію положень конкретних амінокислотних залишків у антигензв'язуючому фрагменті подані у відповідності з системою нумерації за Кеботом. Нумерація в поліпептидних послідовностях, представлених у переліку послідовностей (тобто SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 216), не відповідає системі нумерації за Кеботом. Однак звичайний фахівець у даній галузі легко може перетворити нумерацію послідовностей, представлених у переліку послідовностей, в систему нумерації за Кеботом.

Під нуклеїновою кислотою або полінуклеотидом, які мають нуклеотидну послідовність, щонайменше, на 95 % "ідентичну" нуклеотидній послідовності, пропонованій в даному винаході, з якою проводять порівняння (референс-послідовність), мається на увазі, що нуклеотидна послідовність полінуклеотиду ідентична референс-послідовності за винятком того,

що полінуклеотидна послідовність може включати до п'яти точкових мутацій на кожні 100 нуклеотидів нуклеотидної референс-послідовності. Іншими словами, для отримання полінуклеотиду, що має нуклеотидну послідовність, ідентичну щонайменше на 95 % нуклеотидній референс-послідовності, можна вилучати шляхом делеції або замінювати іншими нуклеотидами аж до 5 % нуклеотидів референс-послідовності або аж до 5 % від загальної кількості нуклеотидів в референс-послідовності можна вбудовувати в референс-послідовність.

З практичної точки зору визначати чи є будь-яка конкретна молекула нуклеїнової кислоти або поліпептид щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною / ідентичним нуклеотидній послідовності або поліпептидній послідовності, пропонованій в даному винаході, можна за допомогою відомих широко використовуваних комп'ютерних програм. В якості одного з методів визначення найкращого загального збігу "запитуваної" (референс) послідовності (послідовність, пропонована в даному винаході) і аналізованої послідовності, який називають також методом глобального порівняльного аналізу послідовностей, можна використовувати комп'ютерну програму FASTDB, засновану на алгоритмі Brutlag та ін., Comp. App. Biosci. 6, 1990, ss. 237-245. При порівняльному аналізі послідовностей як референс-послідовність, так і аналізована послідовності обидві представляють собою послідовності ДНК. Послідовності РНК можна порівнювати шляхом заміни залишків U на T. Результатом зазначеного глобального порівняльного аналізу послідовностей є відсоток ідентичності. Кращими параметрами для розрахунку відсотка ідентичності, використовуваними в програмі FASTDB порівняльного аналізу послідовностей ДНК, є: матриця = унітарна, k запис у базі даних = 4, штраф за розбіжність = 1, штраф за приєднання = 30, довжина рандомізованої групи = 0, бал за зрізання = 1, штраф за пролом = 5, штраф за розмір проломи = 0,05, розмір вікна = 500 або він дорівнює довжині аналізованої послідовності в залежності від того, що коротше.

Якщо аналізована послідовність коротше референс-послідовності внаслідок наявності делецій на 5'-або 3'-кінці, але не внаслідок внутрішніх делецій, то результати можна скорегувати вручну. Це обумовлено тим, що програма FASTDB не враховує укорочення на 5'-і 3'-кінці аналізованої послідовності при розрахунку відсотка ідентичності. Для аналізованих послідовностей, укорочених на 5'-або 3'-кінцях по відношенню до референс-послідовності, відсоток ідентичності коригують шляхом обчислення кількості основ референс-послідовності, розташованих за 5'-і 3'-кінцями аналізованої послідовності, які не співпали/не вирівняні, у вигляді відсотка від загальної кількості основ в референс-послідовності. Чи збігаються / чи вирівняні нуклеотиди, визначається результатами порівняльного аналізу послідовностей за допомогою програми FASTDB. Потім цей відсоток віднімають з відсотка ідентичності, розрахованого за допомогою зазначеної вище програми FASTDB, з використанням зазначених заданих параметрів, в результаті чого отримують остаточну оцінку відсотка ідентичності. Цю скориговану оцінку використовують для цілей цього винаходу. Для цілей ручної корекції оцінки відсотка ідентичності при розрахунку враховують тільки основи, розташовані за 5'-і 3'-кінцями аналізованої послідовності, виявлені з допомогою порівняльного аналізу з використанням програми FASTDB, які не збігалися / не вирівняні щодо референс-послідовності.

Наприклад, для визначення відсотка ідентичності аналізовану послідовність довжиною 90 основ порівнюють з референс-послідовністю довжиною 100 основ. На 5'-кінці аналізованої послідовності є делеції, і тому порівняльний аналіз за допомогою FASTDB не дозволяє встановлювати збіги / вирівнювати 10 перших основ на 5'-кінці. 10 неспарених основ являють собою 10 % послідовності (кількість неспівпавших основ на 5'-і 3'-кінцях / загальна кількість основ в референс-послідовності), таким чином, 10 % віднімають з оцінки відсотка ідентичності, розрахованого за допомогою програми FASTDB. Якщо решта 90 основ ідеально збігаються, то остаточний відсоток ідентичності становить 90 %. В іншому прикладі аналізовану послідовність довжиною 90 основ порівнюють з референс-послідовністю довжиною 100 основ. У даному випадку делеції являють собою внутрішні делеції, так що на 5'-або 3'-кінці аналізованої послідовності немає основ, які не збігалися / не вирівняні із референс-послідовністю. У цьому випадку відсоток ідентичності, розрахований за допомогою програми FASTDB, не коригують вручну. Ще раз варто підкреслити, що вручну здійснюють корекцію тільки для основ, які не співпали / не вирівняні на 5'-і 3'-кінцях аналізованої послідовності. Для цілей цього винаходу не проводять ніяких інших корекцій вручну.

Під поліпептидом, амінокислотна послідовність якого, наприклад, по менше мірі на 95 % "ідентична" "запитуваній" амінокислотній послідовності (референс-послідовності), запропонованій в даному винаході, мається на увазі, що амінокислотна послідовність аналізованого поліпептиду ідентична референс-послідовності за винятком того, аналізована поліпептидна послідовність може включати аж до п'яти амінокислотних заміन на кожні 100 амінокислот у амінокислотній референс-послідовності. Іншими словами, для отримання

поліпептиду, що має амінокислотну послідовність, ідентичну щонайменше на 95 % амінокислотній референс-послідовності, можна вбудовувати, вилучати шляхом делеції або замінювати іншими амінокислотами аж до 5 % амінокислотних залишків аналізованої послідовності. Ці зміни референс-послідовності можуть мати місце в аміно-або карбоксикінцевих положеннях амінокислотної референс-послідовності або в інших сайтах між цими кінцевими положеннями, вони або розподілені індивідуально між залишками в референс-послідовності, або присутні у вигляді однієї або декількох груп суміжних змін до референс - послідовності.

З практичної точки зору визначати чи є будь-який конкретний поліпептид щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичним референс-поліпептиду, можна за допомогою відомих широко використовуваних комп'ютерних програм. В якості одного з методів визначення найкращого загального збігу референс-послідовності (послідовність, запропонована в даному винаході) і аналізованої послідовності, який називають також методом глобального порівняльного аналізу послідовностей, можна використовувати комп'ютерну програму FASTDB, засновану на алгоритмі, описаному у Brutlag та ін., Comp. App. Biosci. 6, 1990, ss. 237245. При порівняльному аналізі послідовностей як референс-послідовність, так і аналізована послідовність обидві являють собою або нуклеотидні послідовності, або амінокислотні послідовності. Результатом зазначеного глобального порівняльного аналізу послідовностей є відсоток ідентичності. Кращими параметрами для розрахунку відсотка ідентичності, використовуваними в програмі FASTDB для порівняльного аналізу амінокислотних послідовностей, є: матриця = PAM 0, k-запис у базі даних = 2, штраф за розбіжність = 1, штраф за приєднання = 20, довжина рандомізованої групи = 0, бал за "зрізання" = 1, розмір вікна = довжина послідовності, штраф за пролом = 5, штраф за розмір проломи = 0,05, розмір вікна = 500 або він дорівнює довжині аналізованої амінокислотної послідовності в залежності від того, що коротше.

Якщо аналізована послідовність коротше референс-послідовності внаслідок наявності делецій на N-або C-кінці, але не внаслідок внутрішніх делецій, то результати слід скорегувати вручну. Це обумовлено тим, що програма FASTDB не враховує укорочення на N-і C-кінці аналізованої послідовності при розрахунку глобального відсотка ідентичності. Для аналізованих послідовностей, укорочених на N-і C-кінцях по відношенню до референс-послідовності, відсоток ідентичності коригують шляхом обчислення кількості залишків референс-послідовності, розташованих за N-і C-кінцями аналізованої послідовності, які не співпали / не вирівняні щодо відповідного залишку аналізованої послідовності, у вигляді відсотка від загальної кількості основ референс-послідовності. Чи співпадає / чи вирівняний залишок, визначається результатами порівняльного аналізу послідовностей за допомогою програми FASTDB. Потім цей відсоток віднімають з відсотка ідентичності, розрахованого за допомогою зазначеної вище програми FASTDB, з використанням зазначених заданих параметрів, в результаті чого отримують остаточну оцінку відсотка ідентичності. Цю кінцеву оцінку відсотка ідентичності використовують для цілей цього винаходу. Для цілей ручної корекції оцінки відсотка ідентичності при розрахунку враховують тільки залишки, розташовані за N-і C-кінцями аналізованої послідовності, виявлені за допомогою порівняльного аналізу з використанням програми FASTDB, які не співпадали / не вирівняні щодо референс-послідовності. Таким чином, враховують тільки залишки референс-послідовності, що знаходяться в положеннях, які розташовані поза найбільш віддалених N-і C-кінцевих залишків аналізованої послідовності.

Наприклад, для визначення відсотка ідентичності аналізовану амінокислотну послідовність, яка містить 90 залишків, порівнюють з референс-послідовністю, що містить 100 залишків. На N-кінці аналізованої послідовності є делеції, і тому порівняльний аналіз за допомогою FASTDB не дозволяє встановлювати збіги при порівняльному аналізі для 10 перших залишків на N-кінці. 10 неспівпадаючих залишків являють собою 10 % послідовності (кількість неспівпадаючих залишків на N-і C-кінцях / загальна кількість залишків у референс-послідовності), таким чином, 10 % віднімають з оцінки відсотка ідентичності, розрахованого за допомогою програми FASTDB. Якщо решта 90 залишків ідеально збігаються, то остаточний відсоток ідентичності становить 90 %. В іншому прикладі аналізовану послідовність, що містить 90 залишків, порівнюють з референс-послідовністю, що містить 100 залишків. У даному випадку делеції являють собою внутрішні делеції, в результаті на N-або C-кінці аналізованої послідовності немає залишків, які не збігаються при порівняльному аналізі із референс-послідовністю. У цьому випадку відсоток ідентичності, розрахований за допомогою програми FASTDB, не коригують вручну. Ще раз варто підкреслити, що при порівняльному аналізі, здійснюваному за допомогою програми FASTDB, вручну здійснюють корекцію тільки для неспівпадаючих / не вирівняних залишків, які розташовані поза N-і C-кінців аналізованої послідовності. Для цілей цього винаходу не

проводять ніяких інших корекцій вручну.

Відсоток ідентичності полінуклеотидів і / або поліпептидів можна визначати також, використовуючи програми BLAST, які можна отримувати з національного центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information, NCBI), використовуючи

задані за замовчанням параметри, зазначені в програмах.

У контексті даного опису поняття "нуклеїнова кислота, яка" гібридується в строгих умовах »із нуклеотидною послідовністю, запропонованою у винаході, належить до полінуклеотиду, який гібридується в певних умовах, наприклад, при інкубації протягом ночі при 42 ° C в розчині, що містить 50 % формамід, 5×SSC (750мМ NaCl, 75мМ цитрат натрію), 50мМ фосфат натрію (рН 7,6), 5× розчин Денхардта, 10 % сульфату декстрану і 20 мкг / мл денатурованої, гідродинамічно фрагментованої ДНК із сперми лосося, з подальшим відмиванням фільтрів в 0,1 × SSC приблизно при 65°C.

У контексті даного опису поняття "поліпептид, у якого є GnTIII-активність" відноситься до поліпептидів, які мають здатність каталізувати додавання залишку N-ацетилглюкозаміну (GlcNAc) в β-1-4- зв'язку до β-пов'язаному маннозиду тріманнозильного ядра N-пов'язаних олігосахаридів. Поняття відноситься до злитих поліпептидів, які мають ферментативну активність, подібну, але не обов'язково ідентичну, активності β(1,4)-N-ацетилглюкозамінілтрансферази III, також відомої під назвоюβ-1,4-маннозил-глікопротеїн-4-бета-N-ацетилглюкозамінілтрансфераза (КФ 2.4.1.144) згідно з номенклатурою Комітету Міжнародного союзу з біохімії та молекулярної біології (Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)), при оцінці за допомогою конкретного біологічного аналізу як у випадку залежності від дози, так і без залежності від дози. У разі, коли існує залежність від дози, фермент не повинен бути обов'язково ідентичний GnTIII, а скоріше він повинен бути практично подібний їй відносно залежності даної активності від дози в порівнянні з GnTIII (тобто поліпептид-«кандидат» повинен мати більш високу активність або не більше ніж приблизно в 25 разів знижену активність, переважно не більше ніж приблизно в 10 разів знижену активність, і ще більш краще не більше ніж приблизно в 3 рази знижену активність в порівнянні з GnTIII.).

У контексті даного опису поняття "домен локалізації в комплексі Гольджі" відноситься до амінокислотної послідовності розташованого в комплексі Гольджі поліпептиду, який відповідальний за "заякорювання" поліпептиду в ділянці, що знаходиться всередині комплексу Гольджі. Як правило, домени локалізації містять амінокінцеві "хвости" ферменту.

У контексті даного опису поняття "ефекторна функція" відноситься до видів біологічної активності, властивим Fc-галузі (нативна послідовність Fc-галузі або амінокислотна послідовність варіанту Fc-ділянки) антитіла. Прикладами ефекторних функцій антитіла є (але, не обмежуючись ними) афінність зв'язування з Fc-рецептором, антитіло-обумовлена клітинозалежна цитотоксичність (ADCC), антитіло-обумовлений клітинозалежний фагоцитоз (ADCP), секреція цитокінів, опосередковане імунним комплексом поглинання антигену антигенпрезентуючими клітинами, понижуюча регуляція рецепторів клітинної поверхні і т.д.

У контексті даного опису поняття "інженерія" (створення), "створений за допомогою інженерії", "процес створення за допомогою інженерії", перш за все з приставкою "гліко", а також "інженерія глікозилювання (глікоінженерія)" (конструювання схеми глікозилювання), відносяться до будь-якої маніпуляції, якій піддають схему глікозилювання такого, який зустрічається в природних умовах або рекомбінантного поліпептиду або його фрагмента. Конструювання схеми глікозилювання включає метаболічне конструювання механізму глікозилювання клітини, в тому числі генетичні маніпуляції, що стосуються шляхів олігосахаридного синтезу, з метою отримання зміненого глікозилювання глікопротеїнів, які експресуються в клітинах. Крім того, конструювання схеми глікозилювання включає впливи мутацій і клітинного оточення на глікозилювання. В одному з варіантів здійснення винаходу інженерію глікозилювання здійснюють з метою зміни глікозилтрансферазної активності. У конкретному варіанті здійснення винаходу інженерія дозволяє змінювати активність глюкозамінілтрансферази та / або активність фукозилтрансферази.

У контексті даного опису поняття "клітина-хазяїн" відноситься до будь-якої клітинної системи, яку можна сконструювати для виробництва поліпептидів і антигензв'язуючих молекул, запропонованих в даному винаході. Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу клітину-хазяїна конструюють так, щоб з її допомогою одержувати антигензв'язуючу молекулу з модифікованими глікоформами. У кращому варіанті здійснення винаходу антигензв'язуюча молекула являє собою антитіло, фрагмент антитіла або злитий білок. У конкретних варіантах здійснення винаходу клітини-хазяїни піддавали додатковим маніпуляціям для підвищення рівнів експресії одного або декількох поліпептидів, які мають GnTIII-активність. Клітини-хазяїни

являють собою культивовані клітини, наприклад, культивовані клітини ссавців, такі як CHO-клітини, BHK-клітини, NS0-клітини, SP2/0-клітинки, клітини мієломи лінії YO, клітини мишачої мієломи лінії P3X63, PER-клітини, PER. С6-клітини або клітини гібридами, клітини дріжджів, клітини комах і рослинні клітини, а також клітини, що знаходяться в організмі трансгенної тварини, трансгенної рослини або культивованої рослинної або тваринної тканини.

У контексті даного опису поняття "Fc-обумовлена клітинозалежна цитотоксичність" відноситься до антитіло-обумовленої клітинозалежної цитотоксичності (ADCC) і клітинної цитотоксичності, опосередкованої розчинним злитим з Fc білком, який містить людську Fc-ділянку. Це являє собою механізм імунітету, приводить до лізису "мічених антитілом клітин" "людськими імунокомпетентними ефекторними клітинами".

Поняття «« людські імунокомпетентні ефекторні клітини »означає популяцію лейкоцитів, які несуть на поверхні Fc-рецептори, за допомогою яких вони зв'язуються з Fc-ділянкою антигензв'язуючих молекул або злитими з Fc білками і здійснюють ефекторні функції. Така популяція може включати (але, не обмежуючись ними) моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC) та / або природні клітини-кілери (NK).

У контексті даного опису поняття "мічені антитілом клітини" відноситься до клітин, з якими специфічно зв'язуються антигензв'язуючі молекули, що містять Fc-ділянку (наприклад, антитіла або їх фрагменти, які містять Fc-ділянку), або злиті з Fc білки. Антигензв'язуючі молекули або злиті з Fc білки зв'язуються з клітинами-мішенями за допомогою N-кінцевого стосовно Fc-галузі білкового фрагмента.

У контексті даного опису поняття "підвищена Fc-обумовлена клітинозалежна цитотоксичність" відноситься до будь-якого збільшення кількості "мічених антитілом клітин", підданих лізису в даний момент часу при даній концентрації антигензв'язуючої молекули або злитого з Fc білку, в середовищі, яке оточує клітини-мішені, із допомогою вказаного вище механізму Fc-опосередкованої клітинозалежної цитотоксичності та / або зниження концентрації антитіла або злитого з Fc білка в середовищі, яке оточує клітини-мішені, необхідного для лізису даної кількості "мічених антитілом клітин" в даний момент часу за допомогою механізму Fc-обумовленої клітинозалежної цитотоксичності. Підвищення рівня Fc-обумовленої клітинозалежної цитотоксичності оцінюють щодо клітинозалежної цитотоксичності, опосередкованої тією ж антигензв'язуючою молекулою або тим же злитим з Fc білком, яка / який продукується в такому ж типі клітин-хазяїнів, з використанням одних і тих же стандартних методів отримання, очищення, приготування композицій і зберігання (які добре відомі фахівцям у даній галузі), але яка / який не продукували / продукувався клітиною-хазяїном, сконструйованою так, щоб вона мала змінену схему глікозилування (наприклад, так, щоб у ній відбувалася експресія глікозилтрансферази GnTIII, або інших глікозилтрансфераз), за допомогою методів, представлених в даному описі.

Під "антигензв'язуючою молекулою, яка має підвищену антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність (ADCC)" мається на увазі антигензв'язуюча молекула, як вона визначена вище, яка має ADCC при визначенні за допомогою будь-якого прийнятного методу, відомого звичайним фахівцям в даній галузі. Один із прийнятих методів аналізу in vitro ADCC полягає в тому, що:

1) для аналізу застосовують клітини-мішені, для яких відомо, що вони експресують антиген-мішень, який розпізнається антигензв'язуючим центром антитіла;

2) для аналізу в якості ефекторних клітин використовують людські моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC), виділені з крові довільно вибраних здорових донорів;

3) аналіз здійснюють за допомогою наступного протоколу:

I) PBMC виділяють за допомогою стандартних методів центрифугування в градієнті щільності і суспендується 5×10^6 клітин / мл в RPMI-середовищі для культури клітин;

II) вирощують клітини-мішені за допомогою стандартних методів культивування тканин, збирають на експоненційній фазі росту, коли життєздатність складає більше 90 %, промивають у RPMI-середовищі для культури клітин, міченої 100 мкКи ^{51}Cr , двічі промивають за допомогою середовища для культури клітин і ресуспендують в середовищі для культури клітин з щільністю 10^5 клітин/мл;

III) переносять по 100 мкл зазначеної вище кінцевої суспензії клітин-мішеней в кожен лунку 96-лункового титраційного мікропланшету;

IV) готують серійні розведення з концентрацією антитіл від 4000 до 0,04 нг / мл в середовищі для культури клітин і додають 50 мкл утворених розчинів антитіл до клітин-мішеней в 96-лунковому титраційному мікропланшеті, оцінюючи в трьох повторностях різні концентрації антитіл, що охоплюють весь зазначений вище діапазон концентрацій;

V) для створення контролів з максимальним вивільненням (MR) використовують 3 додаткові

лунки в планшеті, які містять мічені клітини-мішені, з додаванням 50 мкл 2 об. % водного розчину неіоногенного детергента (Nonidet, фірма Sigma, Сент-Луїс), замість розчину антитіла (зазначеного в п. IV, вище);

5 VI) для створення контролів зі спонтанним вивільненням (SR), використовують 3 додаткові лунки в планшеті, які містять мічені клітини-мішені, з додаванням 50 мкл RPMI-середовища для культури клітин замість розчину антитіла (зазначеного в п. IV, вище);

VII) потім 96-лунковий титраційний мікропланшет центрифугують при 50 × g протягом 1 хв і інкубують протягом 1 год. при 4 °C;

10 VIII) додають в кожну лунку по 50 мкл суспензії PBMC (зазначеної в п. I, вище), отримуючи співвідношення ефекторні клітини: клітини-мішені 25:1, і планшети поміщають в інкубатор в атмосферу, що містить 5 % CO₂, і витримують при 37 °C протягом 4 год.;

IX) збирають безклітковий супернатант з кожної лунки і кількісно оцінюють виділену в процесі експерименту радіоактивність (ER) за допомогою лічильника гамма-променів;

15 X) розраховують відсоток специфічного лізису для кожної концентрації антитіла згідно з формулою (ER-MR) / (MR-SR) × 100, де ER означає середню радіоактивність, розраховану (див. п. IX, вище) для зазначеної концентрації антитіла, MR означає середню радіоактивність, розраховану (див. п. IX, вище) для MR-контролів (див. п. V, вище), а SR означає середню радіоактивність, розраховану (див. п. IX, вище) для SR-контролів (див. п. VI, вище);

20 4) "Підвищену ADCC" визначають або як збільшення максимального відсотка специфічного лізису, виявленого для зазначеного вище діапазону концентрацій антитіла, та / або як зниження концентрації антитіла, необхідної для досягнення половини від максимального відсотка специфічного лізису, виявленого для зазначеного вище діапазону концентрацій антитіла. Підвищення ADCC оцінюють щодо ADCC, опосередкованої таким же антитілом, продукувати в тому ж типі клітин-хазяїнів, з використанням одних і тих же стандартних методів отримання, очищення, приготування композицій і зберігання, які добре відомі фахівцям у даній галузі, але
25 яке не продукувалося клітиною - хазяїном, сконструйованою для надекспресії GnTIII.

Антигензв'язуючі молекули, поліпептиди і полінуклеотиди, мішенню яких є CEA

CEA протягом багатьох років використовувався як маркер раку в діагностичних цілях. Для нього характерна аномальна експресія (наприклад, надекспресія та / або аномальне
30 розподілення у різних структурах в клітині) в різних пухлинних тканинах у порівнянні з непухлинними тканинами, що складаються з клітин такого ж типу. Оскільки CEA, як правило, відщеплюється від поверхні пухлинної клітини, і найбільш відомі антитіла до CEA зв'язуються також і з розчинною CEA, то некон'юговані антитіла до CEA, як правило, не використовуються в терапевтичних цілях. Наприклад, антитіла до CEA, які в даний час вивчаються в пілотних
35 дослідженнях, застосовують у вигляді радіокон'югатів (Wong та ін., 2004; Liersch та ін., 2007). Терапевтична ефективність антитіл до CEA визначається декількома механізмами, включаючи антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність (ADCC) і комплементзалежну цитотоксичність (CDC). Підвищений рівень експресії CEA стимулює підвищену міжклітинну адгезію, що може призводити до метастазів ракових клітин (Marshall J., Semin Oncol., 30 (додаток 8), 2002, сс. 30-36). Таким чином, антигензв'язуючі молекули, мішенню яких є CEA,
40 можуть грати також роль в інгібуванні опосередкованої CEA клітинної адгезії і метастазах ракових клітин.

Одним з об'єктів винаходу є варіант антигензв'язуючої молекули (наприклад, антитіло або його фрагмент), який містить один або кілька (наприклад, один, два, три, чотири, п'ять або
45 шість) CDR мишачого антитіла PR1A3, в якому щонайменше в одному з CDR замінений щонайменше один амінокислотний залишок в порівнянні з відповідним CDR PR1A3, і де варіант антигензв'язуючої молекули має підвищену афінність до CEA, бажано пов'язану з мембраною CEA, в порівнянні з батьківською антигензв'язуючою молекулою PR1A3. У міжнародній заявці на патент WO 2011/023787 описані антигензв'язуючі молекули, мішенню яких є CEA, з підвищеною
50 афінністю до CEA порівняно з батьківською антигензв'язуючою молекулою PR1A3.

Іншим об'єктом винаходу є варіант антигензв'язуючої молекули, який містить один або кілька (наприклад, один, два, три, чотири, п'ять або шість) CDR мишачого антитіла PR1A3, в якому щонайменше в одному з CDR замінений щонайменше один амінокислотний залишок у порівнянні з відповідним CDR PR1A3, і де варіант антигензв'язуючої молекули має підвищену
55 стабільність в порівнянні з батьківською антигензв'язуючою молекулою PR1A3. В одному з варіантів здійснення батьківська антигензв'язуюча молекула PR1A3 являє собою гуманізовану антигензв'язуючу молекулу PR1A3. В одному з варіантів здійснення батьківська антигензв'язуюча молекула PR1A3 містить варіабельну ділянку важкого ланцюга CH7A (SEQ ID NO: 101). В одному з варіантів здійснення батьківська антигензв'язуюча молекула PR1A3
60 містить варіабельні галузі важкого ланцюга CH7A (SEQ ID NO: 101) і варіабельну ділянку

легкого ланцюга 2F1 (SEQ ID NO: 209). Зазначений (i) один або кілька CDR можуть являти собою укорочені CDR і повинні містити, як мінімум, що визначають специфічність залишки (SDR), як вони визначені в даному описі, для даного CDR. В одному з варіантів здійснення винаходу антигензв'язуюча молекула містить щонайменше один (наприклад, один, два, три, чотири, п'ять або шість) CDR, вибраних з SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 і 217-224 (фіг. 32 і фіг. 36), включаючи залишки CDR, які повинні зберігати здатність до специфічного зв'язування. В іншому варіанті здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули містить щонайменше один (наприклад, один, два, три, чотири, п'ять або шість) CDR, вибраних з SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 і 217-224, або варіант або його вкорочену форму, що містить щонайменше визначають специфічність залишки зазначеного CDR, і містити послідовність, виведену з гетерологічного поліпептиду. У конкретному варіанті здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули містить варіант CDR1 важкого ланцюга PR1A3, а, саме: у HCDR1 заміну глутамат валіну в положенні 31 за Кеботом. У конкретному варіанті здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули містить варіант CDR3 важкого ланцюга PR1A3, а, саме: у HCDR3 заміну аланіном тирозину 98 за Кеботом або заміну тирозином аспартату в положенні 99 по Кеботом. У конкретному варіанті здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули містить варіант CDR3 важкого ланцюга PR1A3, а, саме: у HCDR3 тирозин замінений на аланін в положенні 98 за Кеботом і аспартат замінений на тирозин в положенні 99 за Кеботом.

В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули містить один CDR3 важкого ланцюга, вибраний з SEQ ID NO: 217-224 (фіг. 36) і два CDR важкого ланцюга (наприклад, HCDR1 і HCDR2), які вибрані з SEQ ID NO: 1-3, 5-10 і 12-24, та / або три CDR легкого ланцюга (наприклад, LCDR1, LCDR2 і LCDR3), які вибрані з SEQ ID NO: 36-56, або їх варіанти або укорочені форми, що містять щонайменше залишки які визначають специфічність кожного з CDR. У більш конкретному варіанті здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули містить один CDR3 важкого ланцюга, вибраний з SEQ ID NO: 217-224, і два CDR (наприклад, HCDR1 і HCDR2), які вибрані з SEQ ID NO: 1-3, 5-10 і 12-24, і три CDR легкого ланцюга (наприклад, LCDR1, LCDR2 і LCDR3), які вибрані з SEQ ID NO: 36-56. В іншому варіанті здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули містить варіабельну (i) ділянку (i) легкого і / або важкого ланцюга антитіла, переважно варіабельну ділянку і важкого, і легкого ланцюга. У більш конкретному варіанті здійснення винаходу варіабельну ділянку важкого ланцюга і / або легкого ланцюга вибирають з варіабельних ділянок важкого і / або легкого ланцюга, які вибрані з SEQ ID NO: 99-108, SEQ ID NO: 188-216 і SEQ ID NO: 225-248 (фіг. 33 і фіг. 37A-B) або їх комбінації, де варіабельна ділянка важкого і легкого ланцюга не представляє собою комбінацію SEQ ID NO: 99 і SEQ ID NO: 103 або SEQ ID NO: 100 і SEQ ID NO: 104. У деяких варіантах здійснення винаходу важкий ланцюг містить каркасні ділянки CH1A1A (SEQ ID NO: 261) або CH1A1B (SEQ ID NO: 262) (фіг. 37B). В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, вибрану з SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 або SEQ ID NO: 247.

В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули являє собою химерне антитіло, більш конкретно гуманізоване антитіло. В іншому варіанті здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули містить Fc-ділянку. В іншому варіанті здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули являє собою варіант з дозрілою афінністю. В іншому варіанті здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули має підвищену ADCC в порівнянні з антитілом PR1A3. В одному з варіантів здійснення винаходу підвищена ADCC варіанту антигензв'язуючої молекули є наслідком підвищення афінності варіанту антигензв'язуючої молекули до пов'язаного з мембраною CEA, наприклад, в результаті дозрівання афінності або застосування інших методів підвищення афінності (див. Tang та ін., J. Immunol., 179, 2007, сс. 2815-2823, повний зміст публікації включено в даний опис як посилання). В іншому варіанті здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули містить Fc-ділянку, піддану глікоінженерії. Іншим об'єктом винаходу є також способи створення зазначених варіантів антигензв'язуючих молекул та їх застосування для лікування захворювання, насамперед пов'язаних з проліферацією клітин порушень, при яких відбувається експресія CEA, насамперед аномальна експресія CEA (наприклад, надекспресія та / або аномальне розподілення у різних структурах в клітині) порівняно зі здоровою тканиною, що складається з клітин цього ж типу. Зазначені порушення включають (але, не обмежуючись лише ними) колоректальний рак, NSCLC (недрібноклітинний рак легені), рак шлунка, рак підшлункової залози та рак молочної залози. Рівні експресії CEA можна визначати методами, відомими в даній галузі і представленими в даному описі (наприклад, за допомогою імуногістохімічного аналізу, імунофлуоресцентного аналізу, імуноферментного аналізу, ELISA, проточної

цитометрії, радіоімуноаналізу, Вестерн-блотингу, по зв'язуванню ліганду, за кіназною активністю і т.д.).

Наступним об'єктом винаходу є також виділений полінуклеотид, що містить послідовність, яка кодує поліпептид, який містить один або кілька (наприклад, один, два, три, чотири, п'ять або шість) гіперваріабельних ділянок мишачого антитіла PR1A3, або його варіанти або укорочені форми, які містять щонайменше такі, які визначають специфічність залишки зазначених гіперваріабельних ділянок. Як правило, зазначені виділені полінуклеотиди кодують один або кілька злитих поліпептидів, які утворюють антигензв'язуючу молекулу. В одному з варіантів здійснення винаходу полінуклеотид містить послідовність, що кодує один або кілька (наприклад, один, два, три, чотири, п'ять або шість) CDR, вибраних з SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 і 217-224, які містять залишки, що зберігають здатність до специфічного зв'язування. В одному з варіантів здійснення винаходу полінуклеотид містить послідовність, що кодує щонайменше три CDR важкого ланцюга (наприклад, HCDR1, HCDR2 і HCDR3) та / або три CDR легкого ланцюга (наприклад, LCDR1, LCDR2 і LCDR3), які вибрані з SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 і 217-224, або їх варіанти або укорочені форми, містять щонайменше такі, які визначають специфічність залишки (SDR) кожного з зазначених трьох гіперваріабельних ділянок. У більш конкретному варіанті здійснення винаходу полінуклеотид кодує поліпептид, що містить один CDR3 важкого ланцюга, вибраний з SEQ ID NO: 217-224, і два CDR важкого ланцюга (наприклад, HCDR1 і HCDR2), які вибрані з SEQ ID NO: 1-3, 5-10 і 12-24, і три CDR легкого ланцюга (наприклад, LCDR1, LCDR2 і LCDR3), які вибрані з SEQ ID NO: 36-56. В іншому варіанті здійснення винаходу полінуклеотид кодує поліпептид, що містить варіабельну (i) ділянку (i) легкого і / або важкого ланцюга антитіла. Полінуклеотиди, що кодують поліпептиди варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюга, можна експресувати в одному або декількох експресійних векторах. У більш конкретному варіанті здійснення винаходу полінуклеотид, який кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга і / або легкого ланцюга, вибрану з SEQ ID NO: 99-108, SEQ ID NO: 188-216 і SEQ ID NO: 225-248, вибирають з групи полінуклеотидів, які мають SEQ ID NO: 159-187 і SEQ ID NO: 249-256, або їх комбінації, де варіабельні галузі важкого і легкого ланцюга не кодуються комбінацією SEQ ID NO:11 і SEQ ID NO:115 або SEQ ID NO: 112 і SEQ ID NO: 116. В одному з варіантів здійснення винаходу поліпептиди варіабельної галузі важкого і легкого ланцюга, які кодуються полінуклеотидами, об'єднують з отриманням химерного антитіла, більш конкретно гуманізованого антитіла. У конкретному варіанті здійснення винаходу, в якому полінуклеотид містить послідовність, яка кодує CDR1 важкого ланцюга PR1A3 або його варіант, зазначений полінуклеотид кодує заміну валіну на глутамат в положенні 31 за Кеботом. У конкретному варіанті здійснення винаходу, в якому полінуклеотид містить послідовність, яка кодує CDR3 важкого ланцюга PR1A3 або його варіант, зазначений полінуклеотид кодує заміну тирозину на аланін в положенні 98 за Кеботом або заміну аспартату на тирозин в положенні 99 за Кеботом. У конкретному варіанті здійснення винаходу, в якому полінуклеотид містить послідовність, яка кодує CDR3 важкого ланцюга PR1A3 або його варіант, зазначений полінуклеотид кодує заміну тирозину на аланін в положенні 98 за Кеботом і заміну аспартату на тирозин в положенні 99 за Кеботом. В одному з варіантів здійснення винаходу полінуклеотид кодує заміну тирозину на аланін в положенні 98 за Кеботом або заміну аспартату на тирозин в положенні 99 за Кеботом в каркасній ділянці CH1A1A (SEQ ID NO: 261) або CH1A1B (SEQ ID NO: 262). В одному з варіантів здійснення винаходу полінуклеотид містить послідовність, яка кодує важкий ланцюг, яка має SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:239, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 або SEQ ID NO: 247. В іншому варіанті здійснення винаходу полінуклеотид містить послідовність, що кодує Fc-ділянку. Винахід належить також до поліпептидів, які кодуються зазначеними полінуклеотидами.

Одним з об'єктів даного винаходу є антигензв'язуючі молекули або варіанти антигензв'язуючих молекул (наприклад, антитіла або їх фрагменти) і поліпептиди, які мають таку ж специфічність зв'язування, що і у мишачого антитіла PR1A3 (наприклад, зв'язуються з тим же епітопом пов'язаного з мембраною CEA), і з порівнянною або поліпшеною біологічною активністю (наприклад, поліпшеною афінністю до пов'язаного з мембраною CEA, підвищену стабільність та / або підвищену ADCC). В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули пов'язується з тим же епітопом, що батьківська антигензв'язуюча молекула. В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули конкурує за зв'язування зі зв'язаним з мембраною CEA з батьківською антигензв'язуючою молекулою. В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули зв'язується зі зв'язаним з мембраною людським CEA і не зв'язується з розчинним людським CEA. Одним з об'єктів даного винаходу є антигензв'язуючі молекули або варіанти антигензв'язуючих молекул і поліпептиди, які мають підвищену стабільність в порівнянні з

мишачим антитілом PR1A3 або його гуманізованим варіантом. Одним з варіантів даного винаходу є антигензв'язуючі молекули або варіанти антигензв'язуючих молекул (наприклад, антитіла або їх фрагменти) і поліпептиди, які зв'язуються зі зв'язаним з мембраною CEA й мають підвищену стабільність порівняно з гуманізованим антитілом PR1A3, яке містить
 5 варіабельну ділянку важкого ланцюга CH7A (SEQ ID NO: 101). Одним з варіантів даного винаходу є антигензв'язуючі молекули або варіанти антигензв'язуючих молекул (наприклад, які антитіла або їх фрагменти) і поліпептиди, які зв'язуються зі зв'язаним з мембраною CEA й мають підвищену стабільність порівняно з гуманізованим антитілом PR1A3, яке містить
 10 варіабельну ділянку важкого ланцюга CH7A (SEQ ID NO: 101) і варіабельну ділянку легкого ланцюга 2F1 (SEQ ID NO: 209).

В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули або поліпептид містить щонайменше один (наприклад, один, два, три, чотири, п'ять або шість) CDR, вибраних з SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 і 217-224 (фіг. 32 і фіг. 36). В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули або поліпептид містить: (а)
 15 послідовність CDR1 важкого ланцюга, вибрану із групи, яка складається із: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 і SEQ ID NO: 12; (б) послідовність CDR2 важкого ланцюга, вибрану з групи, що складається з: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 і
 20 SEQ ID NO: 24; і (в) послідовність CDR3 важкого ланцюга, вибрану з групи, що складається з: SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 223 і SEQ ID NO: 224. В іншому варіанті здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули або поліпептид містить: (а) послідовність CDR1 легкого ланцюга, вибрану з групи, що складається з: SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 і SEQ ID NO: 45; (б) послідовність CDR2 легкого ланцюга, вибрану з групи, що складається з: SEQ ID NO: 46 і
 25 SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 і SEQ ID NO: 55; і (в) CDR3 легкого ланцюга, що має SEQ ID NO: 56. У деяких варіантах здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули або
 30 поліпептид, що містить CDR, містить також каркасні залишки CH1A1A (SEQ ID NO: 261) або CH1A1B (SEQ ID NO: 262).

Одним з об'єктів винаходу є варіант антигензв'язуючої молекули або поліпептид, який зв'язується зі зв'язаним з мембраною людським CEA, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга і / або варіабельну ділянку легкого ланцюга. В одному з варіантів здійснення винаходу
 35 варіабельну ділянку важкого ланцюга і / або варіабельну ділянку легкого ланцюга вибирають з варіабельної галузі важкого і / або легкого ланцюга, вибраній з SEQ ID NO: 99-108, SEQ ID NO: 188-216 і SEQ ID NO: 225-248 (фіг. 33 і фіг. 37A-37B). В одному з варіантів здійснення винаходу варіабельна ділянка важкого ланцюга містить поліпептид, що має будь-яку одну з послідовностей SEQ ID NO: 225-248. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу
 40 варіабельна ділянку важкого ланцюга містить поліпептид, послідовність якого щонайменше приблизно на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична будь-якій одній з послідовностей SEQ ID NO: 225-248.

В одному з варіантів здійснення винаходу варіабельна ділянка важкого ланцюга містить поліпептид, що має послідовність SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 і SEQ ID NO: 247. В іншому варіанті здійснення винаходу варіабельна ділянка важкого ланцюга містить поліпептид, послідовність якого щонайменше приблизно на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична
 45 SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 і SEQ ID NO: 247. В одному з варіантів здійснення винаходу варіабельна ділянка легкого ланцюга містить поліпептид, що має послідовність SEQ ID NO: 209. В іншому варіанті здійснення винаходу варіабельна ділянка легкого ланцюга містить поліпептид, послідовність якого щонайменше приблизно на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична SEQ ID NO: 209.

В одному з варіантів здійснення винаходу антигензв'язуюча молекула, варіант антигензв'язуючої молекули або поліпептид, яка / який зв'язується зі зв'язаним з мембраною CEA, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга і варіабельну ділянку легкого ланцюга. У конкретному варіанті здійснення винаходу варіабельна ділянка важкого ланцюга містить поліпептид, що має представлену нижче SEQ ID NO: 4:

QVQLVQSGSELKPGASVKVSCKASGYTFTEX¹X²MX³WVRQAPGQGLEWMGX⁴INTKX⁵GEAX⁶
 60 YX⁷EEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDX⁸X⁹X¹⁰YX¹¹X¹²X¹³X¹⁴DYWGQGTTVTV

SS,

в якій X^1 означає Y або F; X^2 означає S або G; X^3 означає N або S; X^4 означає W або Y; X^5 означає N, T або S; X^6 означає T або N; X^7 означає V або I; X^8 означає F або A; X^9 означає Y, A, V, F або S; X^{10} означає D, H, W, E або Y; X^{11} означає V, L або F; X^{12} означає E, K або Q; X^{13} означає A або T; і X^{14} означає M або L.

У конкретному варіанті здійснення винаходу варіабельна ділянка легкого ланцюга містить поліпептид, що має представлену нижче SEQ ID NO: 11:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASX15X16X17X18X19X20VAWYQQKPGKAPKX21LIYX22ASX23X24X25X26GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGGTKLEIK,

в якій X^{15} означає Q, A, K або H; X^{16} означає N, A, Y, I, K, T або F; X^{17} означає V, A, G або M; X^{18} означає G, S, T або L; X^{19} означає T, N, P або A; X^{20} означає N або Y; X^{21} означає P або L; X^{22} означає S, L або W; X^{23} означає Y, N або H; X^{24} означає R, L, P або H; X^{25} означає Y, S, Q, K, E, F або P; і X^{26} означає S, G, I або R.

Іншим об'єктом винаходу є також виділені полінуклеотиди, що кодують антигензв'язуючі молекули, варіанти антигензв'язуючих молекул або поліпептиди, які зв'язуються зі зв'язаним з мембраною CEA. В одному з варіантів здійснення винаходу полінуклеотид містить послідовність, яка кодує щонайменше три CDR важкого ланцюга (наприклад, HCDR1, HCDR2 і HCDR3) та / або три CDR легкого ланцюга (наприклад, LCDR1, LCDR2 і LCDR3), вибрані з SEQ ID NO: 1-3, 5-10, 12-56 і 217-224, або їх варіанти або укорочені форми, що містять щонайменше такі, які визначають специфічність залишки (SDR) кожного із зазначених трьох гіперваріабельних ділянок. У більш конкретному варіанті здійснення винаходу полінуклеотид кодує поліпептид, що містить один CDR3 важкого ланцюга, вибраний з SEQ ID NO: 217-224, і два CDR важкого ланцюга (наприклад, HCDR1 і HCDR2), які вибрані з SEQ ID NO: 1-3, 5-10 і 12-24, і три CDR легкого ланцюга (наприклад, LCDR1, LCDR2 і LCDR3), які вибрані з SEQ ID NO: 36-56. В іншому варіанті здійснення винаходу полінуклеотид кодує поліпептид, що містить варіабельну (i) ділянку (i) легкого і / або важкого ланцюга антитіла. Полінуклеотиди, що кодують поліпептиди варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюга, можна експресувати в одному або декількох експресійних векторах. У більш конкретному варіанті здійснення полінуклеотид, який кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга і / або легкого ланцюга, яка вибрана з SEQ ID NO: 99-108, SEQ ID NO: 188-216 і SEQ ID NO: 225-248, вибирають з групи, полінуклеотидів, які мають послідовності SEQ ID NO: 159-187 і SEQ ID NO: 249-256, чи комбінацію, при цьому варіабельні галузі важкого і легкого ланцюгів не кодуються комбінацією SEQ ID NO: 11 і SEQ ID NO: 115 або SEQ ID NO: 112 і SEQ ID NO: 116. В одному з варіантів здійснення винаходу поліпептиди варіабельної галузі важкого і легкого ланцюга, які кодуються полінуклеотидами, об'єднують з отриманням химерного антитіла, більш конкретно гуманізованого антитіла. В одному з варіантів здійснення винаходу антигензв'язуюча молекула, варіант антигензв'язуючої молекули або поліпептид, що зв'язується зі зв'язаним з мембраною CEA, містить Fc-ділянку. У більш конкретному варіанті здійснення винаходу антигензв'язуючу молекулу, варіант антигензв'язуючої молекули або поліпептид створюють за допомогою глікоінженерії так, щоб вони мали змінену схему глікозилування в Fc-ділянці. У конкретному варіанті здійснення винаходу афінність до пов'язаного з мембраною CEA варіанту антигензв'язуючої молекули або поліпептиду підвищується в порівнянні з батьківським антитілом PR1A3. В іншому варіанті здійснення винаходу стабільність варіанту антигензв'язуючої молекули або поліпептиду підвищується в порівнянні з батьківським антитілом PR1A3. В іншому варіанті здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули або поліпептид має підвищену ADCC-активність. В одному з варіантів здійснення винаходу підвищена ADCC варіанту антигензв'язуючої молекули або поліпептиду є наслідком підвищення афінності поліпептиду до пов'язаного з мембраною CEA, наприклад, досягнутої за допомогою дозрівання афінності або за допомогою інших методів підвищення афінності. Іншим об'єктом винаходу є застосування антигензв'язуючої молекули, варіанти антигензв'язуючої молекули або поліпептиду для лікування захворювання, насамперед пов'язаних з проліферацією клітин порушень, при яких відбувається експресія CEA, насамперед аномальна експресія CEA (наприклад, надекспресія та / або аномальне розподілення у різних структурах в клітині) порівняно зі здоровою тканиною, що складається з клітин цього ж типу. Зазначені порушення включають (але, не обмежуючись лише ними) колоректальний рак, NSCLC (недрібноклітинний рак легені), рак шлунка, рак підшлункової залози та рак молочної залози. Рівні експресії CEA можна визначати методами, відомими в даній галузі і представленими в даному описі (наприклад, за допомогою імуногістохімічного аналізу, імунофлуоресцентного аналізу, імуноферментного аналізу, ELISA, проточної цитометрії, радіоімуноаналізу, Вестерн-блотингу, по зв'язуванню ліганду, за кіназною активністю і т.д.).

Конкретним варіантом здійснення винаходу є гуманізована антигензв'язуюча молекула або її ділянка або фрагмент, які мають специфічність відносно пов'язаного з мембраною CEA, яка містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить одну будь-яку з SEQ ID NO: 225-248. Іншим варіантом здійснення винаходу є гуманізована антигензв'язуюча молекула або її ділянка або фрагмент, які мають специфічність відносно пов'язаного з мембраною CEA, яка / який містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить одну будь-яку з SEQ ID NO: 105, 108 або 207-216. У конкретному варіанті здійснення винаходу гуманізована антигензв'язуюча молекула або її ділянка або фрагмент, яка / який зв'язується зі зв'язаним з мембраною CEA, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить одну будь-яку з SEQ ID NO: 225-248, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить одну будь-яку з SEQ ID NO: 105, 108 або 207-216. Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу гуманізована антигензв'язуюча молекула містить також константну ділянку людського важкого ланцюга і / або константну ділянку людського легкого ланцюга. Зазначені константні ділянки представлені в даному описі і відомі в даній ділянці. У більш конкретному варіанті здійснення винаходу гуманізована антигензв'язуюча молекула містить Fc-ділянку, більш конкретно Fc-ділянку, створену з використанням глікоінженерії.

Методи гуманізації нелюдських антитіл відомі в даній ділянці. Наприклад, гуманізовані АЗМ, запропоновані в даному винаході, можна отримувати за допомогою методів, описаних в US 5225539 на ім'я Winter, US 6180370 на ім'я Queen та ін або US 6632927 на ім'я Adair та ін., повний зміст яких включено в даний опис в якості посилання. Переважно гуманізоване антитіло несе один або кілька інтродукованих в нього амінокислотних залишків, отриманих з джерела крім людини. Ці нелюдські амінокислотні залишки часто називають "імпортними" залишками, які, як правило, отримують з "імпортного" варіабельного домена. Гуманізацію, як правило, можна здійснювати за допомогою методу, описаного у Winter із співробітниками (Jones та ін., Nature, 321, 1986, сс. 522-525; Riechmann та ін., Nature, 332, 1988, сс. 323-327; Verhoeven та ін., Science, 239, 1988, сс. 1534-1536), шляхом заміни на послідовності гіперваріабельних ділянок відповідних послідовностей людського антитіла. Таким чином, такі "гуманізовані" антитіла є химерними антитілами, (US 4816567), в яких ділянка, істотно менша в порівнянні з інтактною людською варіабельною ділянкою, замінена на відповідну послідовність з антитіл видів крім людини. На практиці гуманізовані антитіла представляють собою типові людські антитіла, в яких деякі залишки гіперваріабельної ділянки і ймовірно деякі залишки FR-ділянки замінені залишками з аналогічних сайтів нелюдських антитіл (наприклад, антитіл гризунів). Пропоновані у винаході гуманізовані антитіла до CEA необов'язково можуть містити константні ділянки людського імуноглобуліну.

Вибір людських варіабельних ділянок як легкого, так і важкого ланцюга, що застосовуються для створення гуманізованих антитіл, дуже важливий для зниження антигенності. Згідно так званого методу "найкращого підбору" послідовності варіабельної ділянки антитіла-донора (наприклад, гризуна) піддають скринінгу з використанням повної бібліотеки відомих послідовностей людських варіабельних ділянок. Потім людську послідовність, найбільш схожу з послідовністю донора (наприклад, гризуна), відбирають в якості людської каркасної ділянки (FR) для створення гуманізованого антитіла (Sims та ін., J. Immunol., 151, 1993, с. 2296; Chothia та ін., J. Mol. Biol., 196, 1987, с. 901). Інший метод вибору послідовності людської каркасної ділянки полягає в порівнянні послідовності кожної індивідуальної підобласті повної каркасної ділянки донора (наприклад, гризуна) (тобто, FR1, FR2, FR3 і FR4) або певної комбінації індивідуальних підобластей (наприклад, FR1 і FR2) і бібліотеки відомих послідовностей людських варіабельних ділянок, що відповідають зазначеній каркасній підобласті (наприклад, з використанням нумерації за Кеботом), і виборі людської послідовності для кожної підобласті або комбінації, яка є найбільш схожою з послідовністю гризунів (Leung, заявка на патент США № 2003/0040606A1, опублікована 27 лютого 2003). Ще один метод заснований на застосуванні конкретної каркасної ділянки, виведеної з консенсусної послідовності конкретної підгрупи легких і важких ланцюгів всіх людських антитіл (Carter та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1992, с. 4285; Presta та ін., J. Immunol., 151, 1993, с. 2623). В одному з варіантів здійснення винаходу людські каркасні ділянки вибирають з колекції послідовностей людської зародкової лінії. Зазначені колекції послідовностей людської зародкової лінії можна знайти в таких базах даних, як IMGT або VBase. Каркасні ділянки можна вибирати індивідуально (наприклад, FR1-3, відібрані в якості акцептора для варіабельних ділянок важкого і / або легкого ланцюга гуманізованих АЗМ, мішенню яких є CEA, можуть кодуватися різними генами зародкової лінії або частиною одного і того ж гена зародкової лінії). У більш конкретному варіанті здійснення винаходу FR1-3 важкого ланцюга кодуються послідовністю гену імуноглобуліну людської зародкової лінії IGHV7_4_1 * 02 (реєстраційний № X62110, SEQ ID NO: 114). В іншому конкретному варіанті здійснення

винаходу FR1-3 легкого ланцюга кодуються генною послідовністю людської зародкової лінії IMGT_hVK_1_39 (реєстраційний № X59315, SEQ ID NO: 118). В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу FR4 важкого ланцюга кодується генною послідовністю людської зародкової лінії JH6 (див. GenBank, реєстраційний № M63030). В іншому конкретному варіанті здійснення

5 винаходу FR4 легкого ланцюга кодується генною послідовністю людської зародкової лінії JK2 (див. GenBank, реєстраційний № X61584).

В цілому, є бажаним, щоб антигензв'язуючі молекули, такі як антитіла та їх фрагменти, будучи гуманізовані, зберігали свою високу афінність до антигену та інші цінні біологічні властивості. Таким чином, відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу гуманізовані

10 антитіла одержують за допомогою аналізу батьківських послідовностей і різних концептуальних (схематичних) гуманізованих продуктів з використанням тривимірних моделей батьківських і гуманізованих послідовностей. Тривимірні моделі імуноглобулінів доступні і добре відомі фахівцям в даній галузі. Доступні комп'ютерні програми, які ілюструють і відображають можливі тривимірні конформаційні структури вибраних в якості перспективних ("кандидатів")

15 послідовностей імуноглобулінів. Оцінка цих зображень дозволяє проаналізувати ймовірну роль залишків у прояві функції послідовності імуноглобуліну-«кандидата», тобто аналіз залишків, які впливають на здатність імуноглобуліну-«кандидата» зв'язуватися з його антигеном. Таким методом можна відбирати залишки FR-ділянки і об'єднувати отримані з реципієнта і "імпортовані" послідовності так, щоб отримувати необхідні характеристики антитіла, такі як підвищена афінність до антигену (ам)-мішені (ям). В цілому, залишки гіперваріабельних ділянок безпосередньо і найбільшою мірою впливають на зв'язування антигену.

20

Одним з об'єктів винаходу є гуманізовані із дозрілою афінністю антигензв'язуючі молекули, мішенню яких є CEA, або їх варіанти, які мають необхідні властивості і характеристики, які включають (але, не обмежуючись лише ними): виражену афінність зв'язування з антигеном

25 CEA, насамперед зі зв'язаним із мембраною CEA, і при цьому практично повну відсутність перехресної реактивності до розчинного CEA; здатність індукувати клітинний лізис експресуючих CEA клітин *in vitro* і *ex vivo*, бажано в залежності від дози; здатність інгібувати опосередковану CEA клітинну адгезію *in vitro*; здатність інгібувати ріст пухлинної тканини і / або індукувати регрес пухлинної тканини (наприклад, як це продемонстровано на моделях пухлин (наприклад, створених на мишах з використанням ксенотрансплантатів)).

30

Як зазначено вище, згідно з деякими варіантами здійснення винаходу варіанти антигензв'язуючих молекул, пропонувані у винаході, мають підвищену афінність зв'язування, наприклад, в результаті дозрівання афінності батьківського антитіла, яке містить один або кілька CDR антитіла PR1A3. Афінність антигензв'язуючих молекул і варіантів антигензв'язуючих

35 молекул, запропонованих у винаході, можна визначати методами, відомими в даній галузі і представленими в даному описі. У конкретному варіанті здійснення винаходу зв'язування гуманізованих антигензв'язуючих молекул, мішенню яких є CEA, або їх варіантів з людським CEA, переважно зі зв'язаним з мембраною CEA, характеризується величиною константи афінності (K_D) одновалентних антигену і антитіла (константа афінності одновалентної взаємодії), що становить не більш ніж від приблизно 1 мкм до приблизно 0,001 нМ, більш конкретно не більше ніж від приблизно 800 до приблизно 1 нм і ще більш краще не більше ніж від приблизно 550 до приблизно 10 нм. У більш конкретному варіанті здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули являє собою антитіло із дозрілою афінністю або його фрагмент, зв'язування якого з пов'язаним з мембраною CEA характеризується величиною

45 константної афінності одновалентної взаємодії (K_D), що становить не більш ніж від приблизно 100 до приблизно 10 нм. В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули являє собою антитіло із дозрілою афінністю або його фрагмент, зв'язування якого з пов'язаним з мембраною CEA характеризується величиною константи афінності одновалентної взаємодії (K_D), що становить не більш ніж від приблизно 10 до приблизно 0,1 нМ. В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули являє собою антитіло із дозрілою афінністю або його фрагмент, зв'язування якого з пов'язаним з мембраною CEA характеризується величиною константи афінності одновалентної взаємодії (K_D), що становить 100, 10, 1, 0,1 нМ або менше. У деяких варіантах здійснення винаходу антигензв'язуюча молекула являє собою антитіло або його фрагмент з "дозрілою" стабільністю (створене / створений таким чином, щоб воно / він мало / мав підвищену стабільність), яке / який зберігає

55 підвищену афінність зв'язування, притаманну його батькові із дозрілою афінністю. В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули зв'язується зі зв'язаним з мембраною CEA з більш високою афінністю, ніж він зв'язується з відщепленим (від мембрани) CEA. В одному з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули зв'язується зі зв'язаним з мембраною CEA в 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 20 раз або більше високу афінність, ніж він

60

зв'язується з відщепленим CEA.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючої молекули, пропонується у винаході, як правило, пов'язується з тим же епітопом, який розпізнає мишаче антитіло PR1A3, або він має здатність конкурувати з антитілом PR1A за зв'язування зі зв'язаним з мембраною CEA. Для скринінгу антитіл, які зв'язуються з епітопом людської CEA, який зв'язується з антитілом, що становить інтерес (наприклад, які блокують зв'язування антитіла PR1A3 з людським CEA), можна застосовувати загальноприйнятий аналіз перехресної блокади, описаний в: *Antibodies, A Laboratory Manual*, під ред. Harlow і Lane, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. В альтернативному варіанті можна здійснювати епітопне картування, описане у Champe та ін., *J. Biol. Chem.* 270, 1995, сс. 1388-1394, для вирішення питання про те, чи зв'язується антитіло із епітопом що становить інтерес.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу створюють варіанти антигензв'язуючих молекул, специфічні для людського CEA, з батьківської антигензв'язуючої молекули, мішенню якої є CEA, що містить щонайменше один CDR моноклонального антитіла PR1A3, при цьому, батьківське антитіло до CEA пов'язується з тим же епітопом, що і антитіло PR1A3, і має здатність конкурувати з PR1A3 за зв'язування з антигеном. В одному з варіантів здійснення винаходу батьківська антигензв'язуюча молекула містить щонайменше один, два або, як правило, три CDR важкого ланцюга антитіла PR1A3; в іншому варіанті здійснення винаходу батьківська антигензв'язуюча молекула містить щонайменше один, два або, як правило, три CDR легкого ланцюга антитіла PR1A3; в наступному варіанті здійснення винаходу батьківська антигензв'язуюча молекула містить три CDR важкого ланцюга і три CDR легкого ланцюга антитіла PR1A3. Переважно, коли варіант антигензв'язуючої молекули містить HCDR1 PR1A3, то HCDR1 має заміну валіну на глутамат в положенні 31 за Кеботом. Варіант A3M, як правило, має більш високу афінність до CEA, ніж батьківське антитіло. В одному з варіантів здійснення винаходу варіант ACM має підвищену стабільність в порівнянні з батьківським антитілом.

В одному з варіантів здійснення винаходу варіант ACM містить Fc-ділянку. В одному з варіантів здійснення винаходу варіант A3M створений за допомогою глікоінженерії. В одному з варіантів здійснення винаходу варіант A3M має підвищену ADCC-активність в порівнянні з батьківською A3M. У конкретному варіанті здійснення винаходу підвищена ADCC є результатом підвищеної афінності, що досягається, наприклад, в результаті дозрівання афінності батьківською ACM, яка здійснюється при створенні варіанту ACM. Згідно більш конкретного варіанту здійснення винаходу підвищення ADCC складає щонайменше від приблизно 40 % до приблизно 100 % в порівнянні з ADCC батьківською антигензв'язуючою молекулою. Відповідно до іншого конкретного варіанту здійснення винаходу підвищення активності ADCC у варіанту A3M становить від щонайменше приблизно 10 % до приблизно 100 % при оцінці цитотоксичності за допомогою аналізу *in vitro*. Згідно більш конкретного варіанту здійснення винаходу варіант ACM індукуює ADCC від щонайменше приблизно в 10 разів до приблизно в 1000 разів більш ефективно при застосуванні в конкретній концентрації в порівнянні з мишачим антитілом PR1A3. Відповідно до іншого конкретного варіанту здійснення винаходу підвищена ADCC-активність є результатом створення Fc-ділянки за допомогою глікоінженерії. Відповідно до іншого конкретного варіанту здійснення винаходу підвищена ADCC-активність є результатом комбінації процесів дозрівання афінності і глікоінженерії.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу варіант антигензв'язуючих молекул, запропонованих у винаході, містить одну або кілька амінокислотних замін щонайменше в одному CDR. Кількість амінокислотних замін може становити від однієї до десяти (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10), переважно від двох до п'яти (наприклад, 2, 3, 4 або 5). Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу щонайменше один CDR важкого ланцюга містить одну або кілька амінокислотну (их) заміну (н). В іншому варіанті здійснення винаходу щонайменше один CDR легкого ланцюга містить одну або кілька амінокислотну (их) заміну (н). В іншому варіанті здійснення винаходу щонайменше один CDR важкого ланцюга містить одну або кілька амінокислотну (их) заміну (н) і щонайменше один CDR легкого ланцюга містить одну або кілька амінокислотну (их) заміну (н). Краще, коли антигензв'язуюча молекула стримає HCDR1 PR1A3, то HCDR1 містить заміну валіну на глутамат в положенні 31 за Кеботом.

Для досягнення істотних змін біологічних властивостей антигензв'язуючих молекул здійснювали відбір замін, які значною мірою відрізняються за своїм впливом на підтримання (а) структури поліпептидного каркаса в ділянки заміни, наприклад, β -складчастої або спіральної конформації, (б) заряду або гідрофобності молекули в ділянки -мішені або (в) загального обсягу бічного ланцюга. Варіанти антигензв'язуючих молекул, що містять амінокислотні заміни, можуть мати поліпшену біологічну активність, наприклад, поліпшену афінність зв'язування антигену і

підвищену ADCC, в порівнянні з батьківською антигензв'язуючою молекулою. Амінокислотні заміни можна інтродуціювати за допомогою різних методик, відомих в даній галузі, включаючи (але, не обмежуючись лише ними) сайтнаправлений мутагенез та / або дозрівання афінності батьківської антигензв'язуючої молекули, наприклад, за допомогою фагового дисплея.

Для ідентифікації перспективних з позицій модифікації сайтів ("сайт-кандидатів"), наприклад, залишків у гіперваріабельній ділянці, можна здійснювати мутагенез, такий як сканування аланіном, для виявлення залишків, які вносять значний внесок у зв'язування антигену. В альтернативному або додатковому варіанті може виявитися цінним здійснювати аналіз кристалічної структури комплексу антиген-антитіло для ідентифікації точок контакту між антитілом і людським CEA. Зазначені залишки, які входять в контакт й сусідні залишки є кандидатами для заміни з використанням методів, відомих у даній галузі, та / або поданих в даному описі. Після створення таких варіантів панель варіантів можна піддавати скринінгу за допомогою методів, відомих у даній галузі, та / або поданих в даному описі, і антитіла, які мають поліпшені властивості за даними одного або декількох відповідних аналізів, можна відбирати для додаткового удосконалення.

Фаговий дисплей можна застосовувати для створення популяції послідовностей гіперваріабельних ділянок з батьківської антигензв'язуючої молекули, яка містить випадкову (i) амінокислотну (i) мутацію (i). Наприклад, змінюють шляхом мутації кілька сайтів гіперваріабельної ділянки (наприклад, 6-7 сайтів) для створення всіх можливих амінокислотних заміни в кожному сайті. В альтернативному варіанті можна піддавати неспецифічному мутагенезу варіабельні ділянки важкого і / або легкого ланцюга. Мутації можна створювати за допомогою методик, відомих в даній галузі, включаючи (але, не обмежуючись лише ними) застосування мутагенезних праймерів, контроль кількості циклів і використання мутагенних нуклеотидних аналогів 8-оксо-ДГТФ і ДПТФ в процесі ПЛР-ампліфікації. Створені таким чином варіанти антитіл експонуються в одновалентній формі на частинках нитчастих фагів у вигляді злиттів із продуктом гену III фагу M13, упакованого в кожную частинку. Варіанти, отримані за допомогою фагового дисплея, потім піддають скринінгу щодо їх біологічної активності (наприклад, афінності зв'язування) згідно методів, представлених в даному описі, і кандидати, з одним або декількома поліпшеними видами активності, застосовують для подальшого удосконалення. Методи створення фагових дисплейних бібліотек описані у Huse та ін., Science, 246, 1989, сс. 1275-1281; Proc. Nat'l Acad. Sci., USA, 88, 1991, сс. 4363-4366, повний зміст кожної з публікацій включено в даний опис в якості посилання. Альтернативний метод ідентифікації антигензв'язуючих молекул із дозрілою афінністю описано, наприклад, в US 7432063 на ім'я Balint та ін., повний зміст якого включено в даний опис в якості посилання. У деяких варіантах здійснення винаходу антигензв'язуючої молекули і варіанти антигензв'язуючих молекул, запропоновані в даному винаході, містять Fc-ділянку, переважно людську Fc-ділянку. Послідовності і структури Fc-ділянок відомі в даній галузі та охарактеризовані. У конкретному варіанті здійснення винаходу людську константну ділянку виводять з IgG1, і вона має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 121 і 122.

Однак під обсяг даного винаходу підпадають також варіанти і ізоформи людської Fc-ділянки. Наприклад, варіанти Fc-ділянок, які можна застосовувати відповідно до даного винаходу, можна отримувати за допомогою методів, викладених в US 6737056 на ім'я Presta (варіанти Fc-галузі зі зміненою ефекторною функцією в результаті однієї або декількох амінокислотних модифікацій); або в заявках на патент США № 60/439498; 60/456041; 60/514549; або в WO 2004/063351 (варіанти Fc-ділянок з підвищеною афінністю зв'язування в результаті амінокислотних модифікацій); або в заявці на патент США № 10 / 672280 або WO 2004/099249 (варіанти Fc-галузі зі зміненим зв'язуванням з FcγR в результаті амінокислотних модифікацій), повний зміст всіх документів включено в даний опис в якості посилання. У конкретному варіанті здійснення винаходу АЗМ, мішенню яких є CEA, і варіанти АЗМ містять Fc-ділянку, створену за допомогою глікоінженерії з метою зміни активності ефекторної функції АЗМ (наприклад, зниження фукозилування, підвищення афінності зв'язування з Fc-рецептором, підвищення ADCC і т.д.). Методи глікоінженерії, які можна застосовувати, детально викладені нижче в даному описі і відомі в даній галузі.

В одному з варіантів здійснення винаходу антигензв'язуючу молекулу або варіант антигензв'язуючої молекули, пропоновану / пропонований в даному винаході, кон'югують з додатковим фрагментом, таким як радіоактивна мітка або токсин. Зазначені кон'юговані антигензв'язуючі молекули можна отримувати численними методами, які добре відомі в даній галузі. Кон'югати, містять АЗМ, мішенню яких є CEA, пропоновані у винаході, детально викладені нижче в даному описі в розділі "Кон'югати антигензв'язуючих молекул, мішенню яких є CEA".

Експресійні вектори і клітини-хазяїни

Одним з об'єктів даного винаходу є експресійний вектор і / або клітина-хазяїн, які містять один або кілька виділених полінуклеотидів, запропонованих в даному винаході. Наприклад, клітина-хазяїн або експресійний вектор містить один або кілька полінуклеотидів або

5 полінуклеотидів, які кодують поліпептиди, АЗМ та / або варіанти АЗМ, представлені в даному описі. Іншим об'єктом даного винаходу є спосіб одержання АЗМ, яка специфічно зв'язується зі зв'язаним з мембраною людським СЕА, що полягає в тому, що: культивують клітину-хазяїна, яка містить один або кілька виділених полінуклеотидів, запропонованих в даному винаході, або експресійний вектор, який містить один або кілька виділених полінуклеотидів, запропонованих в

10 даному винаході, в середовищі або в умовах, в яких може відбуватися експресія одного або декількох полінуклеотидів, де один або декілька полінуклеотидів кодує (ють) один або кілька поліпептидів, що утворюють частину АЗМ; і виділяють зазначену АЗМ, де АЗМ або її частина зв'язується зі зв'язаним з мембраною СЕА.

Як правило, для експресії АЗМ, запропонованої в даному винаході, можна застосовувати культивовану клітинну лінію будь-якого типу. У кращому варіанті здійснення винаходу в якості основної клітинної лінії для створення клітин-хазяїнів, запропонованих у винаході, використовують CHO-клітини, ВНК-клітини, NS0-клітини, SP2/0-клітини, клітини мієломи лінії YO, клітини мишачої мієломи лінії Р3Х63, PER-клітини, PER.C6-клітини або клітини гібридами, інші клітини ссавців, клітини дріжджів, клітини комах або клітини рослин.

У конкретному варіанті здійснення винаходу клітина-хазяїн або експресійний вектор містить один або кілька полінуклеотидів, що кодують анти-СЕА АЗМ, представлену в даному описі. В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло являє собою антитіло із дозрілою афінністю. Антитіло із дозрілою афінністю, як правило, має підвищену афінність зв'язування в порівнянні з референс-антитілом, з якого виведено антитіло із дозрілою афінністю. В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло з необхідними терапевтичними властивостями, включаючи (але, не обмежуючись лише ними): виражену афінність зв'язування з антигеном СЕА, зокрема, зі зв'язаним з мембраною СЕА, і при цьому практично повну відсутність перехресної реактивності до розчинного СЕА; здатність індукувати клітинний лізис клітин, які експресують СЕА *in vitro* і *ex vivo*, бажано в залежності від дози; здатність інгібувати опосередковану СЕА клітинну адгезію *in vitro*; здатність інгібувати ріст пухлинної тканини і / або індукувати регрес пухлинної тканини в дослідах на моделях пухлин, створених на мишах (наприклад, створених на мишах з використанням ксенотрансплантату). В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло має підвищену стабільність в порівнянні з батьківським антитілом, з якого виведено більш стабільне антитіло. В іншому варіанті здійснення винаходу варіант антитіла або його фрагмент містить

35 людську Fc-ділянку.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу один або кілька полінуклеотидів, що кодують АЗМ, запропоновану в даному винаході, можна експресувати під контролем конститутивного промотору або в альтернативному варіанті в регульованій експресійній системі. Прийняті регульовані експресійні системи включають (але, не обмежуючись ними) регульовану тетрацикліном експресійну систему, індуковану екдізоном експресійну систему, яка може перемикатися за допомогою Іас експресійну систему, індуковану глюкокортикоїдом експресійну систему, систему з використанням індукованого температурою промотору і індуковану металом металотіонеїну експресійну систему. Якщо в систему клітини-хазяїна входять декілька різних нуклеїнових кислот, що кодують АЗМ, запропоновані в даному винаході,

45 то деякі з них можна експресувати під контролем конститутивного промотору, а інші експресувати під контролем регульованого промотору. За максимальний рівень експресії приймають найбільш високий можливий рівень стабільної експресії поліпептиду, який не чинить значного шкідливого впливу на швидкість клітинного росту, і його можна визначати за допомогою звичайного експерименту. Рівні експресії визначають методами, добре відомими в даній галузі, в тому числі за допомогою Вестерн-блотингу з використанням антитіла, специфічного щодо АЗМ, або антитіла, специфічного до пептидної мітки, злитої із АЗМ; і методом Нозерн-блотингу. В іншому варіанті полінуклеотид може бути функціонально пов'язаний з репортерним геном; рівні експресії АЗМ, представлені в даному описі, визначають, оцінюючи сигнал, який корелює з рівнем експресії репортерного гену. Репортерний

50 ген можна транскрибувати разом з нуклеїновою (ими) кислотою (ами), яка (і) кодує (ють) АЗМ, у вигляді однієї молекули мРНК; відповідні їм такі, що кодують послідовності можуть бути злиті або за допомогою внутрішнього сайту зв'язування (посадки) рибосом (IRES) або за допомогою незалежного від кепа енхансеру трансляції (CITE). Репортерний ген можна транслювати в поєднанні щонайменше з однією нуклеїновою кислотою, що кодує АЗМ, представлену в даному описі, з утворенням одного поліпептидного ланцюга. Нуклеїнові кислоти, які кодують АЗМ,

60

пропоновану в даному винаході, можна функціонально пов'язувати з репортерним геном під контролем одного промотору, так, щоб нуклеїнова кислота, що кодує АЗМ і репортерний ген, транскрибувалася із молекули РНК, з якої в результаті альтернативного сплайсингу утворювалися дві різні молекули матричної РНК (мРНК); після трансляції однієї з утворених мРНК отримують репортерний білок, а після трансляції другий отримують АЗМ.

Для конструювання експресійних векторів, що містять послідовність, що кодує АЗМ, яка зв'язується з тим же епітопом, що і мишаче антитіло PR1A3, поряд з відповідними сигналами, контролюючими транскрипцію / трансляцію, можна застосовувати методи, добре відомі фахівцям в даній галузі. Ці методи являють собою методи рекомбінантної ДНК *in vitro*, методи синтезу і методи рекомбінації / генетичної рекомбінації *in vivo* (див, наприклад, методи, описані у Maniatis та ін., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989; та Ausubel та ін., *Current Protocols in Molecular Biology*, вид-во Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989).

Для експресії яка кодує послідовності АЗМ, пропонованої в даному винаході, можна використовувати різні системи експресійних векторів-хазяїнів. Переважно клітини ссавців застосовують у ролі систем клітин-хазяїв, трансфектованих експресійними векторами у вигляді рекомбінантної плазмідної ДНК або рекомбінантної космідної ДНК, які містять послідовність, що кодує інтерес, який представляє білок, і кодуючи послідовність злитого поліпептиду. Найбільш переважно в якості системи клітин-хазяїв застосовують CHO-клітини, ВНК-клітини, NS0-клітини, SP2/0-клітини, клітини мієломи лінії YO, клітини мишачої мієломи лінії Р3Х63, PER-клітини, PER.C6-клітини або клітини гібридоми, інші клітини ссавців, клітини дріжджів, клітини комах і клітини рослин. Деякі приклади експресійних систем і методів селекції дано у наступних публікаціях і наведених у них посиланнях: Borth та ін., *Biotechnol. Bioen.* 71 (4), 2000-2001, сс. 266-273, Werner та ін., *Arzneimittelforschung / Drug Res.* 48 (8), 1998, сс. 870-880, Andersen і Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13, 2002, сс. 117-123, Chadd і Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12, 2001, сс. 188-194 і Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12, 2001, сс. 450-454.

В альтернативних варіантах здійснення винаходу можна застосовувати інші системи на основі еукаріотів-хазяїв, такі як клітини дріжджів, трансформовані рекомбінантними дріжджовими експресійними векторами, які містять послідовність, що кодує АЗМ, пропоновану в даному винаході, такі як системи експресії, описані в заявці на патент США № 60/344169 і в WO 03/056914 (методи отримання глікопротеїну який нагадує людський, у нелюдській еукаріотичній клітині-хазяїні) (зміст кожного з документів повністю включено в даний опис як посилання); системи клітин комах, заражених рекомбінантними вірусними експресійними векторами (наприклад, бакуловірусними векторами), які містять послідовність, що кодує антитіла до СЕА; системи рослинних клітин, заражені рекомбінантними вірусними експресійними векторами (наприклад, вірусом мозаїки кольорової капусти, CaMV; вірусом мозаїки тютюну, TMV), або трансформовані рекомбінантними плазмідними експресійними векторами (наприклад Ті-плазмідними), які містять послідовність, що кодує АЗМ, пропонованої у винаході, включаючи (але, не обмежуючись лише ними) системи експресії, описані в заявці на патент США № 6815184 (методи експресії і секреції біологічно активних поліпептидів із створеної за допомогою генної інженерії ряски); WO 2004/057002 (виробництво глікозилізованих білків в рослинних клітинах мохоподібних шляхом інтродукції гену глікозилтрансферази) і WO 2004/024927 (методи створення позаклітинного гетерологічного нерослинного білка в протопластах мохів); і в заявках на патент США № 60/365769, № 60/368047 і в WO 2003/078614 (процесинг глікопротеїнів в трансгенних рослинах, що містять функціональний фермент GnTIII ссавців) (зміст кожного з документів повністю включено в даний опис як посилання); або системи на основі клітин тварин, заражених рекомбінантними вірусними експресійними векторами (наприклад аденовірусними, на основі вірусу віспи), включаючи клітинні лінії, сконструйовані так, що вони містять безліч копій ДНК, яка кодує химерну анти-СЕА АЗМ, де копії або стабільно ампліфікують (CHO / dhfr), або нестабільно ампліфікують в подвійних мікрохромосомах (наприклад мишачі клітинні лінії). Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу вектор, що містить полінуклеотид (и), який (і) кодує (ють) АЗМ, пропоновану у винаході, є поліцістронним. Крім того, відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу зазначена вище АЗМ є антитіло або його фрагмент. В одному з варіантів здійснення винаходу АЗМ є антитіло із дозрілою афінністю. В одному з варіантів здійснення винаходу АЗМ є антитіло з "дозрілою" стабільністю.

Стабільна експресія, як правило, переважно являє собою короточасну експресію, оскільки при цьому зазвичай отримують більш відтворені результати, а також це більше відповідає великомасштабному виробництву, проте вирішення питання про те, чи є короточасна експресія більш кращою в конкретній ситуації, знаходиться в компетенції фахівця в даній галузі. Крім застосування експресійних векторів, які містять вірусні сайти ініціації реплікації, клітини-хазяїни

можна трансформувати відповідними нуклеїновими кислотами що кодують, які знаходяться під контролем відповідних контролюючих експресію елементів (наприклад, промоторні, енхансерні послідовності, термінатори транскрипції, сайти поліаденілювання і т.д.), і селектованим маркером. Після інтродукції чужорідної ДНК створеним клітинам можна давати рости протягом 1-2 днів в збагачених середовищах, а потім переносити на селективні середовища. Селектуємий маркер в рекомбінантних плазмідах надає стійкості до агенту, який селектує і дозволяє відбирати клітини, в хромосомах яких присутня стабільно інтегрована плазмідна, і вирощувати до утворення осередків, які в свою чергу можна клонувати і розмножувати з отриманням клітинних ліній.

Можна застосовувати численні системи селекції, включаючи (але, не обмежуючись ними) гени тимідинкінази вірусу герпесу простого (Wigler та ін., Cell 11, 1977, с. 223), гіпоксантин-гуанін-фосфорібозилтрансферази (Szybalska і Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 1962, с. 2026), і аденін-фосфорібозилтрансферази (Lowy та ін., Cell 22, 1980, с. 817), які можна застосовувати в *t⁻*, *hprt* - або *aprt* - клітинах відповідно. Крім того, можна використовувати стійкість до антиметаболітів в якості основи для відбору гену *dhfr*, який надає стійкості до метотрексату (Wigler та ін., Natl. Acad. Sci. USA 77, 1989, с. 3567; O'Hare та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1981, с. 1527); гену *gpt*, який надає стійкості до мікофенольної кислоти (Mulligan і Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1981, с. 2072); гену *neo*, який надає стійкості до аміноглікозидів G-418 (Colberre-Garapin та ін., J. Mol. Biol. 150, 1981, с. 1); і гену *hygro*, який надає стійкості до гігromіцину (Santerre та ін., Gene 30, 1984, с. 147). В даний час описані додаткові гени які селектуються, такі як *trpB*, який обумовлює можливість клітин утилізувати індол замість триптофану; *hisD*, який обумовлює можливість клітин утилізувати гістидин замість гістидину (Hartman і Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1988, с. 8047); система глутамінсинтази; і ODC (орнітиндекарбоксилази), яка надає стійкості до інгібітору орнітиндекарбоксилази, а саме, до 2 - (діфторметил)-DL-орнітин, DFMO (McConlogue, в: Current Communications in Molecular Biology, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1987).

У даному винаході описаний також спосіб модифікації профілю глікозилювання АЗМ, запропонованих в даному винаході, які продукуються клітиною-хазяїном, що полягає в тому, що експресують у клітині-хазяїні нуклеїнову кислоту, що кодує АЗМ, запроповану у винаході, і нуклеїнову кислоту, що кодує поліпептид, що має глікозилтрансферазну активність, або вектор, що містить зазначені нуклеїнові кислоти. Гени, що кодують глікозилтрансферазну активність, включають ген β (1,4)-N-ацетилглюкозамінілтрансферази III (GnTII), α -маннозидози II (ManII), β (1,4)-галактозилтрансферази (GalT), β (1,2) - N-ацетилглюкозамінілтрансферази I (GnTI) і β (1,2)-N-ацетилглюкозамінілтрансферази II (GnTII). В одному з варіантів здійснення винаходу в клітині-хазяїні експресують комбінацію генів, що кодують глікозилтрансферазну активність (наприклад, GnTIII і Man II). Крім того, спосіб полягає також у тому, що експресують один або кілька полінуклеотид (ів), який (і) кодує (ють) АЗМ, в клітині-хазяїні, в якій ген глікозилтрансферази зруйнований або іншим чином деактивований (наприклад, в клітині-хазяїні, в якій активність гену, що кодує корову α 1-6-фукозилтрансферазу, "вимкнена"). В іншому варіанті здійснення винаходу АЗМ, запропоновані в даному винаході, можна отримувати в клітині-хазяїні, в якій відбувається також експресія полінуклеотиду, що кодує поліпептид, у якого GnTIII-активність, з метою модифікації схеми глікозилювання. У конкретному варіанті здійснення винаходу поліпептид, у якого GnTIII-активність, являє собою злитий поліпептид, який містить домен локалізації в комплексі Гольджі поліпептиду, присутнього в комплексі Гольджі. В іншому переважному варіанті здійснення винаходу експресія АЗМ, запропонованих в даному винаході, в клітині-хазяїні, в якій відбувається експресія полінуклеотиду, що кодує поліпептид, у якого GnTIII-активність, призводить до утворення АЗМ, які мають підвищену афінність зв'язування з Fc-рецептором і підвищену ефекторну функцію. Таким чином, одним з варіантів здійснення даного винаходу є клітина-хазяїн, яка містить (а) виділену нуклеїнову кислоту, містить послідовність, яка кодує поліпептид, у якого GnTIII-активність; та (б) виділений полінуклеотид, який кодує АЗМ, запроповану в даному винаході, таку як химерне, приматизоване або гуманізоване антитіло, яке зв'язується з людським СЕА. У кращому варіанті здійснення винаходу поліпептид, у якого є GnTIII-активність, являє собою злитий поліпептид, який містить каталітичний домен GnTIII і домен локалізації в комплексі Гольджі, який являє собою домен локалізації маннозидози II. Методи створення зазначених злитих поліпептидів та їх застосування для отримання антитіл з підвищеними ефекторними функціями описані в попередній заявці на патент США № 60/495142 і в опублікованій заявці на патент США 2004/0241817, повний зміст яких включено в даний опис в якості посилання. У конкретному варіанті здійснення винаходу модифікована АЗМ, продукувана клітиною-хазяїном, несе константну ділянку IgG або її фрагмент, що містить Fc-ділянку. В іншому конкретному варіанті

здійснення винаходу АЗМ представляє собою гуманізоване антитіло або його фрагмент, що містить Fc-ділянку.

АЗМ із зміненою схемою глікозилювання, віднайдені клітинами-хазяїнами, пропонованими у винаході, як правило, відрізняються підвищеною афінністю зв'язування з Fc-рецептором та / або підвищеною ефекторною функцією в результаті модифікації клітини-хазяїна (наприклад, в результаті експресії гену глікозилтрансферази). Бажано підвищена афінність зв'язування з Fc-рецептором являє собою підвищене зв'язування з Fc γ -рецептором, який активує, таким як Fc γ RIIIa-рецептор. Підвищена ефекторна функція переважно являє собою підвищення однієї або декількох наступних функцій: підвищена антитіло-обумовлена клітинозалежна цитотоксичність, підвищений антитіло-обумовлений клітинозалежний фагоцитоз (ADCP), підвищена секреція цитокінів, підвищене опосередковане імунним комплексом поглинання антигену антигенпрезентуючими клітинами, підвищена Fc-залежна клітинно-опосередкована цитотоксичність, підвищене зв'язування із NK-клітинами, підвищене зв'язування з макрофагами, підвищене зв'язування із поліморфноядерними клітинами (PMN), підвищене зв'язування із моноцитами, підвищене перехресне зв'язування пов'язаних з мішенню антитіл, підвищена безпосередня передача сигналу, що індукує апоптоз, підвищене дозрівання дендритних клітин і підвищене Т-клітинне примірування.

Створення і застосування АЗМ, які мають підвищену ефекторну функцію, включаючи антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність

Одним з об'єктів даного винаходу є глікоформи АЗМ (наприклад, варіанти АЗМ), мають підвищену ефекторну функцію, включаючи антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність. Конструювання глікозилювання антитіл описано раніше (див., наприклад, US 6602684, повністю включений в даний опис в якості посилання). Методи отримання АЗМ з клітин-хазяїв із зміненою активністю генів, що беруть участь в глікозилюванні, також докладно представлені в даному описі (див., наприклад, попередній розділ, озаглавлений "експресійні вектори і клітини-хазяїни"). Підвищення ADCC-активності АЗМ, запропонованих в даному винаході, досягають також шляхом підвищення афінності антигензв'язуючої молекули до пов'язаного з мембраною CEA, наприклад, в результаті дозрівання афінності або інших методів підвищення афінності (див., Tang та ін., J. Immunol, 179, 2007, сс. 2815-2823). Під обсяг даного винаходу підпадають також комбінації зазначених підходів.

Клінічні випробування некон'югованих моноклональних антитіл (МАт) для лікування деяких типів раку в даний час дали обнадійливі результати (Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12, 1997, сс. 223-225; Deo та ін., Immunology Today 18, 1997, с. 127). Химерний некон'югований IgG1 був дозволений для застосування при слабо диференційованій або фолікулярній В-клітинній неходжкінській лімфомі (Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12, 1997, сс. 223-225), а при використанні іншого некон'югованого МАт, такого як гуманізований IgG1, мішенню якого є щільні пухлини, також отримані багатообіцяючі результати на фазі III клінічних випробувань (Deo та ін., Immunology Today 18, 1997, с. 127). Антигени двох зазначених МАт характеризуються високим рівнем експресії на відповідних пухлинних клітинах, і антитіла опосередковують ефективне руйнування пухлини за допомогою ефекторних клітин *in vitro* і *in vivo*. На противагу цьому, багато які інші некон'юговані МАт, що мають високу специфічність відносно пухлин, не мають здатності запускати ефекторні функції такого рівня, щоб їх можна було з успіхом застосовувати в клінічних цілях (Frost та ін., Cancer 80, 1997, сс. 317-333; Surfus та ін., J. Immunother. 19, 1996, сс. 184-191). Для деяких таких менш ефективних МАт в даний час оцінювали можливість застосування допоміжної терапії з використанням цитокінів. Додавання цитокінів може стимулювати антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність (ADCC) в результаті підвищення активності та кількості циркулюючих лімфоцитів (Frost та ін., Cancer 80, 1997, сс. 317-333; Surfus та ін., J. Immunother. 19, 1996, сс. 184-191). ADCC, що представляє собою літичний вплив на мічені антитілом клітини, запускається зв'язуванням рецепторів лейкоцитів із константною ділянкою (Fc) антитіл (Deo та ін., Immunology Today 18, 1997, с. 127).

Інший доповнюючий підхід до підвищення ADCC-активності некон'югованих IgG1 полягає в конструюванні Fc-галузі антитіла. Досліди з конструювання білків дозволили встановити, що Fc γ R взаємодіють з нижньої шарнірною ділянкою CH2-домену IgG (Lund та ін., J. Immunol. 157, 1996, сс. 4963-4969). Однак для зв'язування Fc γ R також потрібна присутність олігосахаридів, ковалентно пов'язаних з консервативним Asn 297 в CH2-галузі (Lund та ін., J. Immunol. 157, 1996, сс. 4963-4969; Wright і Morrison, Trends Biotech. 15, 1997, сс. 26-31), це дозволяє припустити, що або олігосахарид і поліпептид обидва безпосередньо беруть участь в сайті зв'язування, або олігосахарид потрібний для підтримки активної конформації CH2-поліпептиду. Таким чином, модифікацію структури олігосахариду можна застосовувати як засіб підвищення афінності взаємодії.

Молекула IgG несе два N-зв'язаних олігосахариди в Fc-ділянці, по одному на кожному важкому ланцюзі. Як і будь-який глікопротеїн, антитіло одержують у вигляді популяція глікоформ, які мають однаковий поліпептидний каркас, але несуть різні приєднані до сайтів глікозилювання олігосахариди. Олігосахариди, які, як правило, присутні в Fc-галузі сироваткового IgG, являють собою складні олігосахариди біантенного типу (Wormald та ін., *Biochemistry* 36, 1997, сс. 130-138) з низьким вмістом кінцевої сілової кислоти і дворозсічного N-ацетилглюкозаміну (GlcNAc) і с різними рівнями кінцевого галоктозилювання і корового фукозилювання. У деяких дослідженнях було висловлено припущення, що мінімальна вуглеводна структура, необхідна для Fc γ R-зв'язування, лежить всередині олігосахаридного ядра (Lund та ін., *J. Immunol.* 157, 1996, сс. 4963-4969).

У мишачих або хом'якових клітинних лініях, які застосовують у промисловості та наукових дослідженнях для отримання некон'югованих терапевтичних МАт, як правило, відбувається приєднання необхідних олігосахаридних детермінант до Fc-сайтів. Однак IgG, експресуються цими клітинними лініями, не містять дворозсічного GlcNAc, виявленого в невеликих кількостях в сироваткових IgG (Lifely та ін., *Glycobiology* 318, 1995, сс. 813-822). На протигау цьому, в даний час встановлено, що деяких з глікоформ щурячого продукowanego мієломою гуманізованого IgG1 (CAMPATH-1H) несуть дворозсічний олігосахарид GlcNAc (Lifely та ін., *Glycobiology* 318, 1995, сс. 813-822). Отримане з щурячих клітин антитіло забезпечує максимальну ADCC-активність *in vitro*, схожу з відповідною активністю антитіл CAMPATH-1H, одержаних в стандартних клітинних лініях, але при використанні істотно більш низьких концентрацій антитіла.

Антиген CAMPATH зазвичай присутній у високих концентраціях на клітинах лімфоми, а відповідне химерне МАт має високу ADCC-активність у відсутності дворозсічного GlcNAc (Lifely та ін., *Glycobiology* 318, 1995. Сс. 813-822). В N-зв'язаному шляху глікозилювання дворозсічний GlcNAc додають з використанням GnTIII (Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64, 1986, сс. 163-181).

У проведених раніше експериментах використовували одну антитілопродукуючу лінію CHO-клітин, яка раніше була створена для експресії під впливом зовнішньої регуляції різних рівнів клонованого гену ферменту GnTIII (Umana P. та ін., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, сс. 176-180). Цей підхід використовували насамперед для доказу суворої кореляції між експресією GnTIII і ADCC-активністю модифікованого антитіла. Таким чином, винахід відноситься до варіанту АЗМ (наприклад, АЗМ із дозрілою афінністю), який зв'язується зі зв'язаним з мембраною СЕА, який містить Fc-ділянку або ділянку, еквівалентну Fc-ділянці, із зміненим глікозилюванням в результаті зміни рівня експресії гену глікозилтрансферази в продукуючій АЗМ клітині-хазяїні. У конкретному варіанті здійснення винаходу зміна рівня генної експресії являє собою підвищення GnTIII-активності. Підвищена GnTIII-активність призводить до підвищення процентного вмісту бісекційних олігосахаридів, а також до зниження процентного вмісту фукозних залишків у Fc-ділянці АСМ. Це антитіло або його фрагмент має підвищену афінність зв'язування з Fc-рецептором і підвищену ефекторну функцію.

Даний винахід належить і до способу отримання анти-СЕА АЗМ, пропонованої в даному винаході, яка несе модифіковані олігосахариди, що полягає в тому, що (а) культивують клітину-хазяїна, сконструйовану таким чином, щоб вона експресувала щонайменше одну нуклеїнову кислоту, що кодує поліпептид, у якого є глікозилтрансферазна активність, в умовах, які забезпечують виробництво АЗМ, пропонованої в даному винаході, де поліпептид, у якого є глікозилтрансферазна активність, експресується в кількості, достатній для модифікації олігосахаридів в Fc-ділянці зазначеної АЗМ, що продукується клітиною-хазяїном; та (б) виділяють зазначену АЗМ. В одному з варіантів здійснення винаходу поліпептид, у якого є глікозилтрансферазна активність, являє собою GnTIII. В іншому варіанті здійснення винаходу застосовують два поліпептиди, що мають глікозилтрансферазна активність. У конкретному варіанті здійснення винаходу два пептиди, які мають глікозилтрансферазну активність, являють собою GnTIII і ManII. В іншому варіанті здійснення винаходу поліпептид, у якого є глікозилтрансферазна активність, являє собою злитий поліпептид, який містить каталітичний домен GnTIII. У більш конкретному варіанті здійснення винаходу злитий поліпептид додатково містить домен локалізації в комплексі Гольджі поліпептиду, присутнього в комплексі Гольджі. Бажано домен локалізації в комплексі Гольджі, являє собою домен локалізації маннозидази II або GnTI. В альтернативному варіанті домен локалізації в комплексі Гольджі вибирають з групи, що включає: домен локалізації маннозидази I, домен локалізації GnTII і домен локалізації коровою α -1-6 фукозилтрансферази. АЗМ, отримані способами, пропонованими в даному винаході, мають підвищену афінність зв'язування Fc-рецептора та / або підвищену ефекторну функцію. Як правило, підвищена ефекторна функція являє собою підвищену (і) одну або декілька з наступну функцій: підвищена Fc-залежна клітинно-опосередкована цитотоксичність

(включаючи підвищену антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність), підвищений антитіло-обумовлений клітинозалежний фагоцитоз (ADCP), підвищена секреція цитокінів, підвищене опосередковане імунним комплексом поглинання антигену антигенпрезентуючими клітинами, підвищене зв'язування із NK-клітинами, підвищене зв'язування з макрофагами, підвищене зв'язування із моноцитами, підвищене зв'язування із поліморфноядерними клітинами, підвищена безпосередня передача сигналу, індукуючого апоптоз, підвищене перехресне зв'язування пов'язаних з мішенню антитіл, підвищене дозрівання дендритних клітин або підвищене Т-клітинне примірування. Підвищена афінність зв'язування з Fc-рецептором переважно являє собою підвищене зв'язування з активуючим Fcγ-рецептором, таким як FcγRIIIa-рецептор. У найбільш кращому варіанті здійснення винаходу АЗМ представляє собою гуманізоване антитіло або його фрагмент.

В одному з варіантів здійснення винаходу відсоток бісекційних N-пов'язаних олігосахаридів в Fc-ділянці АЗМ складає щонайменше від приблизно 10 % до приблизно 100 %, зокрема, щонайменше приблизно 50 %, більш переважно щонайменше приблизно 60 %, за принаймні приблизно 70 %, принаймні приблизно 80 % або щонайменше приблизно 90-95 % від загального вмісту олігосахаридів. Відповідно до наступного варіанта здійснення винаходу антигензв'язуюча молекула або варіант антигензв'язуючої молекули, отримана / отриманий способами, пропонуваними у винаході, має підвищений відносний вміст нефукозильованих олігосахаридів в Fc-ділянці в результаті модифікації олігосахаридів за допомогою способів, запропонованих в даному винаході. В одному з варіантів здійснення винаходу відсоток нефукозильованих олігосахаридів становить від щонайменше приблизно 20 % до приблизно 100 %, зокрема щонайменше приблизно 50 %, краще від щонайменше приблизно 60 % до приблизно 70 % і найкраще щонайменше приблизно 75 %. Нефукозильовані олігосахариди можуть бути гібридного або комплексного типу. Відповідно до наступного варіанта здійснення винаходу антигензв'язуюча молекула або варіант антигензв'язуючої молекули, отримана / отриманий способами, пропонуваними у винаході, має підвищений відносний вміст бісекційних олігосахаридів в Fc-ділянці в результаті модифікації олігосахаридів за допомогою способів, запропонованих в даному винаході. В одному з варіантів здійснення винаходу відсоток бісекційних олігосахаридів становить від щонайменше приблизно 20 % до приблизно 100 %, зокрема, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше від приблизно 60 % до приблизно 70 % і більше переважно щонайменше приблизно 75 %. У найбільш кращому варіанті здійснення винаходу АЗМ, отримана в клітинах-хазяїнах і за допомогою способів, запропонованих у винаході, має підвищений вміст бісекційних нефукозильованих олігосахаридів в Fc-ділянці. Бісекційні нефукозильовані олігосахариди можуть бути гібридними або комплексними. Зокрема, способи, запропоновані в даному винаході, можна використовувати для отримання антигензв'язуючих молекул, в яких від щонайменше приблизно 10 % до приблизно 100 %, зокрема, щонайменше приблизно 15 %, переважно від щонайменше приблизно 20 % до приблизно 50 %, ще більш краще від щонайменше приблизно 20 % до приблизно 25 % і найбільш переважно від щонайменше приблизно 30 % до приблизно 35 % олігосахаридів Fc-ділянці антигензв'язуючої молекули або варіанта антигензв'язуючої молекули є бісекційними нефукозильованими. АЗМ, запропоновані в даному винаході, можуть містити також Fc-ділянку, в якій від щонайменше приблизно 10 % до приблизно 100 %, зокрема, щонайменше приблизно 15 %, більш конкретно від щонайменше приблизно 20 % до приблизно 25 % і найбільш переважно від щонайменше приблизно 30 % до приблизно 35 % олігосахаридів в Fc-ділянці АЗМ є бісекційними гібридними нефукозильованими.

Іншим варіантом здійснення даного винаходу є антигензв'язуюча молекула (наприклад, варіант АЗМ), мішенню якої є СЕА, сконструйована так, що вона має підвищену ефекторну функцію і / або підвищену афінність зв'язування з Fc-рецептором, яка отримана за допомогою способів, запропонованих у винаході. Підвищена ефекторна функція може включати (але, не обмежуючись лише ними) підвищену (і) одну або декілька з наступну функцій: підвищена Fc-залежна клітинно-опосередкована цитотоксичність (включаючи підвищену антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність), підвищений антитіло-обумовлений клітинозалежний фагоцитоз (ADCP), підвищена секреція цитокінів, підвищене опосередковане імунним комплексом поглинання антигену антигенпрезентуючими клітинами, підвищене зв'язування із NK-клітинами, підвищене зв'язування з макрофагами, підвищене зв'язування із моноцитами, підвищене зв'язування із поліморфноядерними клітинами, підвищена безпосередня передача сигналу, що індукує апоптоз, підвищене перехресне зв'язування пов'язаних з мішенню антитіл, підвищене дозрівання дендритних клітин або підвищене Т-клітинне примірування. У кращому варіанті здійснення винаходу підвищена афінність зв'язування з Fc-рецептором переважно являє собою підвищене зв'язування з активуючим Fcγ-рецептором, найбільш переважно із

FcγRIIIa-рецептором. В одному з варіантів здійснення винаходу антигензв'язуюча молекула або варіант антигензв'язуючої молекули являє собою антитіло, фрагмент антитіла, містить Fc-ділянку, або злитий білок, який включає ділянку, еквівалентну Fc-ділянці імуноглобуліну. У найбільш кращому варіанті здійснення винаходу антигензв'язуюча молекула або варіант антигензв'язуючої молекули представляє собою гуманізоване антитіло із дозрілою афінністю.

Даний винахід належить і до способів створення і застосування систем клітин-хазяїв для виробництва глікоформ АЗМ, запропонованих в даному винаході, які мають підвищену афінність зв'язування з Fc-рецептором, переважно підвищеним зв'язуванням з активуючими Fc-рецепторами, та / або мають підвищені ефекторні функції, включаючи антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність. Методологія глікоінженерії, яку можна застосовувати для АЗМ, запропонованих в даному винаході, описана більш детально в US 6602684, опублікованій заявці на патент США № 2004/0241817 A1, опублікованій заявці на патент № 2003/0175884 A1, попередній заявці на патент США № 60/441307 і WO 2004/065540, повний зміст кожного документа включено в даний опис в якості посилання. В альтернативному варіанті АЗМ, запропоновані в даному винаході, можна піддавати глікоінженерії, створюючи у них знижену кількість фукозних залишків у Fc-ділянці, з використанням методик, описаних в опублікованій заявці на патент США 2003/0157108 (на ім'я фірми Genentech) або в EP 1176195A1, WO 03/084570, WO 03/085119 і в опублікованих заявках на патент США № № 2003/0115614, 2004/093621, 2004/110282, 2004/110704, 2004/132140 (на ім'я фірми Kyowa). Повний зміст кожного документа включено в даний опис в якості посилання. Створені за допомогою глікоінженерії АЗМ, пропонувані у винаході, можна отримувати також у системах експресії, які продукують модифіковані глікопротеїни, які описані в опублікованій заявці на патент США № 60/344169 і в WO 03/056914 (на ім'я фірми GlycoFi, Inc.) або в WO 2004/057002 і WO 2004/024927 (на ім'я фірми Greenovation), повний зміст кожного документа включено в даний опис в якості посилання.

Створення клітинних ліній для виробництва білків із зміненою схемою глікозилування

Одним з об'єктів даного винаходу є системи експресії клітин-хазяїв, призначені для створення АЗМ, запропонованих в даному винаході, які мають модифіковані схеми глікозилування. Зокрема, в даному винаході описані системи клітин-хазяїв, призначені для створення глікоформ АЗМ, запропонованих в даному винаході, які мають підвищену терапевтичну цінність. Таким чином, винахід належить до систем експресії клітин-хазяїв, вибраних або сконструйованих для експресії поліпептиду, що має глікозилтрансферазну активність. У конкретному варіанті здійснення винаходу глікозилтрансферазна активність являє собою GnTIII-активність. В одному з варіантів здійснення винаходу поліпептид, у якого є GnTIII-активність, являє собою злитий поліпептид, який містить домен локалізації в комплексі Гольджі гетерологічного поліпептиду, присутнього в комплексі Гольджі. Зокрема, системи експресії клітин-хазяїв можна конструювати так, щоб вони містили рекомбінантну молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, у якого є GnTIII-активність, функціонально пов'язаний з системою конститутивного або регульованого промотору.

Одним з конкретних варіантів здійснення даного винаходу є клітина-хазяїн, сконструйована для експресії щонайменше однієї нуклеїнової кислоти, яка кодує злитий поліпептид, у якого є GnTIII-активність, і що містить домен локалізації в комплексі Гольджі гетерологічного поліпептиду, присутнього в комплексі Гольджі. Одним з об'єктів винаходу є клітина-хазяїн, сконструйована так, що вона містить молекулу нуклеїнової кислоти, що містить щонайменше один ген, який кодує злитий поліпептид, що має GnTIII-активність і містить домен локалізації в комплексі Гольджі гетерологічного поліпептиду, присутнього в комплексі Гольджі.

Як правило, можна застосовувати культивовану лінію клітин будь-якого типу, включаючи вказані вище клітинні лінії, в якості основи для створення ліній клітин-хазяїв, запропонованих в даному винаході. У кращому варіанті здійснення винаходу CHO-клітини, BHK-клітини, NS0-клітини, SP2/0-клітини, клітини мієломи лінії YO, клітини мишачої мієломи лінії P3X63, PER-клітини, PER.C6-клітини або клітини гібридами, інші клітини ссавців, клітини дріжджів, клітини комах і клітини рослин застосовують в якості вихідної клітинної лінії для створення клітин-хазяїв, запропонованих у винаході.

Винахід відноситься до будь-яких сконструйованих клітин-хазяїв, які експресують поліпептид, у якого є глікозилтрансферазна активність, наприклад, GnTIII-активність, включаючи зазначений в цьому описі злитий поліпептид, який містить домен локалізації в комплексі Гольджі гетерологічного поліпептиду, присутнього в комплексі Гольджі.

Одну або кілька нуклеїнових кислот, що кодують поліпептид, що має глікозилтрансферазну активність, наприклад, GnTIII-активність, можна експресувати під контролем конститутивного промотору або в альтернативному варіанті з використанням регульованої системи експресії.

Зазначені системи добре відомі в даній ділянці, і до них відносяться описані вище системи. Якщо в систему клітини-хазяїна входить декілька різних нуклеїнових кислот, що кодують злиті поліпептиди, з глікозилтрансферазною активністю, наприклад, GnTIII-активністю, і містять домен локалізації в комплексі Гольджі гетерологічного поліпептиду, присутнього в комплексі Гольджі, то деякі з них можна експресувати під контролем конститутивного промотору, а інші експресувати під контролем регульованого промотору. Рівні експресії злитих поліпептидів, які мають глікозилтрансферазну активність, наприклад, GnTIII-активність, визначають за допомогою методів, добре відомих в даній галузі, включаючи аналіз методом Вестерн-блотингу, аналіз методом Нозерн-блотингу, аналіз експресії репортерного гену або вимірювання глікозилтрансферазної активності, наприклад, GnTIII-активності. В альтернативному варіанті можна застосовувати лектин, який зв'язується з продуктами біосинтезу GnTIII, наприклад, лектин E4-PNA. В альтернативному варіанті можна застосовувати функціональний аналіз, який дозволяє вимірювати підвищене зв'язування з Fc-рецептором або підвищену ефекторну функцію, опосередковувану антитілами, які продукуються клітинами, створеними з використанням нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, у якого є глікозилтрансферазна активність, наприклад, GnTIII-активність.

Ідентифікація трансфектантів або трансформантів, які експресують білок з модифікованою схемою глікозилування

Клітини-хазяїни, які містять послідовність, що кодує варіанту анти-CEA АЗМ (наприклад, гуманізованого АЗМ із дозрілою афінністю та / або АЗМ з "дозрілою" стабільністю), які експресують біологічно активні генні продукти, можна модифікувати за допомогою щонайменше чотирьох загальних підходів, таких як: (а) гібридизація ДНК-ДНК або ДНК-РНК; (б) наявність або відсутність функцій "маркерних" генів; (в) оцінка рівня транскрипції за рівнем експресії відповідних мРНК-транскриптів в клітині-хазяїні; і (г) виявлення генного продукту за допомогою імунного аналізу або за його біологічної активності.

При використанні першого підходу присутність яка кодує послідовності варіанту антитіла до CEA і / або яка кодує послідовності поліпептиду, що має глікозилтрансферазну активність (наприклад, GnTIII-активність), можна визначати за допомогою гібридизації ДНК-ДНК або ДНК-РНК з використанням зондів, містять нуклеотидні послідовності, гомологічні відповідним кодуючим послідовностям, або їх фрагментами або похідним відповідно.

При використанні другого підходу рекомбінантний експресійний вектор / систему хазяїна можна ідентифікувати і відбирати по присутності або відсутності функцій певних "маркерних" генів (наприклад тимідинкіназна активність, стійкість до антибіотиків, стійкість до метотрексату, трансформація фенотипу, утворення тілець включення у бакуловірусів і т.д.). Наприклад, якщо кодуючу послідовність АЗМ, запропоновану у винаході, або її фрагмента та / або кодуючу послідовність поліпептиду, що має глікозилтрансферазну активність (наприклад, GnTIII-активність), вбудовують в послідовність маркерного гену, присутнього у векторі, то рекомбінанти, містять відповідні послідовності, які кодують, можна ідентифікувати за відсутністю функції маркерного гена. В альтернативному варіанті маркерний ген можна поміщати в тандемі з послідовностями що кодують під контроль однакових або різних промоторів, застосовуваних для контролю експресії послідовностей, що кодують. Експресія маркера у відповідь на індукцію або селекцію свідчить про експресію послідовності яка кодує АЗМ, запропоновану у винаході, та / або послідовності поліпептиду, що кодує, що має глікозилтрансферазну активність (наприклад, GnTIII-активність).

При використанні третього підходу транскрипційну активність яка кодує ділянки АЗМ, запропоновану у винаході, або її фрагмента та / або послідовності, що кодує поліпептиду, що має глікозилтрансферазну активність (наприклад, GnTIII-активність), можна оцінювати за допомогою гібридизації. Наприклад, РНК можна виділяти і аналізувати за допомогою Нозерн-блотингу з використанням зонда, гомологічного кодуючим послідовностям АЗМ, пропонуваним у винаході, або їх фрагментами, і яка кодує послідовності поліпептиду, що має глікозилтрансферазну активність (наприклад, GnTIII-активність), або його певних фрагментів. В альтернативному варіанті загальні нуклеїнові кислоти клітини-хазяїна можна екстрагувати і оцінювати гібридизацію із зазначеними зондами.

При використанні четвертого підходу експресію білкових продуктів можна оцінювати імунологічно, наприклад, за допомогою Вестерн-блотингу, таких імунологічних аналізів, як радіоімунопреципітація, імуоферментні аналізи і т.п. Однак кінцевий тест, що дозволяє оцінити ефективність системи експресії, включає визначення біологічно активних генних продуктів.

Терапевтичне застосування і методи застосування антигензв'язуючих молекул, мішенню яких є CEA

Винахід належить і до способу спрямованого впливу in vivo або in vitro на клітини, які

експресують CEA. На клітини, які експресують CEA, можна чинити спрямований вплив в терапевтичних цілях (наприклад, для лікування порушення шляхом спрямованого впливу на клітини які експресують CEA з метою їх деструкції імунною системою). Одним з варіантів здійснення даного винаходу є спосіб спрямованого впливу на клітини, які експресують CEA, у індивідуума, що полягає в тому, що вводять індивідууму композицію, яка містить АЗМ, пропонувану у винаході. На клітини, які експресують CEA, можна чинити спрямований вплив в діагностичних цілях (наприклад, для вирішення питання про те, чи відбувається в них нормальна або аномальна експресія CEA). Таким чином, винахід належить і до способів виявлення присутності CEA або клітин, що експресують CEA, або *in vivo*, або *in vitro*. Один із способів виявлення експресії CEA, запропонованих в даному винаході, полягає в тому, що приводять у контакт зразок який підлягає тестуванню, необов'язково в поєднанні з контрольним зразком, з АЗМ, запропонованій в даному винаході, в умовах, в яких може утворюватися комплекс між АЗМ і CEA. Потім здійснюють виявлення утворення комплексу (наприклад, за допомогою ELISA або інших методів, відомих у даній галузі). Коли застосовують контрольний зразок у поєднанні з тестованим зразком, то будь-яка статистично значуща відмінність в утворенні комплексів АЗМ-CEA. при порівнянні тестованих і контрольних зразків свідчить про присутність CEA в тестованому зразку.

Відповідно до одного з об'єктів винаходу АЗМ та / або варіанти АЗМ, запропоновані в даному винаході, можна застосовувати для виявлення *in vivo* або *in vitro* клітин-мішеней, які експресують CEA. На клітини, які експресують CEA, можна чинити спрямований вплив в діагностичних або терапевтичних цілях. Відповідно до одного з об'єктів винаходу АЗМ, запропоновані в даному винаході, можна застосовувати для виявлення присутності CEA у зразку. Для CEA характерна аномальна експресія (наприклад, надекспресія) у багатьох людських пухлинах порівняно з непухлинною тканиною з цього ж типу клітин. Таким чином, АЗМ та / або варіанти АЗМ, пропонувані у винаході, найбільш переважно застосовувати для попередження утворення пухлин, ліквідації пухлин і інгібування росту пухлин або метастазів. Дія АЗМ та / або варіантів АЗМ, запропонованих у винаході, може виявлятися також в припиненні клітинного циклу, у апоптозу клітин-мішеней (наприклад, пухлинних клітин) і в інгібуванні ангиогенезу та / або диференціювання клітин-мішеней. АЗМ та / або варіанти АЗМ, пропонувані у винаході, можна застосовувати також для лікування будь-якої пухлини, яка експресує CEA. Конкретні злоякісні захворювання, які можна лікувати за допомогою АЗМ, запропонованих у винаході, включають (але, не обмежуючись лише ними) колоректальний рак, недрібноклітинний рак легені, рак шлунка, рак підшлункової залози та рак молочної залози.

Анти-CEA АЗМ і / або варіанти АЗМ, представлені в даному описі, можна застосовувати індивідуально для інгібування росту пухлин або знищення пухлинних клітин. Наприклад анти-CEA АЗМ та / або варіанти АЗМ можуть зв'язуватися з CEA, який знаходиться на мембрані або поверхні ракових клітин і ініціювати, наприклад, ADCC або інше опосередковане ефекторними клітинами знищення ракових клітин. Анти-CEA АЗМ і / або варіанти АЗМ, можуть являти собою гуманізовану, специфічну, із дозрілою афінністю та / або з дозрілою стабільністю, більш конкретно створену за допомогою глікоінженерії і з дозрілою стабільністю і афінністю молекулу.

В альтернативному варіанті АЗМ і / або варіанти АЗМ можна застосовувати індивідуально для того, щоб блокувати активність антигену CEA, насамперед шляхом фізичного втручання в його зв'язування з іншим з'єднанням. Наприклад, антигензв'язуючі молекули і варіанти антигензв'язуючих молекул можна застосовувати для блокади опосередкованої CEA клітинної адгезії.

Анти-CEA АЗМ і / або варіанти АЗМ, пропонувані у винаході, вводять ссавцю, переважно людині, у фармацевтично прийнятній лікарській формі, такої як описана нижче форма, включаючи форми, які можна вводити людині внутрішньовенно у вигляді болюсної або безперервної (тривалої) інфузії в протягом певного періоду часу, за допомогою внутрішньом'язового, внутрішньочеревного, всередину спинного мозку, підшкірного, внутрішньосуглобового, всередину синовіальної рідини, внутрішньо оболонкового, орального, місцевого шляху введення або за допомогою інгаляції. АЗМ можна вводити також всередину пухлини, перитуморально, всередину пошкодження або навколо ушкодження для досягнення локальних, а також системних терапевтичних дій. Очікується, що внутрішньочеревний шлях є найбільш перспективним, наприклад, при лікуванні колоректальних пухлин.

Для лікування захворювання відповідна доза АЗМ і / або варіанта АЗМ повинна залежати від типу захворювання, що підлягає лікуванню, серйозності і перебігу захворювання, попередньої терапії, історії хвороби пацієнта і відповіді на антитіло та приписів лікаря, який лікує. АЗМ можна вводити пацієнту одноразово або у вигляді серій обробок.

Даний винахід належить і до способу виборчого знищення пухлинних клітин, що експресують СЕА. Цей спосіб полягає в тому, що здійснюють взаємодію антигензв'язуючих молекул або кон'югатів (наприклад, що включають імунотоксин), запропонованих у винаході, із зазначеними пухлинними клітинами. Ці пухлинні клітини можуть мати походження з людської карциноми, включаючи колоректальну карциному, недрібноклітинну карциному легені (NSCLC), карциному шлунка, карциному підшлункової залози і карциному молочної залози.

Одним з варіантів здійснення даного винаходу є спосіб інгібування опосередковуваної СЕА клітинної адгезії пухлинної клітини. Цей спосіб полягає в тому, що приводять у контакт пухлинну клітину з антигензв'язуючими молекулами або кон'югатами, запропонованими у винаході. Ці пухлинні клітини можуть являти собою людські пухлинні клітини, включаючи клітини колоректального раку, клітини недрібноклітинного раку легені (NSCLC), клітини раку шлунка, клітини раку підшлункової залози і клітини раку молочної залози.

Крім того, даний винахід належить до способу лікування карцином (наприклад, людських карцином) *in vivo*. Цей спосіб полягає в тому, що вводять індивідууму у фармацевтично ефективній кількості композицію, яка містить щонайменше одну з антигензв'язуючих молекул або імунокон'югатів (наприклад, що включають імунотоксин), запропонованих у винаході.

Наступним об'єктом винаходу є спосіб лікування різних видів раку, клітини якого відрізняються надекспресією СЕА, включаючи (але, не обмежуючись лише ними) клітини колоректального раку, NSCLC (клітини недрібноклітинного раку легені), клітини раку шлунка, клітини раку підшлункової залози і клітини раку молочної залози, що полягає в тому, що вводять в терапевтично ефективній кількості антигензв'язуючі молекули, мішенню яких є СЕА, або варіанти антигензв'язуючих молекул, представлені в даному описі.

Наступним варіантом здійснення винаходу є спосіб індукції регресу пухлинної тканини у індивідуума з використанням антигензв'язуючих молекул, мішенню яких є СЕА, або варіантів антигензв'язуючих молекул, представлених в даному описі. Прикладами пухлинної тканини є (але, не обмежуючись лише ними) колоректальна пухлина, пухлина недрібноклітинного раку легені, пухлина шлунка, пухлина підшлункової залози і пухлина молочної залози. У конкретному варіанті здійснення винаходу пухлинна тканина являє собою колоректальну пухлину.

При здійсненні даного винаходу на практиці індивідуум може представляти собою людину, коня, свиню, бика, миша, собаку, кішку і птахів. Під обсяг даного винаходу підпадають також і інші теплокровні тварини.

У винаході запропоновані також способи інгібування росту пухлинних клітин, лікування пухлини у пацієнта і лікування захворювання проліферативного типу у пацієнта. Ці способи полягають у тому, що пацієнтові вводять в ефективній кількості композицію, пропонувану у винаході.

Наступним об'єктом винаходу є застосування антигензв'язуючих молекул, мішенню яких є СЕА, або варіантів антигензв'язуючих молекул, представлених в даному описі, для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування захворювання, пов'язаного з аномальною експресією СЕА. У конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання являє собою рак, при якому відбувається надекспресія СЕА, включаючи (але, не обмежуючись лише ними) колоректальну пухлину, недрібноклітинну пухлину легені, пухлину шлунка, пухлину підшлункової залози й пухлину молочної залози. У конкретному варіанті здійснення винаходу рак являє собою колоректальну пухлину.

Кон'югати антигензв'язуючих молекул, мішенню яких є СЕА

Винахід належить і до імунокон'югатів, що містить анти-СЕА АЗМ або варіант АЗМ, представлену / представлений у цьому описі, кон'юговану / кон'югований з одним або декількома цитотоксичними агентами, такими як хіміотерапевтичні або лікарські засоби, інгібітори росту, токсини (наприклад, білкові токсини, з ферментативною активністю токсини бактерій, грибів, рослин або тварин або їх фрагменти) або радіоактивні ізотопи.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу в кон'югаті антитіло-лікарський засіб (ADC) антитіло кон'юговано з одним або декількома лікарськими засобами, включаючи (але, не обмежуючись лише ними) майтансиноїд (див. US 5208020, 5416064 та європейський патент EP 0425235 B1); аурістатин, такий як лікарський засіб на основі монометілаурістатину з фрагментами DE і DF (MMAE (малеїмідокапроїл-монометілаурістатин E) і MMAF (монометілаурістатин F)) (див. US 5635483, 5780588 та 7498298); доластатин; каліхеаміцином або його похідні (див. US 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 і 5877296; Hinman та ін., Cancer Res. 53, 1993, сс. 3336-3342; і Lode та ін., Cancer Res. 58, 1998, сс. 2925-2928); антрациклін, такий як дауноміцин або доксорубіцин (див. Kratz та ін., Current Med. Chem. 13, 2006, сс. 477-523; Jeffrey та ін., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16, 2006, сс. 358-362; Torgov та ін., Bioconj. Chem. 16, 2005, сс. 717-721; Nagy та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97,

2000, сс. 829-834; Dubowchik та ін., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12, 2002, сс. 1529-1532; King та ін., J. Med. Chem. 45, 2002, сс. 4336-4343; і US 6630579); метотрексат; віндезин; таксан, такий як доцетаксел, паклітаксел, ларотаксел, тесетаксел і ортатаксел; трихотецен; і CC1065.

В іншому варіанті здійснення винаходу імунокон'югат містить анти-CEA АЗМ або варіант АЗМ, представлену / представлений у цьому описі, кон'юговану / кон'югований з таким, що має ферментативну активність токсином або його фрагментом, включаючи (але, не обмежуючись лише ними) ланцюг А дифтерійного токсину, які не зв'язуються активні фрагменти дифтерійного токсину, ланцюг А екзотоксину (з *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А ріцину, ланцюг А абріну, ланцюг А модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантину, білки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор із *Momordica charantia*, курцин, кротін, інгібітор із *Saponaia officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трикотецени.

В іншому варіанті здійснення винаходу імунокон'югат містить анти-CEA АЗМ або варіант АЗМ, представлену / представлений у цьому описі, кон'юговану / кон'югований з радіоактивним атомом з утворенням радіокон'югату. Для отримання радіокон'югатів можна застосовувати широке різноманіття радіоактивних ізотопів. Їх прикладами є At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} і радіоактивні ізомери Lu. Коли радіокон'югат застосовують для цілей виявлення, він може містити радіоактивний атом для сцинтиграфічних досліджень, наприклад, ^{99m}Tc або ^{112}In , або спін-мітку для візуалізації методом ядерного магнітного резонансу (ЯМР) (який називають також магнітно-резонансною томографією, МРТ), наприклад, йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

Кон'югати, що включають антитіло і цитотоксичний агент, можна створювати з використанням цілого ряду біфункціональних агентів, які зв'язують білки, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіол)пропіонат (SPDP), N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогенсан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоефірів (такі як диметиладипімідат • HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаровий альдегід), бісазидосполуки (такі як біс (пара-азидобензоїл)гександіамін), похідні бісдіазонію (такі як біс (пара-діазонійбензоїл) етилендіамін), діізоціанату (такі як толуол-2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, імунотоксин ріцину можна отримувати згідно з методом, описаним у Vitetta та ін., Science, 238, 1987, с. 1098. Мічена за допомогою C^{14} 1-ізотіоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) є прикладом хелатуючого агента для кон'югації радіонуклеотиду з антитілом (див. WO 94/11026). Лінкер може являти собою "лікер, що відщеплюється", який полегшує вивільнення цитотоксичного лікарського засобу в клітині. Наприклад, можна застосовувати нестійкий у кислому середовищі лінкер, чутливий до дії пептидаз лінкер, фотолабільний лінкер, диметильний лінкер або лінкер, що містить дисульфід (Chari та ін., Cancer Res. 52, 1992, сс. 127-131; US 5208020).

У контексті даного опису під імунокон'югатами або ADC маються на увазі (але, не обмежуючись лише ними) кон'югати, отримані з використанням перехреснозшиваючих агентів, включаючи (але, не обмежуючись тільки 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 надходять у продаж (наприклад, від фірми Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, шт. Іллінойс, США).

Композиції, препаративні форми, дози і шляхи введення

Одним з об'єктів даного винаходу є фармацевтичні композиції, що містять анти-CEA АЗМ або варіанти АЗМ, запропоновані в даному винаході, і фармацевтично прийнятний носій. Даний винахід належить і до застосування зазначених фармацевтичних композицій у способі лікування захворювання, такого як рак, або для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування захворювання, такого як рак. Зокрема, в даному винаході запропонований спосіб лікування захворювання і більш конкретно спосіб лікування раку, що полягає в тому, що вводять в терапевтично ефективній кількості фармацевтичну композицію, запроповану у винаході.

Одним з об'єктів даного винаходу є фармацевтичні композиції, комбінації і способи лікування людських карцином, наприклад, колоректальної карциноми. Наприклад, винахід відноситься до фармацевтичних композицій, призначених для застосування при лікуванні людських карцином, які містять у фармацевтично ефективній кількості антитіло, запропоноване в даному винаході, і фармацевтично прийнятний носій.

Містять АЗМ композиції, запропоновані у винаході, можна вводити загальноприйнятими шляхами, включаючи (але, не обмежуючись ними) внутрішньовенне, внутрішньочеревинне, оральне, внутрішньолімфатичне введення або введення безпосередньо в пухлину. Кращим є внутрішньовенне введення.

Відповідно до одного з об'єктів винаходу терапевтичні композиції, які містять АСМ, пропонувані у винаході, готують в призначеній для зберігання формі шляхом змішування антитіла, що має необхідну ступінь чистоти, з необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами (див. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е вид., під ред. Osol A., 1980), у формі ліофілізованих складів або водних розчинів. Прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів в застосовуваних дозах і концентраціях.

Препаративні форми, призначені для застосування *in vivo*, повинні бути стерильними. Це можна легко забезпечувати шляхом фільтрації через стерильні фільтраційні мембрани.

Найбільш ефективний шлях введення і схема прийому лікарського засобу для фармацевтичних композицій, запропонованих в даному винаході, залежить від серйозності і перебігу захворювання, стану здоров'я пацієнта та його реакції на лікування, і їх визначає лікуючий лікар. Такі дози композицій повинні бути підібрані для кожного пацієнта. Однак ефективна доза композицій, запропонованих в даному винаході, як правило, становить від приблизно 0,01 до приблизно 2000 мг/кг.

Представлені в даному описі молекули можуть входити до складу різних форм лікарських засобів, включаючи (але, не обмежуючись ними) рідкі розчини або суспензії, таблетки, пігулки, порошки, супозиторії, полімерні мікрокапсули або мікробульбашки, ліпосоми і такі, що вводяться шляхом ін'єкції або інфузії, розчини. Краща форма залежить від шляху введення і терапевтичного застосування.

Композиції, що містять АЗМ, пропонувану в даному винаході, можна приготувати, дозувати і вводити шляхами, відповідними належної клінічної практики. Фактори, які слід враховувати в цьому контексті, включають конкретне захворювання або порушення, яке підлягає лікуванню, конкретного ссавця, що підлягає лікуванню, клінічний стан індивідуального пацієнта, перебіг хвороби або порушення, ділянку введення агента, метод введення, схему застосування та інші фактори, відомі практикуючим фахівцям-медикам. Терапевтично ефективна кількість антагоністу, що підлягає введенню, має визначатися цими факторами.

Вироби

Наступним варіантом здійснення винаходу є виріб, який містить продукти, що застосовуються для лікування, попередження та / або діагностування зазначених вище порушень. Виріб являє собою контейнер і етикетку або листівку-вкладиш в упаковку, які розміщені на контейнері або включені до нього. Прийнятними контейнерами є, наприклад банки, бульбашки, шприци, пакети для внутрішньовенного розчину і т.д. Контейнери можна виготовляти з різних матеріалів, таких як скло або пластмаса. Контейнер містить композицію, яка сама або в поєднанні з іншого композицією є ефективною для лікування, попередження та / або діагностування стану, і може мати стерильний порт доступу (наприклад, контейнер може являти собою пакет для внутрішньовенного розчину або пухирець, забезпечений пробкою, яку можна проколювати за допомогою голки для підшкірних ін'єкцій). Щонайменше одна діюча речовина в композиції являє собою антитіло, пропонуване у винаході. На етикетці або листівці-вкладиші в упаковці вказано, що композицію застосовують для лікування вибраного стану. Крім того, виріб може включати (а) перший контейнер з розташованою в ній композицією, де композиція містить антитіло, пропонуване у винаході; і (б) другий контейнер з розташованою в ній композицією, де композиція містить додатковий цитотоксичний чи інший терапевтичний засіб. Згідно з цим варіантом здійснення винаходу виріб може містити листівку-вкладиш в упаковці, яка містить інформацію про те, що композиції можна використовувати для лікування конкретного стану. В альтернативному або додатковому варіанті виріб може додатково включати другий (або третій) контейнер з фармацевтично прийнятним буфером, таким як бактеріостатична вода для ін'єкцій (БСВІ), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера і розчин декстрази. Крім того, він може включати інші продукти, необхідні з комерційної точки зору і з точки зору споживача, зокрема, інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки та шприци.

Як має бути очевидно, будь-який із зазначених вище виробів може включати імунокон'югат, запропонований у винаході, замість або на додаток до анти - СЕА АЗМ.

Нижче винахід проілюстровано більш докладно за допомогою прикладів. Наведені нижче препарати і приклади дані для того, щоб даний винахід став більш зрозумілим фахівцям у даній галузі, і щоб вони могли здійснити його практичне здійснення. Однак наведені в якості прикладів варіанти здійснення даного винаходу не обмежують його обсяг, вони наведені тільки з метою ілюстрації деяких об'єктів винаходу і функціонально еквівалентних способів, що заявляються у винаході. Різні модифікації винаходу, крім наведених у цьому описі, мають стати очевидними фахівцям в даній галузі після ознайомлення з наведеним вище описом і прикладеними до нього

кресленнями. Такі модифікації підпадають під обсяг прикладеної формули винаходу.

Приклади

Якщо не вказано інше, то в наведених нижче прикладах нумерація положень конкретних амінокислотних залишків дана згідно системи нумерації Кебота.

5 Приклад 1

Створення бібліотек для дозрівання афінності

H1/H2-бібліотека

Для створення бібліотеки для дозрівання афінності, рандомізованої в HCDR1-і HCDR2-ділянки, триплети, що кодують положення F32, G33 в CDR1 і положення W50, N52, T52a, K52b, T54, E56, T58 в CDR2, рандомізували. На першій стадії ДНК-фрагмент (фрагмент 1) ампліфікували, використовуючи rMS22 як матриці, і застосовуючи праймери MS-43 (SEQ ID NO: 123) і EAB-679 (SEQ ID NO: 127), які включали рандомізовані положення CDR1 (фіг. 11). За допомогою цієї ж матриці з використанням праймерів MS-56 (SEQ ID NO: 126) і MS-52 (SEQ ID NO: 124) ампліфікували другий фрагмент (фрагмент 2), який мав ділянку, що перекриває 3'-кінець фрагмента 1. Умови ампліфікації включали початкову стадію інкубації протягом 5 хв при 94 °C, з наступним здійсненням 25 циклів, кожен з яких включав денатурацію протягом 1 хв при 94 °C, отжиг протягом 1 хв при 55 °C і стадію подовження тривалістю 20 с і 50 с при 72 °C для фрагмента 1 і фрагмента 2 відповідно. Наприкінці здійснювали кінцеву стадію інкубації протягом 10 хв при 72 °C. Обидва фрагмента очищали на агарозному гелі. За допомогою ПЛР на основі подовжуваних сегментів що перекриваються з використанням фрагментів 1 і 2 та праймерів MS-43 (SEQ ID NO: 123) і EAB-680 (SEQ ID NO: 128), які включали рандомізовані положення CDR2, отримували фрагмент, в якому обидва CDR були рандомізовані (фрагмент 3). Для збирання фрагментів 1 і 2 використовували еквімолярні кількості фрагмента 1 і фрагмента 2. Умови ампліфікації включали початкову стадію інкубації протягом 5 хв при 94 °C, з наступним здійсненням 5 циклів без праймерів, кожен цикл включав денатурацію протягом 1 хв при 94 °C, отжиг протягом 1 хв при 55 °C і стадію подовження тривалістю 40 с при 72 °C. Після додаткового введення зовнішніх праймерів здійснювали 20 додаткових циклів з використанням таких же параметрів. Четвертий фрагмент (фрагмент 4), який перекривав 3'-ділянку фрагмента 3, отримували за допомогою ПЛР-ампліфікації з використанням знову rMS22 як матриці і праймерів MS-55 (SEQ ID NO: 125) і MS-52 (SEQ ID NO: 124). Після очищення на гелі за допомогою кінцевої ПЛР на основі таких, що перекриваються подовжуваних сегментів, з використанням фрагментів 3 і 4 в якості матриць і праймерів MS-43 і MS-52 отримували фрагмент, що містить CL і ділянки VH. Для цієї мети використовували еквімолярні кількості фрагмента 3 і фрагмента 4. Умови ампліфікації включали початкову стадію інкубації протягом 5 хв при 94 °C, з наступним здійсненням 5 циклів без праймерів, кожен цикл включав денатурацію протягом 1 хв при 94 °C, отжиг протягом 1 хв при 55 °C і стадію подовження тривалістю 80 с при 72 °C. Після додавання зовнішніх праймерів здійснювали 20 додаткових циклів з використанням таких же параметрів. Потім отриманий фрагмент очищали на гелі і вбудовували шляхом лігування в rMS22 після розщеплення за допомогою NcoI/NheI.

40 L1/L2-бібліотека

Для створення бібліотеки для дозрівання афінності, рандомізованої в LCDR1-і LCDR2-ділянки, триплети, що кодують положення Q27, N28, V29, G30 T31 N32 в CDR1 і положення Y49, S50, Y53, R54, Y55, S56 в CDR2, рандомізували. На першій стадії ДНК-фрагмент (фрагмент 1) ампліфікували, використовуючи rMS22 як матриці, і застосовуючи праймери EAB-685 (SEQ ID NO: 129) і EAB-681 (SEQ ID NO: 123), які включали рандомізовані положення CDR1 (фіг. 12). З використанням цієї ж матриці, праймерів EAB-686 (SEQ ID NO: 130) і EAB-687 (SEQ ID NO: 131) ампліфікували другий фрагмент (фрагмент 2), який мав ділянку, що перекриває 3'-кінець фрагмента 1. Умови ампліфікації включали початкову стадію інкубації протягом 5 хв при 94 °C, з наступним здійсненням 25 циклів, кожен з яких включав денатурацію протягом 1 хв при 94 °C, отжиг протягом 1 хв при 55 °C і стадію подовження тривалістю 60 с при 72 °C для фрагмента 1 і фрагмента 2 відповідно. Наприкінці здійснювали кінцеву стадію інкубації протягом 10 хв при 72 °C. Обидва фрагмента очищали на агарозному гелі. За допомогою ПЛР на основі подовжуваних сегментів що перекриваються з використанням фрагментів 1 і 2 та праймерів EAB-685 (SEQ ID NO: 129) і EAB-682 (SEQ ID NO: 134), які включали рандомізовані положення CDR2, отримували фрагмент, в якому були рандомізовані обидва CDR (фрагмент 3). Для збирання фрагментів 1 і 2 використовували еквімолярні кількості фрагмента 1 і фрагмента 2. Умови ампліфікації включали початкову стадію інкубації протягом 5 хв при 94 °C, з наступним здійсненням 5 циклів без праймерів, кожен цикл включав денатурацію протягом 1 хв при 94 °C, отжиг протягом 1 хв при 55 °C і стадію подовження тривалістю 60 с при 72 °C. Після додаткового введення зовнішніх праймерів здійснювали 20 додаткових циклів з використанням

таких же параметрів. Четвертий фрагмент (фрагмент 4), який перекривав 3'-ділянку фрагмента 3, отримували за допомогою ПЛР-ампліфікації з використанням знову рMS22 як матриці і праймерів EAB-688 (SEQ ID NO: 132) і EAB-687 (SEQ ID NO: 131). Після очищення на гелі за допомогою кінцевої ПЛР на основі подовжуючих сегментів що перекриваються з використанням фрагментів 3 і 4 в якості матриць і праймерів EAB-685 (SEQ ID NO: 129) і EAB-687 (SEQ ID NO: 131) отримували фрагмент, що містить VL і ділянки CL. Для цієї мети використовували еквімолярні кількості фрагмента 3 і фрагмента 4. Умови ампліфікації включали початкову стадію інкубації протягом 5 хв при 94 °C, з наступним здійсненням 5 циклів без праймерів, кожен цикл включав денатурацію протягом 1 хв при 94 °C, отжиг протягом 1 хв при 55 °C і стадію подовження тривалістю 80 с при 72 °C. Після додавання зовнішніх праймерів здійснювали 20 додаткових циклів з використанням таких же параметрів. Потім отриманий фрагмент вбудовували шляхом лігування в рMS22 після розщеплення за допомогою HindIII/SacI.

НЗ-бібліотеки

Для створення бібліотек для дозрівання афінності, рандомізованих в HCDR3-ділянки, триплети, що кодують положення W95, D96, F97, Y98, D99, Y100, V100a, E100b, A100c і M100d, рандомізували з використанням двох різних підходів: (1) рандомізація повного сегмента (повна НЗ-бібліотека) або (2) індивідуальна рандомізація кожного положення, що призводило до одержання десяти підбібліотек. Підбібліотеки, які містять клони з індивідуально рандомізованими положеннями, об'єднували після трансформації ними бактерій (об'єднана НЗ-бібліотека). Для рандомізації HCDR3-ділянки фрагменти ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням праймерів, які гібридизувалися з 3'-кінцем CL, і праймерів, які несли рандомізовані послідовності HCDR3 (фіг. 13). Потім здійснювали ПЛР на основі сегментів подовжуючих що перекриваються з використанням другого фрагмента, який перекривав 3'-кінець фрагмента 1 і містив кінець VH і 5'-ділянку CH1. Потім фрагменти, отримані в результаті збірки, вбудовували шляхом лігування в рMS22 після розщеплення за допомогою SacI/NheI. Для створення об'єднаної НЗ-бібліотеки десять ДНК-фрагментів індивідуально ампліфікували за допомогою ПЛР, використовуючи праймери AC7-AC16 (SEQ ID NO: 135; SEQ ID NO: 144) у поєднанні з праймером EAB-749 (SEQ ID NO: 146). Для створення порожнистої L3-бібліотеки застосовували праймери AC17 (SEQ ID NO: 145) і EAB-749 (SEQ ID NO: 146). Плазмиду рMS22 застосовували як матриці. Умови ампліфікації включали початкову стадію інкубації протягом 5 хв при 94 °C, з наступним здійсненням 25 циклів, кожен з яких включав денатурацію протягом 1 хв при 94 °C, отжиг протягом 1 хв при 55 °C і стадію подовження тривалістю 36 с при 72 °C з подальшим кінцевою стадією інкубації протягом 10 хв при 72 °C. Це дозволяло отримувати фрагменти довжиною приблизно 580 пар основ, які очищали на агарозному гелі. При здійсненні ПЛР на основі подовжуючих сегментів що перекриваються другий фрагмент ампліфікували, використовуючи або праймер EAB-750 (SEQ ID NO: 147), або праймер EAB-751 (SEQ ID NO: 148) у поєднанні з EAB-752 (SEQ ID NO: 149). У той час як праймер EAB-750 (SEQ ID NO: 147) мав послідовність яка перекриває з рандомізованими праймерами AC7-11 (SEQ ID NO: 139), праймер EAB-751 (SEQ ID NO: 148) характеризувався гомологією з рандомізованими праймерами AC12-17 (SEQ ID NO: 140-145). Умови ампліфікації включали початкову стадію інкубації протягом 5 хв при 94 °C, з наступним здійсненням 25 циклів, кожен з яких включав денатурацію протягом 1 хв при 94 °C, отжиг протягом 1 хв при 55 °C і стадію подовження тривалістю 12 с при 72 °C з подальшою кінцевою стадією інкубації протягом 10 хв при 72 °C. Утворені фрагменти склалися приблизно з 180 пар основ. Для складання обох фрагментів використовували еквімолярні кількості фрагмента 1 та відповідного фрагмента 2. Умови ампліфікації включали початкову стадію інкубації протягом 5 хв при 94 °C, з наступним здійсненням 5 циклів без використання праймерів, кожен з яких включав денатурацію протягом 1 хв при 94 °C, отжиг протягом 1 хв при 55 °C і стадію подовження тривалістю 60 с при 72 °C. Після додавання зовнішніх праймерів EAB-749 (SEQ ID NO: 146) і EAB-752 (SEQ ID NO: 149) здійснювали 20 додаткових циклів з використанням таких же параметрів. І, нарешті, здійснювали кінцеву стадію інкубації протягом 10 хв при 72 °C. Потім очищені на гелі фрагменти вбудовували шляхом лігування в рMS22 після розщеплення за допомогою SacI / NheI і очищеними продуктами лігування трансформували шляхом електропорації бактерії штаму TG1.

L3-бібліотеки

Для створення бібліотек для дозрівання афінності, рандомізованих в CDR3-ділянки легкого ланцюга, триплети, що кодують положення Y91, Y92, T93, Y94 і L95a, рандомізували або шляхом рандомізації всього сегменту (повна L3-бібліотека), або індивідуально з отриманням п'яти підбібліотек. Підбібліотеки, які містять клони з індивідуально рандомізованими положеннями, об'єднували після трансформації ними бактерій (об'єднана L3-бібліотека). Для створення п'яти підбібліотек п'ять ДНК-фрагментів ампліфікували за допомогою ПЛР,

використовуючи кожен з праймерів AC1-AC5 (SEQ ID NO: 150-154) у поєднанні з праймером MS43 (SEQ ID NO: 123). Для створення повної L3-бібліотеки використовували комбінацію праймерів AC6 (SEQ ID NO: 125) і MS43 (SEQ ID NO: 123) (фіг.14). Плазмиду pMS22 застосовували в якості матриці. Умови ампліфікації включали початкову стадію інкубації протягом 5 хв при 94 °C, з наступним здійсненням 25 циклів, кожен з яких включав денатурацію протягом 1 хв при 94 °C, отжиг протягом 1 хв при 55 °C і стадію подовження тривалістю 25 с при 72 °C з подальшою кінцевою стадією інкубації протягом 10 хв при 72 °C. Отримані фрагменти, які містили послідовність, що простирається від положення 1 до положення 104 VL-ділянки, очищали на агарозному гелі і застосовували в якості матриці для додаткової ПЛР-ампліфікації. Всі реакції здійснювали з використанням праймера EAB-746 (SEQ ID NO: 156), який мав перекриваючу послідовність з рандомізованими праймерами і MS43 (SEQ ID NO: 123), використовуючи такі ж умови, що і вищеописані. Очищені фрагменти, а також pMS22 розщеплювали за допомогою NcoI / XhoI. Для всіх п'яти підбібліотек по 0,5 мкг вставки вбудовували шляхом лігування в pAC16 масою 0,5 мкг. Для отримання повної L3-бібліотеки для лігування використовували 9,8 мкг вставки і 9,8 мкг pMS22. Очищеними продуктами лігування трансформували шляхом електропорації бактерії штаму TG1.

Створення антигенів

Оскільки як мишаче, так і гуманізоване антитіло PR1A3 розпізнає тільки пов'язаний з мембраною, а не що знаходиться в розчинній формі людський CEA, створювали рекомбінантний химерний білок, який містить епітоп, що розпізнається PR1A3, для дозрівання афінності *in vitro* гуманізованого антитіла PR1A3 (SEQ ID NO: 7 і 8). Створення зазначеного гібридного білку здійснювали згідно з методом, описаному у Steward та ін., 1999. В цілому, метод полягав у наступному: ДНК-послідовність В-домену людського біліарного глікопротеїну (BGP) замінювали на послідовність людського В3-домену CEA, який містив епітоп, що розпізнається PR1A3. В результаті отримували послідовність, що кодує гібридний білок, який містив N-і A1-домени BGP, В3-домен CEA і A2-домен BGP (N-A1-B3-A2, huNABA). Потім цей злитий продукт або пов'язували з Fc-ділянкою людського IgG1 (huNABA-Fc) (Steward та ін., Cancer Immunol Immunother, 47, 1999, сс. 299-306), або зливали з послідовністю, яка кодує точний сайт розщеплення протеазою, аві-мітку і (His) 6-мітку (huNABA-avi-his) (SEQ ID NO: 158). Конструкцію huNABA-Fc очищали з супернатанта стабільно трансфектованої клітинної лінії CHO, використовуючи колонку з білком А. Конструкцією huNABA-avi-his (SEQ ID NO: 158) короткочасно трансфектували клітини лінії HEK 293, стабільно експресуючі виведений з EBV білок EBNA. Одночасно здійснювали котрансфекцію плазмідом, яка кодує біотинлігазу, яка дозволяла здійснювати специфічне для аві-мітки біотинілювання *in vivo*. Потім білок очищали за допомогою афінної хроматографії з імобілізованими металами (IMAX) з подальшою гель-фільтрацією.

Дозрівання афінності гуманізованих PR1A3

Створення гуманізованих з дозрілою афінністю Fab-фрагментів PR1A3 здійснювали за допомогою фагового дисплея з використанням стандартних протоколів (Silacci та ін, Proteomics, 5 (9), 2005, сс. 2340-2350). Селекцію всіх бібліотек для дозрівання афінності здійснювали в розчині згідно з наступною процедурою: 1) зв'язування $\sim 10^{12}$ фагмідних частинок з кожної бібліотеки для дозрівання афінності з 100нм біотинілювання комплексом huNABA-avi-his протягом 0,5 год. в загальному обсязі 1 мл, 2) імобілізація біотинілюваного huNABA-avi-his і специфічно пов'язаних фагових частинок шляхом додавання $5,4 \times 10^7$ покритих стрептавідином магнітних гранул протягом 10 хв: 3) відмивання гранул з використанням 5-10 \times 1 мл 3ФР/Твін20 і 5-10 \times 1 мл 3ФР; 4) елюювання фагових частинок шляхом додавання 1 мл 100мм ТЕА (триетиламін) протягом 10 хв і нейтралізація шляхом додавання 500 мкл 1М Tris / HCl pH 7,4 і 5) повторне зараження бактерій які перебувають на експоненційній фазі росту E. coli TG1, зараження фагом-хелпером VCSM13 і потім осадження за допомогою ПЕГ / NaCl фагмідних частинок, призначених для застосування у наступних циклах селекції. Селекції здійснювали з використанням близько 3-5 циклів із застосуванням або постійних, або концентрацій антигену що знижуються (від 10-7М до 2×10^{-9} М). На стадії 2 (імобілізація антигену): здійснювали отримання яке містить фаг комплексу, використовуючи покриття нейтравідином планшети замість стрептавідинів гранул. Специфічні пов'язують агенти ідентифікували за допомогою ELISA таким чином: 100 мкл 10нм біотинілюваного huNABA-avi-his на лунку використовували для сенсibilізації покритих нейтравідином планшетів. Додавали бактеріальні супернатанти які містять Fab і зв'язування Fab-фрагментів виявляли за допомогою їх Flag-міток, використовуючи як вторинного антитіла антитіло до Flag / HRP. Позитивні за даними ELISA клони експресували в бактеріях у вигляді розчинних Fab-фрагментів у 96-лунковому форматі і супернатанти піддавали скринінгу щодо кінетичних характеристик з використанням пристрою BIACORE T100.

Ідентифікували клони, які експресують Fab-фрагменти, зв'язування яких характеризувалося найбільш високими константами афінності, і відповідні фагміди секвенували.

Очищення Fab-фрагментів і визначення кінетичних параметрів

Для точного аналізу кінетичних параметрів Fab-фрагменти очищали від бактеріальних культур. 500 мл культури інокулювали і індукували за допомогою 1мМ ІПТГ (ізопропілтіогалактозил) при ОП600, що становить 0,9. Бактерії інкубували при 25 °С протягом ночі і збирали шляхом центрифугування. Після інкубації ресуспендованого дебриса протягом 20 хв в 25 мл РРВ-буфера (30мм Тріс-НСІ рН, 8, 1М ЕДТК, 20 % сахарози) бактерії знову центрифугували і супернатант збирали. Вказану стадію інкубації повторювали ще один раз з використанням 25 мл 5мм розчину MgSO₄. Супернатанти, отримані після обох стадій інкубації, об'єднували, фільтрували і вносили в колонку для ІМАХ (His gravitrap, фірма GE Healthcare). Потім колонку відмивали, використовуючи обсяг, відповідний 40 обсягам колонки. Після елювання (500мм NaCl, 500мм імідазол, 20мм NaH₂PO₄, рН 7,4) елюат повторно забуферювали, використовуючи PD10-колонки (фірма GE Healthcare). Потім кінетичні параметри очищених Fab-фрагментів вивчали за допомогою SPR-аналізу, застосовуючи ряд розведень від 200 до 6,25нМ.

Приклад 2

Антитіло PR1A3 перетворювали на химерне антитіло, що містить константну ділянку каппа-ланцюга людського IgG1 (IgG1/каппа), і експресували, використовуючи технологію GylcoMab, таким чином, щоб воно мало високий рівень афукозильованих цукрів у Fc-ділянки. Здійснювали порівняння створених за допомогою глікоінженерії і таких, які не піддавалися глікоінженерії антитіл при співвідношенні ефекторних клітин і клітин-мішеней 25:1. Максимальний рівень антитіло-обумовленого знищення клітин-мішеней виявився в 2 рази вищим при використанні антитіл із створеною за допомогою глікоінженерії Fc-ділянкою (фіг. 2). Ще більш високий рівень знищення клітин був досягнутий при підвищенні співвідношення ефекторних клітин і клітин-мішеней (фіг. 2).

PR1A3 гуманізували, використовуючи каркасні ділянки, ідентичні послідовностям людської зародків лінії. Послідовність з бази даних IMGT (IMGT-послідовність) IGHV7-4-1 * 02 (реєстраційний № X62110) застосовували в якості акцептора для гуманізованого VH, а IMGT-послідовність hVK_1_39 (реєстраційний №. X59315) застосовували в якості акцептора для гуманізації VL. У гуманізованого антитіла PR1A3, яке містить конструкцію CH7A варіабельної ділянки важкого ланцюга і конструкцію CL1A варіабельної ділянки легкого ланцюга, виявлено задовільне зв'язування з клітинами людської карциноми ободової кишки за даними аналізу методом проточної цитометрії (фіг. 3).

Для дозрівання афінності PR1A3 за допомогою фагового дисплея застосовували стандартні протоколи, докладно описані в прикладі 1, вище. Батьківське гуманізоване антитіло PR1A3, яке застосовували для дозрівання афінності, містило конструкцію CH7A варіабельної ділянки важкого ланцюга і конструкцію CL1A варіабельної ділянки легкого ланцюга. Нижче в таблицях 3-6 представлені бібліотеки, які застосовували для дозрівання афінності. У L1/L2-бібліотеці валін в положенні 29, аланін в положенні 50 або серин в положенні 51 в CDR-ділянках зберігали без зміни. У H1/H2-бібліотеці ізолейцин в положенні 51, гліцин в положенні 55 або аланін в положенні 57 в CDR-ділянках зберігали без зміни (фіг. 4 і фіг. 5).

Конструкцію CH7A rF9 варіабельної ділянки важкого ланцюга з дозрілою афінністю і конструкцію CL1A rH11 варіабельної ділянки легкого ланцюга з дозрілою афінністю спарювали з конструкцією батьківської варіабельної ділянки легкого ланцюга і конструкцією батьківської варіабельної ділянки важкого ланцюга відповідно і один з одним. Всі антитіла перетворювали на формат людського IgG1/каппа і зв'язування з СЕА-позитивними клітинами лінії MKN45 оцінювали за допомогою проточної цитометрії. Антитіла, які містять будь-яку одну з варіабельних ділянок важкого або легкого ланцюга з дозрілою афінністю або обидві варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюга з дозрілою афінністю, мали поліпшені характеристиками зв'язування в порівнянні з гуманізованим батьківським антитілом (фіг. 6). На фіг. 6, 10 і 15 представлено декілька прикладів щодо індивідуального внеску від зрілих легень і важких ланцюгів у підвищення афінності. Для батьківського антитіла CH7A CL1A виявлена найнижча інтенсивність сигналу, а також найвище значення EC50, що продемонстровано на фіг. 6 і фіг. 15. При застосуванні зрілих легких ланцюгів виявлений зсув значень EC50 у бік їх зниження, а при застосуванні зрілих важких ланцюгів (rF9 на фіг. 6 і rB9 на фіг. 15) виявлений зсув повної інтенсивності сигналу флуоресценції при оцінці за допомогою проточної цитометрії. На фіг. 10 представлені дані про індивідуальний внесок від важких і легких ланцюгів, для оцінки якого застосовували Віасоге-аналіз. При застосуванні комбінації двох зазначених ланцюгів виявлено ще більше збільшення афінності. Крім того, як продемонстровано на фіг. 16, підвищення

афінності призводить до поліпшення характеристик ADCC.

Дані про афінність зв'язування CDR важких і легких ланцюгів з дозрілою афінністю, яку визначали за допомогою Біасоге-аналізу, представлені на фіг. 34А і Б.

На фіг. 35 узагальнені дані про константи афінності різних послідовностей антитіл із дозрілою афінністю. Представлені дані для батьківського антитіла PR1A3, а також для декількох комбінацій важких і легких ланцюгів, що мають зрілі і незрілі послідовності. Всі дані отримували за допомогою Біасоге-аналізу, визначаючи значення константи швидкості реакції асоціації (k_{on}) і дисоціації (k_{off}) різних розчинних конструкцій антитіл в Fab-форматі на Біасоге-чіпі, на якому був іммобілізований реагент NABA-avi-his (SEQ ID NO: 158) в якості антигену. Константа афінності позначена як KD.

Приклад 3

Акцепторна каркасна ділянка, яку застосовували для створення антитіл до CEA з дозрілою афінністю, описаних у прикладі 2, належала до людського VH7-класу. Для підвищення стабільності більш стабільна акцепторна каркасна ділянка, застосовували в якості основи для створення стабільності у антитіла. Ґрунтуючись на гомології послідовностей мишачого антитіла PR1A3 і гіпотези про те, що виведені з VH1 послідовності повинні мати більш високу притаманну їм стабільність, ніж VH7, або навіть ніж різні представники людських VH-кланів (Ewert S., Huber T., Honegger A. і Plückthun A., J. Mol. Biol., 325, 2003, сс. 531-553), послідовність IGHV-1-18 (реєстраційний № M99641) застосовували в якості нової акцепторної каркасної ділянки. Шляхом трансплантації канонічної петлі CDR в антитіло PR1A3 отримували конструкцію CH1A (SEQ ID NO: 279). На жаль, у цієї молекули не знайдена виражена активність зв'язування з антигеном CEA. Активність зв'язування цієї конструкції була порівнянна з активністю зв'язування химерного антитіла PR1A3, несучого виведені з мишачого антитіла варіабельні домени в різних концентраціях. ВхРС3-клітини застосовували для специфічного зв'язування антитіл із CEA та інтенсивність зв'язування оцінювали за допомогою FACS-аналізу (фіг. 17).

Для відновлення афінності зв'язування інтродуковані кілька зворотних мутацій в послідовність CH1A, створюючи нові важкі ланцюги CH1A1 (SEQ ID NO: 257), CH1A2 (SEQ ID NO: 258), CH1A3 (SEQ ID NO: 259) і CH1A4 (SEQ ID NO: 260). CH1A1 включала подвійну точкову мутацію M69F/T71L. У трьох останніх варіантах повні каркасні ділянки 1, 2 або 3 відповідно замінювали на мишачу копію. На фіг. 18 представлені дані про зв'язуванні зазначених конструкцій після їх об'єднання з легким ланцюгом 2F1 (SEQ ID NO: 209). У цьому досліді по клітинному зв'язуванню аналізували зв'язування варіантів антитіла на основі CH1A в різних концентраціях з експресуючими CEA клітинами лінії MKN-45. Легкий ланцюг з дозрілою афінністю 2F1 був ідентичним у всіх досліджуваних антитілах за винятком батьківського антитіла, яке містило вихідний легкий ланцюг CL1A. Середню інтенсивність флуоресценції визначали за допомогою FACS-аналізу. На фіг. 19 представлені дані про стабільність тих же зразків конструкцій, спарених з легким ланцюгом 2F1, оцінених методом динамічного розсіювання світла (ДРС). ДРС-аналіз здійснювали, використовуючи 1 мг / мл антитіл в буфері, що містить 20мм гістидин і 140мм NaCl, pH 6,0. Аналіз проводили, починаючи з 25 °C, підвищуючи температуру зі швидкістю 0,05 °C / хв аж до 70 °C. Всі досліджувані за допомогою цього аналізу антитіла включали 2F1 в якості легкого ланцюга.

Оскільки конструкція CH1A1 досі зберігала вихідну стабільність, а також мала виражене (проте дещо нижче порівняно з конструкцією CH1A4, яка мала найбільш високу афінність, але найнижчу стабільність) зв'язування, цю конструкцію відбирали для додаткової оптимізації зв'язування. Створювали нові важкі ланцюги CH1A1A (SEQ ID NO: 261), CH1A1B (SEQ ID NO: 262), CH1A1C (SEQ ID NO: 263), CH1A1D (SEQ ID NO: 264), CH1A1E (SEQ ID NO: 265), CH1A1F (SEQ ID NO: 266) і CH1A1G (SEQ ID NO: 267). Вони всі практично були варіантами CH1A1 лише з невеликими зворотними мутаціями в FR1-і FR3-ділянці. На фіг. 20 і 21 представлені дані про те, що їх афінності є порівнянними, хоча все ще кілька більш низькими в порівнянні з гуманізованого конструкцією на основі VH7 CH7A. На фіг. 20 представлені отримані за допомогою системи Proteon (призначеної для аналізу взаємодії білків) (фірма Biacore) сенсограмми, що характеризують зв'язування варіантів каркасних ділянок на основі CH1A1 з химерним білком, який несе антиген CEA NABA. Біотинільований NABA іммобілізували на покритому нейтравідином чіпі і антитіла в концентраціях 100, 50, 25, 12,5, 6,25 і 0нМ застосовували в якості аналізованих субстанцій. Клон-попередник CH1A1 і батьківське антитіло CH7A включали для прямого порівняння. Всі досліджувані за допомогою цього аналізу антитіла включали 2F1 в якості легкого ланцюга. На фіг. 21 представлені дані про інтенсивності зв'язування семи варіантів на основі CH1A1, які несуть додаткові мутації в каркасній ділянці. Антитіла інкубували з експресуючими CEA клітинами лінії MKN45, використовуючи серії

концентрацій, і інтенсивність зв'язування визначали за допомогою FACS-аналізу. Клон-попередник CH1A1 включали для прямого порівняння. Всі досліджувані за допомогою цього аналізу антитіла включали 2F1 в якості легкого ланцюга. Варіанти CH1A1A і CH1A1B відбирали в якості остаточних варіантів для заснованої на VH1 гуманізації з урахуванням їх відносно більш

5 високих виходів при очищенні і мономерних характеристик.

Приклад 4

Залишки CDR-H3, відібрані в процесі дозрівання афінності, інтродуковані індивідуально в послідовність PR1A3 для оцінки стабільності антитіла, яка зросла (фіг. 36).

На фіг. 22 представлені результати, отримані за допомогою резонансу поверхневого
10 плазмону (SPR), вимірювання афінності (при оцінці в двовалентній формі) кожного антитіла до антигену CEA (реагент NABA, описаний у Stewart та ін., Cancer Immunol Immunother 47, 1999, сс. 299-306). На фіг. 22 представлені отримані за допомогою системи Proteon (фірма Biacore) сенсорами, що характеризують зв'язування CDR-H3 варіантів антитіл з химерним білком, що несе антиген CEA NABA. Біотинільований NABA іммобілізували на покритому нейтралідином
15 чипі і антитіла в концентраціях 100, 50, 25, 12,5, 6,25 і 0 нМ застосовували в якості аналізованих субстанцій. Клон-попередник з дозрілою афінністю 5HFF12 і батьківське антитіло CH7A включали для прямого порівняння. Всі досліджувані за допомогою цього аналізу антитіла несли 2F1 в якості легкого ланцюга. У цьому аналізі для варіанту CH7A (W95Y) не знайдена піддатлива виявленню активність, всі інші варіанти мали афінність до мішені, що відрізняється
20 один від одного в 10 разів. Відносні величини афінності кожного ланцюга при оцінці у вигляді двовалентної форми, розташовувалися в наступному порядку: 5HFF12 > CH7A (Y98A/D99Y) > CH7A (Y98A) > CH7A > CH7A (E102Q) > CH7A (D99Y) > CH7A (D99H) > CH7A (A103T) > CH7A (V101F) > CH7A (W95Y).

ДРС-аналіз антитіл здійснювали для порівняння з їх попередником 5HFF12 і батьківським
25 антитілом, що несе важкий ланцюг CH7A. Всі досліджувані в цьому експерименті антитіла включали 2F1 в якості легкого ланцюга (фіг. 23 і 24). Рівні стабільності, отримані за даними цього аналізу, розташовувалися в наступному порядку: CH7A (D99Y) > CH7A (Y98A/D99Y) > CH7A (V101F) > CH7A (D99H) > CH7A (A103T) > CH7A (W95Y) > CH7Ax2F1 (= PR1A3) > 5HFF12. ДРС-аналіз здійснювали, використовуючи 1 мг / мл антитіл в буфері, що містить 20 мМ гістидин і 140 мМ NaCl, рН 6,0. Аналіз проводили, починаючи з 25° С, підвищуючи температуру зі швидкістю 0,05 °С / хв аж до 70 °С. Подвійний мутант (Y98A/D99Y) (SEQ ID NO: 223) був
30 вибраний для додаткового створення стабільності, оскільки він відрізнявся високою стабільністю, зберігаючи при цьому високу афінність до мішені, тобто CEA.

Приклад 5

35 Подвійний мутант (Y98A/D99Y) гуманізованого похідного PR1A3 CH7A інтродуковані в кінцеві гуманізовані варіанти, отримані на основі VH1, тобто конструкції CH1A1A і CH1A1B.

За допомогою системи Proteon (фірма Biacore) отримували сенсограми, що характеризують зв'язування з несучим антиген CEA химерним білком NABA варіантів, в яких були об'єднані
40 каркасна ділянка і CDR-H3. Біотинільований NABA іммобілізували на покритому нейтралідином чипі і антитіла в концентраціях 100, 50, 25, 12,5, 6,25 і 0 нМ застосовували в якості аналізованих субстанцій. Клон-попередник 5L1A10 і батьківське антитіло CH7A включали для того, щоб можна було здійснювати пряме порівняння. Всі досліджувані за допомогою цього аналізу антитіла включали 2F1 в якості легкого ланцюга (фіг. 25).

Приклад 6

45 Конструкції CH1A1A і CH1A1B мали ADCC-активність. Оцінювали ADCC, опосередковувану варіантами CH1A1A і CH1A1B, їх варіантом-попередником CH1A1 і батьківським варіантом CH7A, через 4 год. по вивільненню лактатдегідрогенази, використовуючи MKN45-клітини як клітин-мішеней (Т) і людські РВМС в якості ефекторних клітин (Е) при співвідношенні Е: Т 25:1. Вивільнення лактатдегідрогенази пропорційно лізису клітин-мішеней і його виражали в вигляді
50 відсотка цитотоксичності. На фіг. 26 представлені дані, що підтверджують ADCC-активність цих варіантів, шляхом оцінки вивільнення кальцеїну при використанні MKN45-клітин в якості клітин-мішеней (Т) і людських РВМС в якості ефекторних клітин (Е) при співвідношенні Е: Т 25:1. Вивільнення кальцеїну пропорційно лізису клітин-мішеней і його виражали в вигляді відсотка цитотоксичності як середнє значення ± стандартне відхилення (фіг. 27).

55 ADCC-активність виявлена також для конструкцій CH1A1A і CH1A1B, містять CDRH3 з дозрілою афінністю з подвійною мутацією Y98A/D99Y. ADCC, опосередковувану варіантами, в яких були об'єднані каркасна ділянка і CDR-H3, і батьківським антитілом, що несе CH7A, вимірювали через 24 год. по вивільненню лактатдегідрогенази, використовуючи MKN45-клітини (фіг. 28) або LS174Т-клітини (фіг. 29) в якості клітин-мішеней і людські РВМС в якості
60 ефекторних клітин при співвідношенні t Е: Т 5:1. У той час для клітин лінії MKN45 характерні

високі рівні експресії CEA, рівень експресії CEA в LS174T-клітинах був помірним. Вивільнення лактатдегідрогенази пропорційно лізису клітин-мішеней і його виражали в вигляді відсотка цитотоксичності. Всі антитіла, тестовані в цих аналізах ADCC, мали 2F1 в якості легкого ланцюга.

На фіг. 38 представлені результати порівняльного аналізу первинної структури послідовностей VH-ділянок різних антитіл до CEA з "дозрілою" стабільністю.

Приклад 7

Ефективність створеного за допомогою глікоінженерії антитіла до CEA, яке містить важкий ланцюг CH1A1A (98/99) і легкий ланцюг 2F1, тестували на моделі ксенотрансплантату колоректальної карциноми, створеної на SCID-мишах, трансгенних за людським CD16. Умови аналізу з використанням зазначеної моделі представлені нижче. Результат аналізу демонструє, що антитіло до CEA забезпечує перевагу з позицій виживання порівняно із застосовуваним в якості контролю наповнювачем (фіг. 30).

Тварини: Трансгенних самок CD16-Scid-мишей (фірма Charles River, Франція), вік яких на початку експерименту становив 7-9 тижнів, утримували в специфічних умовах без патогенів з добовими циклами 12 год. світла/12 год. темряви відповідно до затверджених посібників (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол експериментального дослідження був розглянутий і схвалений місцевими органами управління. Після доставки тварин витримували один тиждень для акліматизації до нового оточення і для обстеження. Регулярно здійснювали моніторинг стану здоров'я.

Клітинна культура і обробка: Клітини лінії LS174T (клітини людської карциноми ободової кишки; Європейська колекція клітинних культур) культивували у середовищі DMEM, що містить 10 % FCS (фірма PAA Laboratories, Австрія). Клітини культивували при 37 °C в насиченій водяною парою атмосфері з 5 % CO₂. отриманий in vitro пасаж 24 застосовували для ін'єкції у селезінку, його життєздатність становила 97 %.

Ін'єкція пухлинних клітин: У день ін'єкції пухлинні клітини лінії LS174T збирали з колб для культури тканини (фірма Greiner Bio-One), використовуючи трипсин-ЕДТК (фірма Gibco, Швейцарія), і переносили у 50 мл культурального середовища, одноразово промивали і ресуспендували у середовищі AIM V (фірма Gibco, Швейцарія). Робили невеликий розріз у лівій черевній ділянці анестезованих мишей з синдромом важкого комбінованого імунodefіциту з природженою відсутністю природних клітин-кілерів (SCID / beige). Оголювали шкіру і м'яз і ін'єктували 30 мкл (3×10⁶ LS174T- клітин у середовищі AimV) клітинної суспензії у верхівку селезінки. Спочатку на м'яз, а потім на шкіру черевного відділу накладали шви за допомогою такого шовного матеріалу, що абсорбується (Monosyn ® 3-0, фірма Braun).

Обробка: Всі антитіла до CEA і відповідний наповнювач вводили iv один раз на тиждень. Кожній миші вводили у цілому три дози, використовуючи по 625 мкг антитіла на ін'єкцію. Використовували свіжо приготовані розведення антитіл з маткового розчину, отримані перед застосуванням, і їх вносили у буфері, що містить 20мМ гістидин, 140мМ NaCl, pH 6,0, використовуючи антитіло в концентрації 4,38 мг/мл.

Приклад 8

Ефективність створеного за допомогою глікоінженерії антитіла до CEA антитіло, яке містить важкий ланцюг CH1A1A (98/99) і легкий ланцюг 2F1, тестували на моделі ксенотрансплантату карциноми легені A549, створеної на SCID-мишах, трансгенних за людським CD16. Умови аналізу з використанням зазначеної моделі представлені нижче. Результат аналізу демонструє, що це антитіло до CEA залежно від дози забезпечує перевагу з позицій виживання порівняно із застосовуваним в якості контролю наповнювачем (фіг. 31).

Тварини: Тридцять п'ять трансгенних самок CD16-Scid-мишей, вік яких у початку експерименту становив 7-9 тижнів (фірма Charles River, Франція), утримували у специфічних умовах без патогенів з добовими циклами 12 год. світла/12 год. темряви відповідно до затверджених посібників (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол експериментального дослідження був розглянутий і схвалений місцевими органами управління. Після доставки тварин витримували один тиждень для акліматизації до нового оточення і для обстеження. Регулярно здійснювали моніторинг стану здоров'я.

Клітинна культура і обробка: Клітини лінії A549 (людські клітини NSCLC; Американська колекція тканинних культур) культивували у середовищі DMEM, що містить 10 % FCS (фірма PAA Laboratories, Австрія). Клітини культивували при 37 °C в насиченій водяною парою атмосфері з 5 % CO₂.

Обробка: Мишам ін'єктували i.v. у день досліді 0 за 1 × 10⁶ A549-клітин. Введення антитіла починали в день досліді 7 і потім здійснювали ще 2 щотижневі ін'єкції.

Групи обробки:

Миші: 35 мишей лінії SCID-CD16Tg, N=7 на групу.

Клітини: A549-клітини, 5 млн/миша.

Сполуки і схема лікування

Наповнювач, 3q7d.

5 CH1A1A(Y98A/D99Y) × 2F1 (500 мкг), 3q7d (25 мг/кг).

CH1A1A(Y98A/D99Y) × 2F1 (200 мкг), 3q7d (10 мг/кг).

CH1A1A(Y98A/D99Y) × 2F1 (100 мкг), 3q7d (5 мг/кг).

CH1A1A(Y98A/D99Y) × 2F1 (50 мкг), 3q7d (1 мг/кг).

10 Хоча вище винахід описано досить докладно за допомогою ілюстрацій і прикладів, наведених для цілей кращого розуміння, опис і приклади не повинні розглядатися як такі, що обмежують обсяг винаходу. Всі процитовані в даному описі патентні та наукові публікації повністю включені в нього як посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Роше Глікарт АГ

<120> Антитіла до СЕА

<130> 27344

<150> EP 11156665.9

<151> 2011-03-02

<160> 281

<170> PatentIn, версія 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга за Кеботом

<400> 1

Glu Phe Gly Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга за Кеботом

<400> 2

Glu Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга за Кеботом

<400> 3

Glu Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 4
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна ділянка важкого ланцюга

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> Xaa = Tyr або Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (33)..(33)
<223> Xaa = Ser або Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35)..(35)
<223> Xaa = Asn або Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(50)
<223> Xaa = Trp або Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (55)..(55)
<223> Xaa = Thr, Ser або Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (59)..(59)
<223> Xaa = Thr або Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (61)..(61)
<223> Xaa = Val або Met

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (101)..(101)

<223> Xaa = Phe a6o Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (102)..(102)

<223> Xaa = Val, Phe, Ser, Tyr a6o Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (103)..(103)

<223> Xaa = Asp, His, Trp, Glu a6o Tyr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (105)..(105)

<223> Xaa = Val, Phe a6o Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (106)..(106)

<223> Xaa = Glu, Lys a6o Gln

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (107)..(107)

<223> Xaa = Ala a6o Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (108)..(108)

<223> Xaa = Met a6o Leu

<400> 4

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Xaa
20 25 30

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

Gly Xaa Ile Asn Thr Lys Xaa Gly Glu Ala Xaa Tyr Xaa Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<223> CDR1 важкого ланцюга за Кеботом

<400> 5

Glu Phe Gly Met Ser
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR1 важкого ланцюга за Хотіа

<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
1 5

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR1 важкого ланцюга за Хотіа

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR1 важкого ланцюга за AbM

<400> 8

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe Gly Met Asn
1 5 10

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR1 важкого ланцюга за AbM

<400> 9

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR1 важкого ланцюга за AbM

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ser Met Asn
1 5 10

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна ділянка легкого ланцюга

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa = Gln, Ala, Lys або His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa = Asn, Ala, Tyr, Ile, Lys або Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa = Val, Ala, Gly або Met

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa = Gly, Ser, Thr або Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa = Thr, Asn, Pro або Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa = Asn або Tyr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (46)..(46)

<223> Xaa = Pro або Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(50)

<223> Xaa = Ser, Leu або Trp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (53)..(53)

<223> Xaa = Tyr, Asn або His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (54)..(54)

<223> Xaa = Arg, Leu, Pro або His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (55)..(55)

<223> Xaa = Tyr, Ser, Gln, Lys, Phe, Pro a6o Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (56)..(56)

<223> Xaa = Ser, Gly, Ile a6o Arg

<400> 11

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 Lys Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

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

Tyr Xaa Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга за AbM

<400> 12

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe Gly Met Ser

1 5 10

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 важкого ланцюга за Кеботом

<400> 13

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 важкого ланцюга за Кеботом

<400> 14

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Ile Glu Glu Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 важкого ланцюга за Кеботом

<400> 15

Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 важкого ланцюга за Кеботом

<400> 16

Tyr Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn Tyr Val Glu Glu Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 важкого ланцюга за Кеботом

<400> 17

Trp Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Thr Tyr Ile Glu Glu Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 важкого ланцюга за Хотіа

<400> 18

Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr

1 5

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 важкого ланцюга за Хотіа

<400> 19

Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr
 1 5

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 важкого ланцюга за Хотіа

<400> 20

Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn
 1 5

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 важкого ланцюга за AbM

<400> 21

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr
 1 5 10

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 важкого ланцюга за AbM

<400> 22

Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr
1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 важкого ланцюга за AbM

<400> 23

Tyr Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn
1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 важкого ланцюга за AbM

<400> 24

Trp Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Thr
1 5 10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 25

Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 26

Trp Asp Phe Tyr His Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 27

Trp Asp Phe Val Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 28

Trp Asp Phe Tyr Trp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 29

Trp Asp Ala Phe Glu Tyr Val Lys Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 30
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 30

Trp Asp Phe Phe Glu Tyr Phe Lys Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 31

Trp Asp Phe Phe Tyr Tyr Val Gln Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 32
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 32

Trp Asp Phe Ser Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 33
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 33

Trp Asp Phe Ala His Tyr Phe Gln Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 34

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Phe Gln Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 35

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Leu Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 36

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 37

Lys Ala Ser Ala Asn Val Gly Asn Asn Val Ala
1 5 10

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 38

Lys Ala Ser Lys Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 39

Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala
1 5 10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 40

Lys Ala Ser Gln Tyr Ala Ser Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 41

Lys Ala Ser His Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 42

Lys Ala Ser Gln Ile Met Gly Pro Asn Val Ala
1 5 10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 43

Lys Ala Ser Gln Ile Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 44

Lys Ala Ser Gln Lys Val Leu Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 45

Lys Ala Ser Gln Thr Val Ser Ala Asn Val Ala
1 5 10

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 46

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 47

Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ser Gly
1 5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 48

Tyr Leu Ala Ser Tyr Pro Gln Ile
1 5

<210> 49

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 49

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg
 1 5

<210> 50
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 50

Tyr Trp Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 1 5

<210> 51
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 51

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser
 1 5

<210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 52

Tyr Leu Ala Ser Tyr His Glu Ser

1 5

<210> 53
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 53

Tyr Ser Ala Ser His Arg Pro Ser
 1 5

<210> 54
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 54

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 1 5

<210> 55
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 55

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr Arg
 1 5

<210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR3 легкого ланцюга

<400> 56

His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr
1 5 10

<210> 57

<211> 30

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга

<400> 57

ggatacacct tcaactgagtt tggaatgaac 30

<210> 58

<211> 30

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга

<400> 58

ggatacacct tcaactgagta tggatatgaac 30

<210> 59

<211> 30

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга

<400> 59

ggatacacct tcaactgagta ttctatgaac 30

<210> 60

<400> 60

000

<210> 61

<211> 30

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга

<400> 61

ggatacacct tcaactgagtt tggaatgagc

30

<210> 62

<211> 51

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 важкого ланцюга

<400> 62

tggataaaca ccaaaactgg agaggcaaca tatgttgaag agtttaaggg a

51

<210> 63

<211> 51

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 важкого ланцюга

<400> 63

tggataaaca ccaaaactgg agaggcaaca tatattgaag agtttaaggg a

51

<210> 64

<211> 51

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 важкого ланцюга

<400> 64

tggataaaca ccaaaactgg agaggcaaca tatgttgaag agtttaaggg a

51

<210> 65

<211> 51

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 важкого ланцюга

<400> 65
tatataaaca ccaaaaaatgg agaggcaaac tatgttgaag agtttaaggg a 51

<210> 66
<211> 51
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 важкого ланцюга

<400> 66
tggataaaca ccaaaaaatgg agaggcaaca tatattgaag agtttaaggg a 51

<210> 67
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 67
tgggacttct atgattacgt ggaggctatg gactac 36

<210> 68
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 68
tgggacttct atcattacgt ggaggctatg gactac 36

<210> 69
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR3 важкого ланцюга

<400> 69
tgggacttcg tggattacgt ggaggctatg gactac 36

<210> 70
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

 <400> 70
 tgggacttct attggtacgt ggaggctatg gactac 36

 <210> 71
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

 <400> 71
 tgggacgcct ttgagtacgt gaaggcgctg gactac 36

 <210> 72
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

 <400> 72
 tgggatttct ttgagtattt taagactatg gactac 36

 <210> 73
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

 <400> 73
 tgggactttt tttattacgt gcagactatg gactac 36

 <210> 74
 <211> 36

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

 <400> 74
 tgggattttt cttattacgt tgaggcgatg gactac 36

 <210> 75
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

 <400> 75
 tgggactttg ctcattactt tcagactatg gactac 36

 <210> 76
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

 <400> 76
 tgggacttcg cttattactt tcagactatg gactac 36

 <210> 77
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга

 <400> 77
 tgggatttcg cgtattacct tgaggstatg gactac 36

 <210> 78
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>

<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 78

aaggccagtc agaatgtggg tactaatggt gcc

33

<210> 79

<211> 33

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 79

aaggccagtg ccaatgtggg taataatggt gcc

33

<210> 80

<211> 33

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 80

aaggccagta agaatgtggg gactaatggt gcg

33

<210> 81

<211> 33

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 81

aaggccagtg cggctgtggg tacgtatggt gcg

33

<210> 82

<211> 33

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 82

aaggccagtc agatagcgag tactaatggt gcc 33

<210> 83
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 83
 aaggccagtc acaatgtggg tassaacggt gcg 33

<210> 84
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 84
 aaggccagtc agattatggg tcctaaggt gcc 33

<210> 85
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 85
 aaggccagtc aaattgtggg tactaatggt gcg 33

<210> 86
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR1 легкого ланцюга

<400> 86
 aaggccagtc agaaggtgct tactaatggt gcg 33

<210> 87

<211> 33
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR1 легкого ланцюга

 <400> 87
 aaggccagtc agactgtgag tgctaattgtt gcg 33

 <210> 88
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR2 легкого ланцюга

 <400> 88
 tattcgcat cctaccgcta cagt 24

 <210> 89
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR2 легкого ланцюга

 <400> 89
 tatttggcct ccaacctctc cggc 24

 <210> 90
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR2 легкого ланцюга

 <400> 90
 tacctggcat cctacccccca gatt 24

 <210> 91
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

```

<220>
<223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 91
tattcggcat cctaccgcaa aagg 24

<210> 92
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 92
tattgggcat cctaccgcta tagt 24

<210> 93
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 93
tattcggcat cccaccggta cagt 24

<210> 94
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 94
tatttggcat cctaccacga aagt 24

<210> 95
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 легкого ланцюга

```

<400> 95
tattcggcatt cccaccgtcc cagt 24

<210> 96
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 96
tatttgccatt cctaccgcta cagt 24

<210> 97
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 легкого ланцюга

<400> 97
tatttgccatt cctaccgcta caga 24

<210> 98
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR3 легкого ланцюга

<400> 98
caccatattt acacccatcc tctattcacg 30

<210> 99
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> PR1A3 VH

<400> 99

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Lys Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 100

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> pEM1496 huPR1A3 VH

<400> 100

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 101

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH7A

<400> 101

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 102

<211> 98

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> IGHV7-4-1*02

<400> 102

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 103

<211> 110

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> PR1A3 VL

<400> 103

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 104

<211> 109

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> pEM1495 huPR1A3 VL

<400> 104

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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 105
<211> 108
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CL1A

<400> 105

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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 106

<211> 95

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> IMGT_hVK_1_39

<400> 106

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

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

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

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

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

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

<210> 107

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH7 rF9

<400> 107

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 108

<211> 110

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CLAl rH11

<400> 108

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 Lys Ala Ser Gln Thr Val Ser Ala Asn
20 25 30

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

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr Arg 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 109

<400> 109
000

<210> 110

<400> 110
000

<210> 111

<211> 363

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> PR1A3 VH

<400> 111

caggtgaagc tgcagcagtc aggacctgag ttgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60

tcctgcaagg cttctggata taccttcaca gaattcggaa tgaactgggt gaagcaggct 120

cctggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgccctc tctttggaga cctctgccac cactgcctat 240

ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctaaat atttctgtgc tcgatgggat 300

ttctatgact atgttgaagc tatggactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360

tca 363

<210> 112

<211> 362

```

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pEM1496

<400> 112
caggtgcagc tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagttggaat gaactgggtg cgacaggccc 120
ctggacaagg gcttgagtgg atgggatgga taaacaccaa aactggagag gcaacatatg 180
ttgaagagtt taagggacgg tttgtcttct ccttggaacac ctctgtcagc acggcatatc 240
tgcagatcag cagcctaaag gctgacgaca ctgccgtgta ttactgtgcg agatgggact 300
tctatgatta cgtggaggct atggactact gggggccaag gaccacggtc accgtctcct 360
ca 362

<210> 113
<211> 363
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CH7A

<400> 113
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaac cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 114
<211> 294
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

```

<223> IGHV7-4-1*02

<400> 114

```
cagggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggtt      60
tcttgcaagg ctctctggata caccttcact agctatgcta tgaattgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacacca acactgggaa cccaacgtat      180
gccagggct tcacaggacg gtttgtcttc tcttggaca cctctgtcag cacggcatat      240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaggac actgccgtgt attactgtgc gaga      294
```

<210> 115

<211> 330

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> PR1A3 VL

<400> 115

```
gatatcgtga tgaccagtc tcaaagattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc      60
gtcacctgca aggccagtc gaatgtgggt actaatgttg cctggatatca acagaaacca      120
ggacaatccc ctaaagcact gatttactcg gcacccctacc ggtacagtgg agtcacctgat      180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtacagtct      240
gaagacttgg cggagtatct ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgttcggc      300
tcggggacaa agttggaaat gaaacgtacg      330
```

<210> 116

<211> 327

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> pEM1495

<400> 116

```
gacatccaga tgactcagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc      60
atcacctgta aggccagtc gaatgtgggt actaatgttg cctggtagca gcagaagcca      120
ggtaaggctc caaagctgct gatctactcg gcacccctacc ggtacagtgg tgtgccaaagc      180
agattcagcg gtagcggtag cggtagcgac ttcaccttca ccatcagcag cctccagcca      240
```

gaggacatcg ccacctaacta ctgccaccaaa tattacacct atcctctatt cagcttcggc 300

caaggggacca aggtggaaat caaacgt 327

<210> 117

<211> 324

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CL1A

<400> 117

gatattccaga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggccagtcga gaatgtgggt actaatgttg cctgggtatca gcagaaacca 120

gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gctacagtgg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cagctttggc 300

caagggcacca agctcgagat caag 324

<210> 118

<211> 285

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> IMGT_hVK_1_39

<400> 118

gacatccaga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtcga gagcattagc agctatttaa attgggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccct 285

<210> 119

<211> 369

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH7 rF9

<400> 119

```
caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt      60
tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtatggta tgaactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacga aatctggaga ggcaacctat      180
gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat      240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac      300
ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggg caccgtctcc      360
tcagctagc                                     369
```

<210> 120

<211> 330

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CIA1 rH11

<400> 120

```
gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc      60
atcacttgca aggccagtc gactgtgagt gctaattgtg cgtggatatca gcagaaacca      120
gggaaagcac ctaagctcct gatctacttg gcacccatcc gctacagagg agtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc      300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg                                     330
```

<210> 121

<211> 987

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> IgG1

<400> 121

```
accaagggcc catcgggtctt cccctgggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca      60
```

```

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 120
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tctacagtc ctcaggactc 180
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 240
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagcaga gcccaaatct 300
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 360
gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga cctgagggtc 420
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 480
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg 540
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 600
aagtgcgaag tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 660
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc 720
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 780
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 840
tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctacccgtgg acaagagcag gtggcagcag 900
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag 960
agcctctccc tgtctccggg taaatga 987

```

<210> 122

<211> 328

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> IgG1

<400> 122

```

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

```

```

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

```

Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	35	40	45	
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	50	55	60	
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	65	70	75	80
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ala	85	90	95	
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	100	105	110	
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	115	120	125	
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	130	135	140	
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	145	150	155	160
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	165	170	175	
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	180	185	190	
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	195	200	205	
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	210	215	220	
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	225	230	235	240

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 123
<211> 42
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер MS-43

<400> 123
ccagccggcc atggccgata tccagatgac ccagtctcca tc 42

<210> 124
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер MS-52

<400> 124
gaagaccgat gggcctttgg tgctag 26

<210> 125
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер MS-55

<400> 125
 gcaacatatg ttgaagagtt taagggacgg 30

<210> 126
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> MS-56

<400> 126
 atgaactggg tgcgacaggc ccttg 25

<210> 127
 <211> 56
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер EAB-679

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> m означає а або с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(28)
 <223> n означає а, с, g або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> w означає а або t

<400> 127
 caggggcctg tcgcacccag ttcatmnnaw actcagtgaa ggtgtatcca gaagcc 56

<210> 128
 <211> 81
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер EAB-680

<400> 128

ccgtccctta aactcttcaa cataggttgc ctctccagtt ttggtgttta tccatcccat 60

ccactcaagc ccttgtccag g 81

<210> 129

<211> 50

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер EAB-685

<400> 129

cagctatgac catgattacg ccaagcttgc atgcaaattc tatttcaagg 50

<210> 130

<211> 27

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер EAB-686

<400> 130

gttgctgtgt atcagcagaa accaggg 27

<210> 131

<211> 34

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер EAB-687

<400> 131

gctctttgtg acgggscgagc tcaggccctg atgg 34

<210> 132

<211> 35

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер EAB-688

<400> 132

ggagtcccat caagggttcag tggcagtggg tctgg

35

<210> 133

<211> 70

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер EAB-681

<400> 133

cctggtttct gctgatacca cgaacatta gtaccacat tctgactggc cttgcaagtg

60

atggtgactc

70

<210> 134

<211> 77

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер EAB-682

<400> 134

ctgccactga accttgatgg gactccactg tagcggtagg atgccgaata gatcaggagc

60

ttaggtgctt tccctgg

77

<210> 135

<211> 64

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер AC7

<220>

<221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> m означає а або с

<220>

<221> misc_feature

<222> (38)..(39)

<223> n означає а, с, г або т

<400> 135
 ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata gaagtcmmnt ctcgcacagt aatacacggc 60
 agtg 64

<210> 136
 <211> 64
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AC8

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> m означає а або с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> n означає а, с, г або t

<400> 136
 ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata gaamnccat ctcgcacagt aatacacggc 60
 agtg 64

<210> 137
 <211> 64
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AC9

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> m означає а або с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> n означає а, с, г або t

<400> 137

ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcata mnngtcccat ctgcacagt aatacacggc 60

agtg 64

<210> 138

<211> 64

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер AC10

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> m означає а або с

<220>

<221> misc_feature

<222> (29)..(30)

<223> n означає а, с, g або t

<400> 138

ccagtagtcc atagcctcca cgtaatcmnn gaagtcccat ctgcacagt aatacacggc 60

agtg 64

<210> 139

<211> 64

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер AC11

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> m означає а або с

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(27)

<223> n означає а, с, g або t

<400> 139

ccagtagtcc atagcctcca cgtamnnata gaagtcccat ctgcacagt aatacacggc 60

agtg

64

<210> 140
 <211> 64
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AC12

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(37)
 <223> m означає а або с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(39)
 <223> n означає а, с, г або t

<400> 140
 cgtggtcctt tggccccagt agtccatagc ctccacmna tcatagaagt cccatctgc

60

acag

64

<210> 141
 <211> 64
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AC13

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> m означає а або с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> n означає а, с, г або t

<400> 141
 cgtggtcctt tggccccagt agtccatagc ctcnnngtaa tcatagaagt cccatctgc

60

acag

64

<210> 142
 <211> 64
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AC14

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> m означає а або с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> n означає а, с, g або t

<400> 142
 cgtgggtccct tggccccagt agtccatagc mnnacgtaa tcatagaagt cccatctcgc 60
 acag 64

<210> 143
 <211> 64
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AC15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> m означає а або с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(30)
 <223> n означає а, с, g або t

<400> 143
 cgtgggtccct tggccccagt agtccatmnn ctccacgtaa tcatagaagt cccatctcgc 60
 acag 64

<210> 144

<211> 64
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AC16

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> m означає а або с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(27)
 <223> n означає а, с, g або t

<400> 144
 cgtgggtccct tggccccagt agtcmnnagc ctccacgtaa tcatagaagt cccatctcgc 60
 acag 64

<210> 145
 <211> 77
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AC17

<400> 145
 cgtgggtccct tggccccagt agtccatagc ctccacgtaa tcatagaagt cccatctcgc 60
 acagtaatac acggcag 77

<210> 146
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер EAB-749

<400> 146
 ccatcagggc ctgagctcgc ccgtc 25

<210> 147
 <211> 30

```

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер ЕАВ-750

<400> 147
cgtggaggct atggactact ggggccaagg
30

<210> 148
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер ЕАВ-751

<400> 148
gactactggg gccaagggaс сасggtcac
29

<210> 149
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер ЕАВ-752

<400> 149
ggtcagggсg cctgagttcc acg
23

<210> 150
<211> 60
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер АС1

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> m означає а або с

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(39)
<223> n означає а, с, g або t

```

<400> 150
 ggtgccctgg ccaaactga atagaggata ggtgtamnt tggtagacagt agtaagttgc 60

<210> 151
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AC2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> m означає а або с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> n означає а, с, g або t

<400> 151
 ggtgccctgg ccaaactga atagaggata ggtmnnatat tggtagacagt agtaagttgc 60

<210> 152
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AC3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> m означає а або с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> n означає а, с, g або t

<400> 152
 ggtgccctgg ccaaactga atagaggata mnngtaatat tggtagacagt agtaagttgc 60

<210> 153

<211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AC4

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> m означає а або с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(30)
 <223> n означає а, с, g або t

<400> 153
 ggtgccctgg ccaaacgtga atagaggmnn ggtgtaatat tggtgacagt aglaagtlgc 60

<210> 154
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AC5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> m означає а або с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n означає а, с, g або t

<400> 154
 ggtgccctgg ccaaacgtga amnaggata ggtgtaatat tggtgacagt agtaagttgc 60

<210> 155
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AC6

<400> 155
 ggtgccctgg ccaaactga atagaggata ggtgtaatat tggtgacagt agtaagttgc 60

<210> 156
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер ЕАВ-746

<400> 156
 cgcttgatct cgagcttggt gccctggcca aacgtg 36

<210> 157

<400> 157
 000

<210> 158
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> pETR6592

<400> 158

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

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser
 20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr
 35 40 45

Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg
 50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
 65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
115 120 125

Met Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr
165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile
195 200 205

Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser
210 215 220

Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn
225 230 235 240

Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr
245 250 255

Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr
260 265 270

Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Leu Ser
275 280 285

Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val Thr
290 295 300

Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr Gly
305 310 315 320

Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser Glu
325 330 335

Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Ile Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val
340 345 350

Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro Ile
355 360 365

Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn Ala
370 375 380

Leu Pro Gln Glu Asn Leu Ile Asn Val Asp Leu Glu Val Leu Phe Gln
385 390 395 400

Gly Pro Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
405 410 415

Trp His Glu Ala Arg Ala His His His His His His
420 425

<210> 159

<211> 363

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> PMS22

<400> 159

cagggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggagggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 160
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер 1C8

<400> 160
 caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttgga cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatcatt acgtggagggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 161
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> 3E1

<400> 161
 caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttgga cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggagggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 162
<211> 363
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> 2D7

<400> 162
caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
ttctattggt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 163
<211> 363
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Важкий ланцюг з дозрілою афінністю

<400> 163
caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
tttgctcatt actttcagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 164
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Важкий ланцюг з дозрілою афінністю

<400> 164
 cagggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttgcgttatt accttcagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 165
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Важкий ланцюг з дозрілою афінністю

<400> 165
 cagggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggatg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat 300
 ttgcgttatt accttgaggc tatggactac tggggccaag ggaccacgat caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 166
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> H3-бібліотека, повна (5) 19

<400> 166

```
caggTgcaat tggTgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt      60
tcttgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgagctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat      180
gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaaca cctctgtcag cacggcatat      240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgctgtgt attactgtgc gagatgggac      300
gcctttgagt acgtgaaggc gctggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc      360
tca                                     363
```

<210> 167

<211> 363

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H3-бібліотека, повна (5) 8

<400> 167

```
caggTgcaat tggTgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt      60
tcttgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat      180
gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaaca cctctgtcag cacggcatat      240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgcctgtgt attactgtgc gagatgggat      300
ttctttgagt attttaagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc      360
tca                                     363
```

<210> 168

<211> 363

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H3-бібліотека, повна (5) 28

<400> 168
 cagggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag caccgcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 tttttttatt acgtgcagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 169
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> H3-бібліотека, повна (5) 27

<400> 169
 cagggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag caccgcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggat 300
 ttttcttatt acgttgaggc gatggactac tggggccaag ggaccacagt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 170
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Важкий ланцюг H4E9

<400> 170
 cagggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggta tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaatacca aaactggaga ggcaacttat 180
attgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
ttctatgatt acgtggagggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 171
<211> 363
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pAC14 (B9)

<400> 171
caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggtg tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaagtggaga ggcaacctat 180
gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
ttctatgatt acgtggagggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 172
<211> 363
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pAC15 (F9)

<400> 172
caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtatggta tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacga aatctggaga ggcaacctat 180
gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 173
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> H1/H2-бібліотека (5) 2

<400> 173
 caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtattcta tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatac ataaacacca aaaatggaga ggcaaactat 180
 gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 174
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> H1/H2-бібліотека (5) 11

<400> 174
 caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtatggta tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaaatggaga ggcaacctat 180
 attgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
 ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
 ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 175

<211> 363

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H1/H2- бібліотека (5) 13

<400> 175

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctctctggata caccttcact gagtttggtg tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatat ataaacacca aaaatggaga ggcaaaactat 180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaag cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 176

<211> 363

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H1/H2- бібліотека (5) 14

<400> 176

caggtgcaat tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg ctctctggata caccttcact gagtatggta tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatat ataaacacca aaaatggaga ggcaaaactat 180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaag cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttctatgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 177

<211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> H3-бібліотека, повна (5) 19

<400> 177

```
caggtgcaat tggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt      60
tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgagctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat      180
gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat      240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgctgtgt attactgtgc gagatgggac      300
gcctttgagt acgtgaaggc gctggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc      360
tca                                          363
```

<210> 178
 <211> 330
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> pAC21 (3A1)

<400> 178

```
gatatccaga tgaccacgac tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc      60
atcacttgca aggccagtg ccaatgtgggt aataatgttg cctggatatca gcagaaacca      120
gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcctccaacc gctccggtgg agtcccatca      180
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt caggtttggc      300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg                                          330
```

<210> 179
 <211> 330
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> pAC19 (2C6)

<400> 179
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtaa gaatgtgggg actaatgttg cgtggatatca gcagaaacca 120
gggaaagcac ctaagcccct gatctacctg gcacccctacc cccagattgg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactcttca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcccctatt cacgtttggc 300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 180
<211> 330
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pAC18 (2F1)

<400> 180
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtc ggctgtgggt acgtatgttg cgtggatatca gcagaaacca 120
gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcacccctacc gcaaaagggg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactcttca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 181
<211> 330
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pAC23 (2F11)

<400> 181
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtc gatagcgagt actaatgttg cctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagcac ctaagctcct gatctattgg gcacccctacc gctatagtgg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 182
<211> 330
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Легкий ланцюг H4E9
<400> 182
gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtc gaatgtgggt actaatgttg cctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagcac ctaagccct gatctattcg gcatcctacc gctacagtgg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 183
<211> 330
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> L2D2
<400> 183
gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtc caatgtgggt accaacgttg cgtggatatca gcagaaacca 120
gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcccacc ggtacagtgg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

<210> 184
<211> 330

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> pAC6 (C1)

<400> 184

```

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc      60
atcacttgca aggccagtc gattatgggt cctaattgtg cgtgggtatca gcagaaacca      120
gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcatcctacc acgaaagtgg agtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc      300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg      330

```

<210> 185

<211> 330

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> pAC7 (E10)

<400> 185

```

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc      60
atcacttgca aggccagtc aattgtgggt actaatgttg cgtgggtatca gcagaaacca      120
gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcatccacc gtcccagtg agtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc      300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg      330

```

<210> 186

<211> 330

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> pAC12 (H7)

<400> 186

```

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc      60

```

```

atcacttgca aggccagtca gaaggtgctt actaatgttg cgtggtatca gcagaaacca 120
gggaaagcac ctaagctcct gatctatttg gcacccacc gctacagtgg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

```

<210> 187
 <211> 330
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> pAC13 (H11)

```

<400> 187
gatattccaga tgaccacagtc tccatccctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtca gactgtgagt gctaattgtg cgtggtatca gcagaaacca 120
gggaaagcac ctaagctcct gatctacttg gcacccacc gctacagagg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg 330

```

<210> 188
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> PMS22

<400> 188

```

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

```

```

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

```

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 189

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> 1C8

<400> 189

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr His Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 190

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> 3E1

<400> 190

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Val Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 191

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> 2D7

<400> 191

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Trp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 192

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг з дозрілою афінністю

<400> 192

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala His Tyr Phe Gln Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 193

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг з дозрілою афінністю

<400> 193

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Phe Gln Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 194

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг з дозрілою афінністю

<400> 194

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Leu Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Ile Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 195

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H3-бібліотека, повна (5) 19

<400> 195

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Ala Phe Glu Tyr Val Lys Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 196

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H3-бібліотека, повна (5) 8

<400> 196

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Phe Glu Tyr Phe Lys Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 197

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H3-бібліотека, повна (5) 28

<400> 197

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Phe Tyr Tyr Val Gln Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 198

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H3- бібліотека, повна (5) 27

<400> 198

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ser Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 199
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Важкий ланцюг H4E9

<400> 199

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Ile Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 200

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> pAC14 (B9)

<400> 200

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 201

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> pAC15 (F9)

<400> 201

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

Source: NCBI GenBank, accession number: F015030.1, version: 1.0, date: 1998-01-01, length: 121, type: CDS, description: pAC15 (F9)

<210> 202

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H1/H2- бібліотека (5) 2

<400> 202

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 203

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H1/H2- бібліотека (5) 11

<400> 203

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Thr Tyr Ile Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 204

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H1/H2- бібліотека (5) 13

<400> 204

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Ala Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 205

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H1/H2- бібліотека (5) 14

<400> 205

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Thr Lys Asn Gly Glu Ala Asn Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 206

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> H3- бібліотека, повна (5) 19

<400> 206

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Ala Phe Glu Tyr Val Lys Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 207
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> pAC21 (3A1)

<400> 207

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 Lys Ala Ser Ala Asn Val Gly Asn Asn
 20 25 30

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

Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Ser Gly 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 208
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> pAC19 (2C6)

<400> 208

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 Lys Ala Ser Lys Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Leu Ala Ser Tyr Pro Gln Ile 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 209

<211> 110

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> pAC18 (2F1)

<400> 209

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 210

<211> 110

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> pAC23 (2F11)

<400> 210

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 Lys Ala Ser Gln Ile Ala Ser Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Tyr Arg Tyr 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 211

<211> 110

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Леркий ланцюг H4E9

<400> 211

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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 212

<211> 110

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> L2D2

<400> 212

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 Lys Ala Ser His Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

```

35              40              45

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
      85              90              95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
      100              105              110

<210> 213
<211> 110
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pAC6 (C1)

<400> 213

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 Lys Ala Ser Gln Ile Met Gly Pro Asn
      20              25              30

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

Tyr Leu Ala Ser Tyr His 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
      85              90              95

```

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 214

<211> 110

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> pAC7 (E10)

<400> 214

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 Lys Ala Ser Gln Ile Val Gly Thr Asn
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser His Arg Pro 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 215

<211> 110

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> pAC12 (H7)

<400> 215

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 Lys Ala Ser Gln Lys Val Leu Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 216

<211> 110

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> pAC13 (H11)

<400> 216

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 Lys Ala Ser Gln Thr Val Ser Ala Asn
20 25 30

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

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr Arg 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 217

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR3 важкого ланцюга PR1A3 (Y98A)

<400> 217

Trp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 218

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR3 важкого ланцюга PR1A3 (D99Y)

<400> 218

Trp Asp Phe Tyr Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 219

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR3 важкого ланцюга PR1A3 (D99H)

<400> 219

Trp Asp Phe Tyr His Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 220
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга PR1A3 (V101F)
 <400> 220

Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Phe Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 221
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга PR1A3 (E101aQ)
 <400> 221

Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Gln Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 222
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга PR1A3 (A103T)
 <400> 222

Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 223
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга PR1A3 (Y98A / D99Y)
 <400> 223

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 224
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR3 важкого ланцюга PR1A3 (W95Y)
 <400> 224

Tyr Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 225
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (Y98A)
 <400> 225

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 226

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (D99Y)

<400> 226

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 227

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (D99H)

<400> 227

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr His Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 228

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (V101F)

<400> 228

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Phe Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 229

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (E102Q)

<400> 229

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Gln Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 230

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (A103T)

<400> 230

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

```

<210> 231
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (Y98A / D99Y)

<400> 231

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
          50          55          60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120

<210> 232
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (W95Y)
<400> 232

```

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 233

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1A (Y98A)

<400> 233

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

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

```

35          40          45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50          55          60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115         120

<210> 234
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CH1A1A (D99Y)

<400> 234

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50          55          60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

```

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 235

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1A (D99H)

<400> 235

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr His Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 236

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1A (V101F)

<400> 236

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Phe Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 237

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1A (E102Q)

<400> 237

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Gln Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 238

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1A (A103T)

<400> 238

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 239

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1A (Y98A / D99Y)

<400> 239

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

```

65              70              75              80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
      100             105             110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115             120

<210> 240
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CH1A1A (W95Y)

<400> 240

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
      50              55              60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Tyr Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
      100             105             110

```

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 241

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1B (Y98A)

<400> 241

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 242

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1B (D99Y)

<400> 242

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 243

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1B (D99H)

<400> 243

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe

```

                20                25                30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
      50                55                60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr His Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
      100                105                110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115                120

<210> 244
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CH1A1B (V101F)

<400> 244

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
      50                55                60

```

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Phe Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 245

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1B (E102Q)

<400> 245

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Gln Ala Met Asp Tyr Trp Gly

```

100              105              110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115              120

<210> 246
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CH1A1B (A103T)

<400> 246

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50              55              60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100             105             110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115              120

<210> 247
<211> 121
<212> PRT

```

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1B (Y98A / D99Y)

<400> 247

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 248

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1B (W95Y)

<400> 248

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 249

<211> 363

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Конструкция на основе важкого ланцюгаCH7A (Y98A)

<400> 249

caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttgaa tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatgggatg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180

gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttgaca cctctgtcag cacggcatat 240

ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300

ttcgtgatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 250
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (D99Y)

<400> 250

caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt	60
tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat	180
gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat	240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac	300
ttctattatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc	360
tca	363

<210> 251
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (D99H)

<400> 251

caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt	60
tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat	180
gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat	240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac	300
ttctatcatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc	360
tca	363

<210> 252
 <211> 364
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (V101F)
 <400> 252
 ccaggtgcag ctggtgcaat ctgggtctga gttgaagaag cctggggcct cagtgaaggt 60
 ttcttgcaag gcttctggat acaccttcac tgagtttgga atgaactggg tgcgacaggc 120
 ccctggacaa gggcttgagt ggatgggatg gataaacacc aaaactggag aggcaacata 180
 tgttgaagag tttaagggaac ggtttgtctt ctcttggac acctctgtca gcacggcata 240
 tctgcagatc agcagcctaa aggctgaaga cactgccgtg tattactgtg cgagatggga 300
 cttctatgat tacttcgagg ctatggacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc 360
 ctca 364

<210> 253
 <211> 364
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (E102Q)
 <400> 253
 ccaggtgcag ctggtgcaat ctgggtctga gttgaagaag cctggggcct cagtgaaggt 60
 ttcttgcaag gcttctggat acaccttcac tgagtttgga atgaactggg tgcgacaggc 120
 ccctggacaa gggcttgagt ggatgggatg gataaacacc aaaactggag aggcaacata 180
 tgttgaagag tttaagggaac ggtttgtctt ctcttggac acctctgtca gcacggcata 240
 tctgcagatc agcagcctaa aggctgaaga cactgccgtg tattactgtg cgagatggga 300
 cttctatgat tacgtgcagg ctatggacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc 360
 ctca 364

<210> 254
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (A103T)
 <400> 254
 caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcttgcaagg cttctggata caccttcact gagtttgga tgaactgggt gcgacaggcc 120

```
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
ttctatgatt acgtggagac tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363
```

<210> 255
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

```
<220>
<223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (Y98A / D99Y)
<400> 255
caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatgggac 300
ttcgcttatt acgtggaggc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363
```

<210> 256
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

```
<220>
<223> Конструкція на основі важкого ланцюга CH7A (W95Y)
<400> 256
caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcact gagtttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aaactggaga ggcaacatat 180
gttgaagagt ttaagggacg gtttgtcttc tccttggaca cctctgtcag cacggcatat 240
ctgcagatca gcagcctaaa ggctgaagac actgccgtgt attactgtgc gagatacgac 300
```

ttctatgatt acgtggaggg tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 257

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1

<400> 257

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 258

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A2

<400> 258

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 259

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A3

<400> 259

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

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 260
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CH1A4

<400> 260

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Lys Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 261

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1A

<400> 261

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 262

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1B

<400> 262

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 263

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1C

<400> 263

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 264

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1D

<400> 264

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 265
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CH1A1E

<400> 265

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 266
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CH1A1F

<400> 266

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 267

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1G

<400> 267

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 268
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CH1A1

<400> 268
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60
 tcttgcaagg ccagcggcta cacccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
 ccaggccagg gctctgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accctggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgcctgtg actactgcgc cagatgggac 300
 ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agc 363

<210> 269
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CH1A2

<400> 269
 caggtcaaac tgcagcagag cggccctgag ctgaagaaac ccggcgagac agtgaagatc 60
 agctgcaagg ccagcggcta cacccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggca 120
 ccaggccagg gctctgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accaccgaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgcctgtg actactgcgc cagatgggac 300
 ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agc 363

<210> 270
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A3

<400> 270

```
caggtgcagc tggcgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaagggtg      60
tcttgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt caagcaggcc      120
cctggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac      180
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accaccgaca ccagcaccag caccgcctac      240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac      300
ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct      360
agc                                          363
```

<210> 271

<211> 362

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A4

<400> 271

```
aggtgcagct ggtgcagtct ggcgcccgaag tgaagaaacc tggcgccagc gtgaagggtg      60
cctgcaaggc cagcggctac accttcaccg agttcggcat gaactgggtc cgacaggcac      120
caggccaggg cctcgaatgg atgggctgga tcaacaccaa gaccggcgag gccacctacg      180
tggaagagtt caagggcaga ttgccttca gcctggaaac cagcgccacc accgcctacc      240
tgcagatcaa caacctgaag aacgaggata ccgccaagta cttctgcgcc agatgggact      300
tctacgatta cgtggaagcc atggactact gggggccagg caccaccgtg accgtgtcta      360
gc                                          362
```

<210> 272

<211> 363

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1A

<400> 272
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggtg 60
tcctgcaagg ccagcgggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
agc 363

<210> 273
<211> 363
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CH1A1B

<400> 273
caggtgaagc tgcagcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggtg 60
tcctgcaagg ccagcgggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
agc 363

<210> 274
<211> 363
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CH1A1C

<400> 274
caggtgcagc tgggtgcagtc tggccccgaa ctgaagaaac ctggagctag tgtgaagggtg 60
tcctgcaagg ccagcgggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120

```

ccagggccagg gcctcgaaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
agc 363

```

<210> 275
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CH1A1D

```

<400> 275
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagagac tgtgaagatc 60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
ccagggccagg gcctcgaaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
agc 363

```

<210> 276
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CH1A1E

```

<400> 276
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggtg 60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
ccagggccagg gcctcgaaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
gtggaagagt tcaagggcag attcaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240

```

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
 ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agc 363

<210> 277

<211> 363

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1F

<400> 277

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggt 60
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
 ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 ctggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
 ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agc 363

<210> 278

<211> 363

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A1G

<400> 278

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggt 60
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
 ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccatg accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaatcc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
 ttctacgatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agc

363

<210> 279

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A

<400> 279

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 280

<211> 363

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH1A

<400> 280

```

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggcgctgag gtgaagaagc ctggcgccctc ggtgaaggtc      60
tcttgcaagg cctctgggta cacatttacg gaattcgga tgaattgggt cagacaagca      120
cctgggcaag ggctcgagtg gatgggatgg ataaacacga agacaggcga ggccacctac      180
gtagaagagt tcaaaggaag ggtcacgatg accacagata cttctacctc tactgcgtat      240
atggaactac ggagcttgcg tagcgatgac acagcgggtg actattgtgc tcgatgggat      300
ttctatgact atgttgaagc tatggactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc      360
tca                                                                 363

```

<210> 281

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> PR1A3

<400> 281

```

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50              55              60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80

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

```

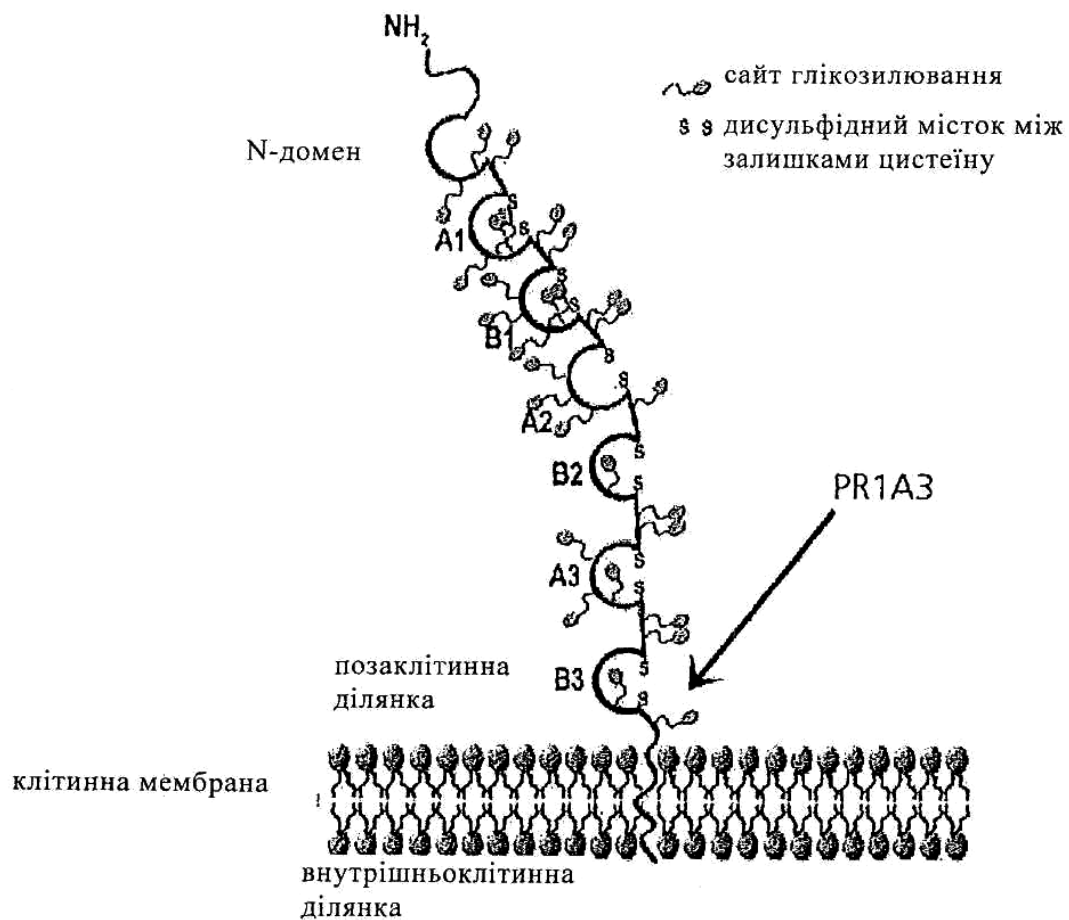
Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

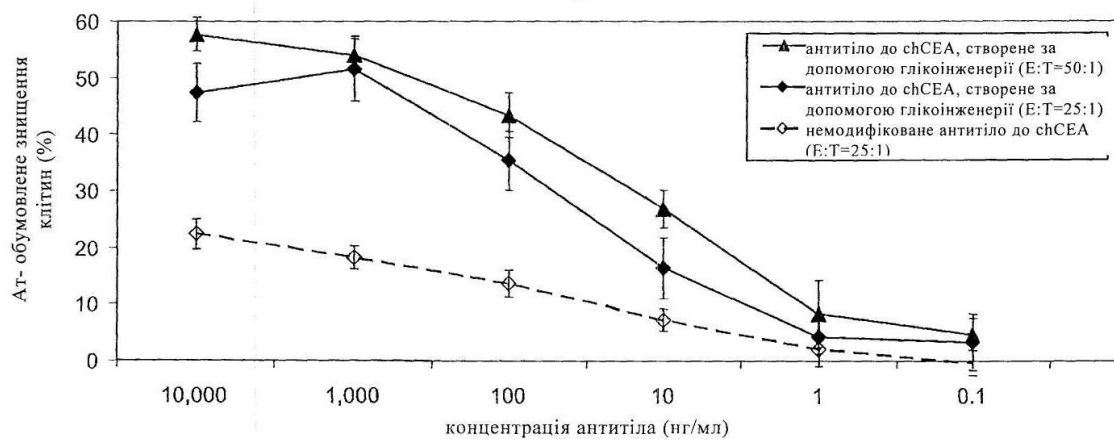
- 5 1. Виділене антитіло, яке зв'язується зі зв'язаним з мембраною карциноембріональним антигеном (CEA), де антитіло містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: CDR1 важкого ланцюга SEQ ID NO: 1, CDR2 важкого ланцюга SEQ ID NO: 13, CDR3 важкого ланцюга SEQ ID NO: 223; і
- 10 варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: CDR1 легкого ланцюга SEQ ID NO: 39, CDR2 легкого ланцюга SEQ ID NO: 49, і CDR3 легкого ланцюга SEQ ID NO: 56.
- 15 2. Антитіло за пунктом 1, де антитіло містить залишки каркасної ділянки CH1A1A (SEQ ID NO: 261) або CH1A1B (SEQ ID NO: 262).
- 20 3. Антитіло за пунктом 1, де варіабельна ділянка важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 239 і SEQ ID NO: 247, і де варіабельна ділянка легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична послідовності SEQ ID NO: 209.
- 25 4. Антитіло за одним з пунктів 1-3, де варіанти антитіла зв'язуються з тим же епітопом або здатні конкурувати за зв'язування з мишачим моноклональним антитілом PR1A3.
5. Антитіло за одним з пунктів 1-4, де антитіло зв'язується із зв'язаним з мембраною CEA із Kd 100 nM, 10 nM, 1 nM або менше.
- 30 6. Антитіло, яке зв'язується зі зв'язаним з мембраною людським карциноембріональним антигеном (CEA), де варіабельна ділянка важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 239 і SEQ ID NO: 247, і де варіабельна ділянка легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 209.
7. Антитіло за пунктом 6, де варіабельна ділянка важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 239 і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 209.
8. Антитіло за одним з пунктів 1-7, де антитіло містить Fc-ділянку, створену за допомогою глікоінженерії.
- 35 9. Антитіло за пунктом 8, де щонайменше від 20 до 100 % N-зв'язаних олігосахаридів у Fc-ділянці є нефукозильованими.
10. Антитіло за пунктом 8, де щонайменше від 20 до 100 % N-зв'язаних олігосахаридів у Fc-ділянці є бісекційними.
11. Антитіло за пунктом 8, де щонайменше від 20 до 50 % N-зв'язаних олігосахаридів у Fc-ділянці є бісекційними, нефукозильованими.
- 40 12. Антитіло за будь-яким з пунктів 8-11, де антитіло має щонайменше одну підвищену ефекторну функцію в порівнянні з батьківським антитілом, не підданим глікоінженерії.
13. Антитіло за пунктом 12, де щонайменше одна підвищена ефекторна функція вибрана з групи, що включає: підвищену афінність зв'язування з Fc-рецептором, підвищену антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність (ADCC), підвищення зв'язування з NK-клітинами, підвищене зв'язування з макрофагами, підвищене зв'язування з моноцитами, підвищене зв'язування з поліморфноядерними клітинами, підвищену безпосередню передачу сигналу, що індукує апонтоз, підвищене дозрівання дендритних клітин і підвищене Т-клітинне примування.
- 45 14. Антитіло за пунктом 13, де антитіло має підвищення ADCC принаймні від 40 до 100 % в порівнянні з батьківським антитілом, не підданим глікоінженерії.
- 50 15. Виділений полінуклеотид, який кодує антитіло за одним з пунктів 1-14.
16. Вектор, що містить полінуклеотид за пунктом 15.
17. Клітина-хазяїн, що містить вектор за пунктом 16.

18. Композиція, що містить антитіло за одним з пунктів 1-14 і фармацевтично прийнятний носій.
19. Спосіб індукції клітинного лізису пухлинної клітини, що включає контактування пухлинної клітини з антитілом за будь-яким з пунктів 1-14 або композицією за пунктом 18.
20. Спосіб за пунктом 19, у якому пухлинну клітину вибирають з групи, що складається з клітини колоректального раку, клітини NSCLC (недрібноклітинний рак легень), клітини раку шлунка, клітини раку підшлункової залози або клітини раку молочної залози.
21. Спосіб за пунктом 19, у якому клітинний лізис індукується антитілозалежною клітинною цитотоксичністю антитіла.
22. Спосіб лікування індивідуума, який страждає на рак, при якому відбувається аномальна експресія CEA, що включає введення індивідууму у терапевтично ефективній кількості антитіла за одним з пунктів 1-14 або композиції за пунктом 18.
23. Спосіб подовження тривалості життя індивідуума, який страждає на рак, при якому відбувається аномальна експресія CEA, що включає введення індивідууму у терапевтично ефективній кількості антитіла за одним з пунктів 1-14 або композиції за пунктом 18.
24. Антитіло або композиція за пунктом 22 або 23, де рак вибирають з групи, що складається з колоректального раку, недрібноклітинного раку легені (NSCLC), раку шлунка, раку підшлункової залози і раку молочної залози.
25. Антитіло або композиція за будь-яким з пунктів 22-24, де антитіло або композицію вводять у поєднанні з хіміотерапією або променевою терапією.
26. Антитіло або композиція за будь-яким з пунктів 22-25, де індивідуум являє собою людину.
27. Застосування антитіла за будь-яким з пунктів 1-14 або композиції за пунктом 18 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування індивідуума, який страждає на рак, при якому відбувається аномальна експресія CEA.
28. Застосування за пунктом 27, де рак вибраний з групи, що складається з колоректального раку, недрібноклітинного раку легені (NSCLC), раку шлунка, раку підшлункової залози і раку молочної залози.
29. Застосування за пунктами 27 або 28, де антитіло або композиція призначена для введення у поєднанні з хіміотерапією або променевою терапією.
30. Застосування за одним з пунктів 27-29, де індивідуум являє собою людину.



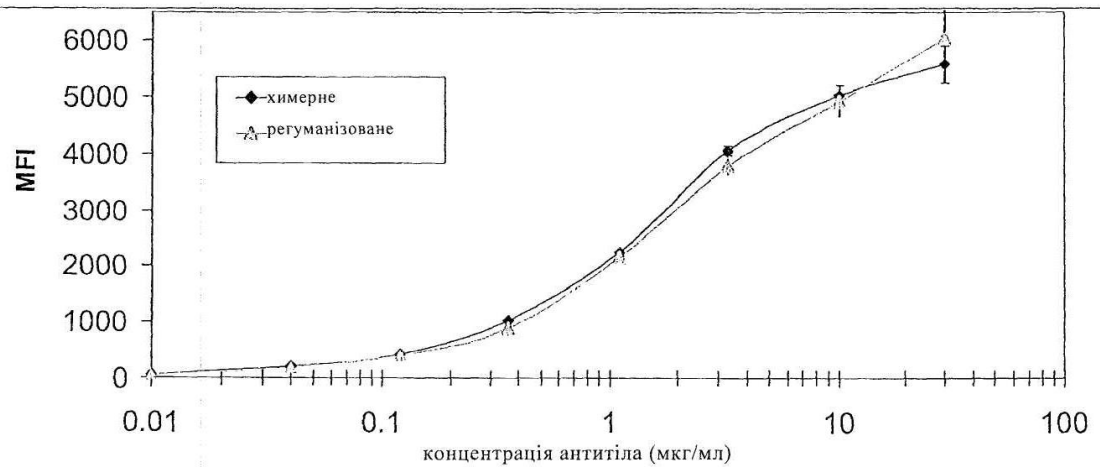
Фіг. 1

Клітини карциноми ободової кишки лінії Lovo в якості клітин-мішеней для ADCC; вивільнення лактатдегідрогенази (LDH), аналіз впродовж 4 год, huPBMC в якості ефektorних клітин



Фіг. 2

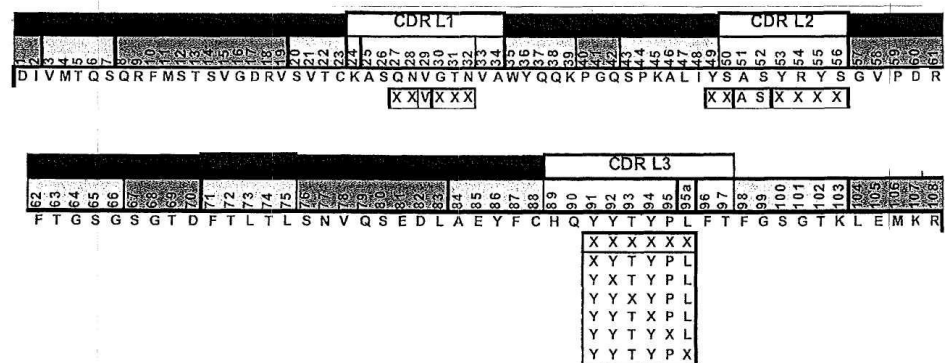
Зв'язування з клітинами людської карциноми ободової кишки лінії LoVo за даними вимірів методом FACS



Фіг. 3

VL

нумерація VL
PR1A3
за Кеботом
рандомізовані
положення

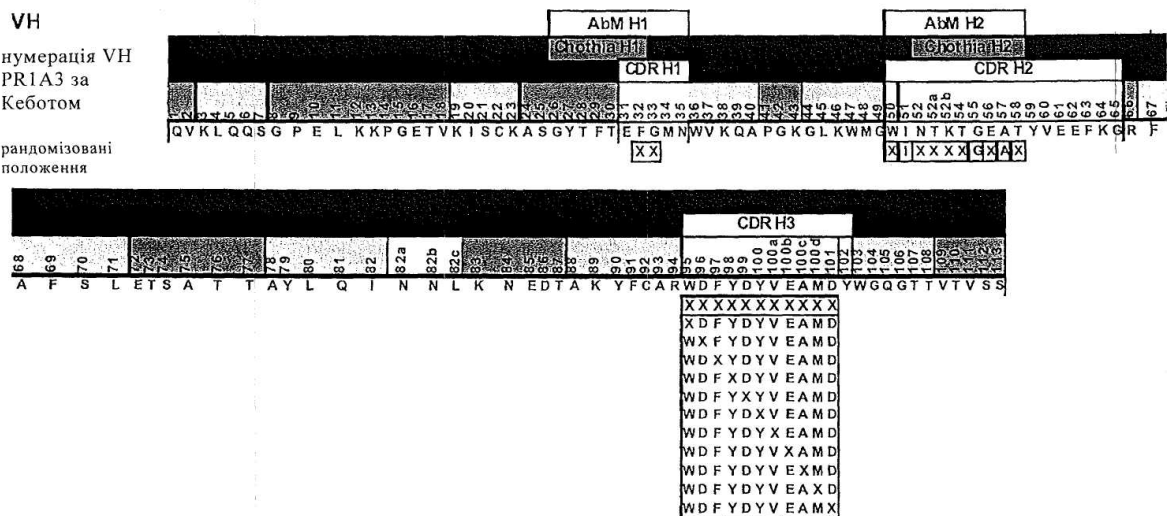


Фіг. 4

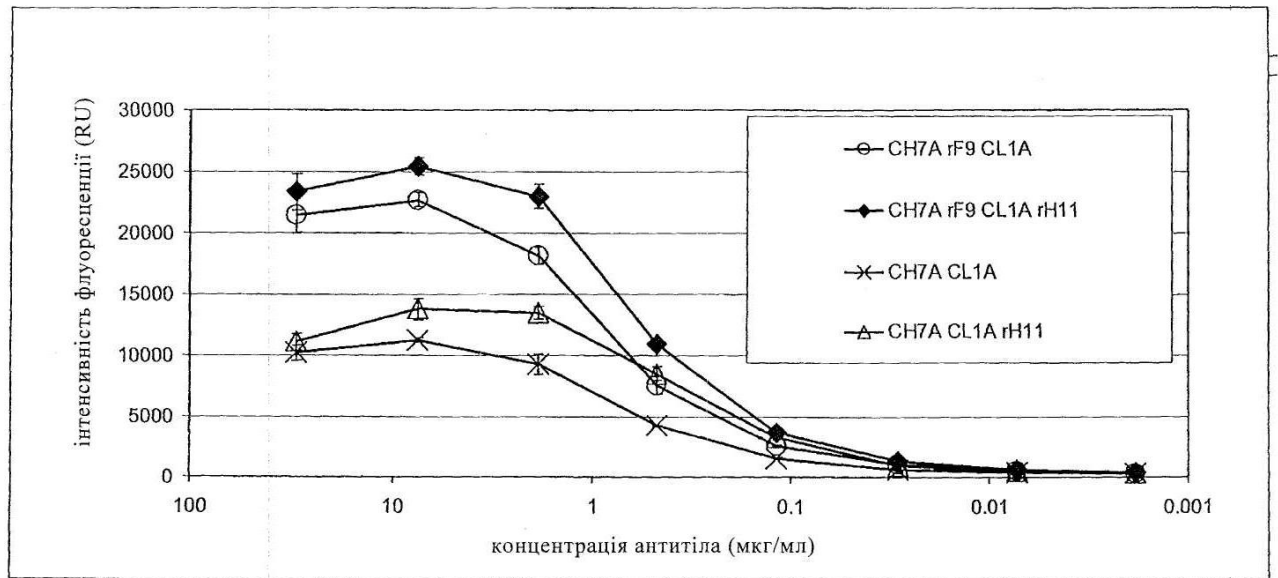
VH

нумерація VH
PR1A3 за
Кеботом

рандомізовані
положення

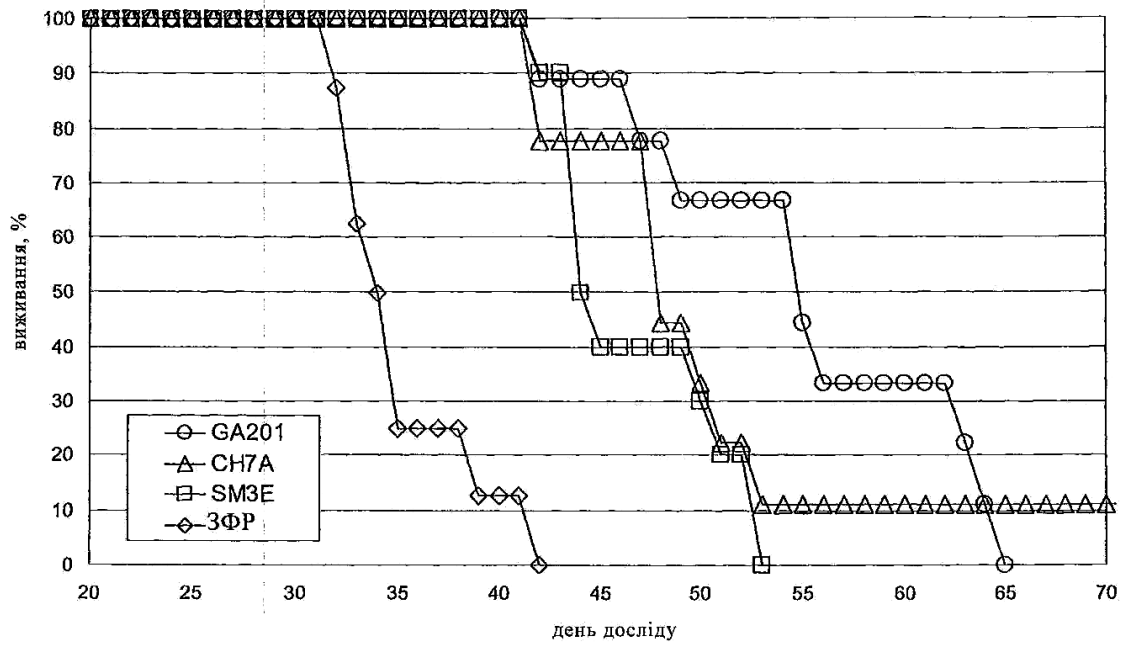


Фіг. 5

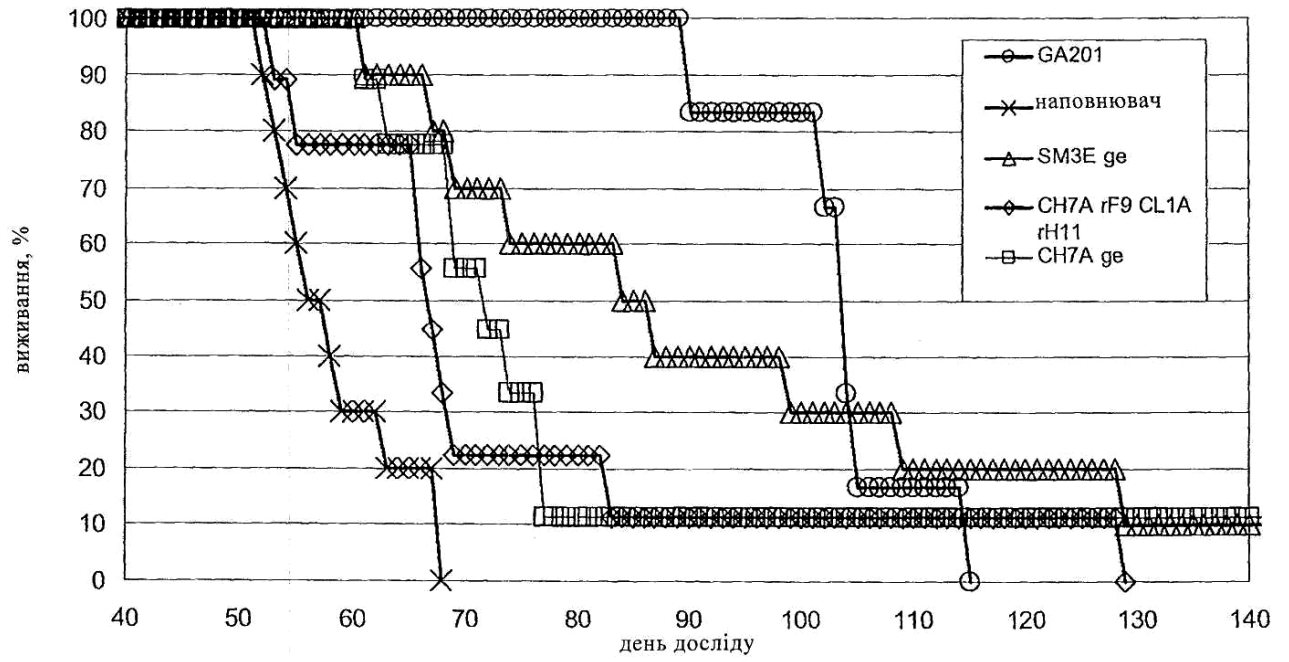


Фіг. 6

Модель пухлини лінії LS174T з метастазами в печінку

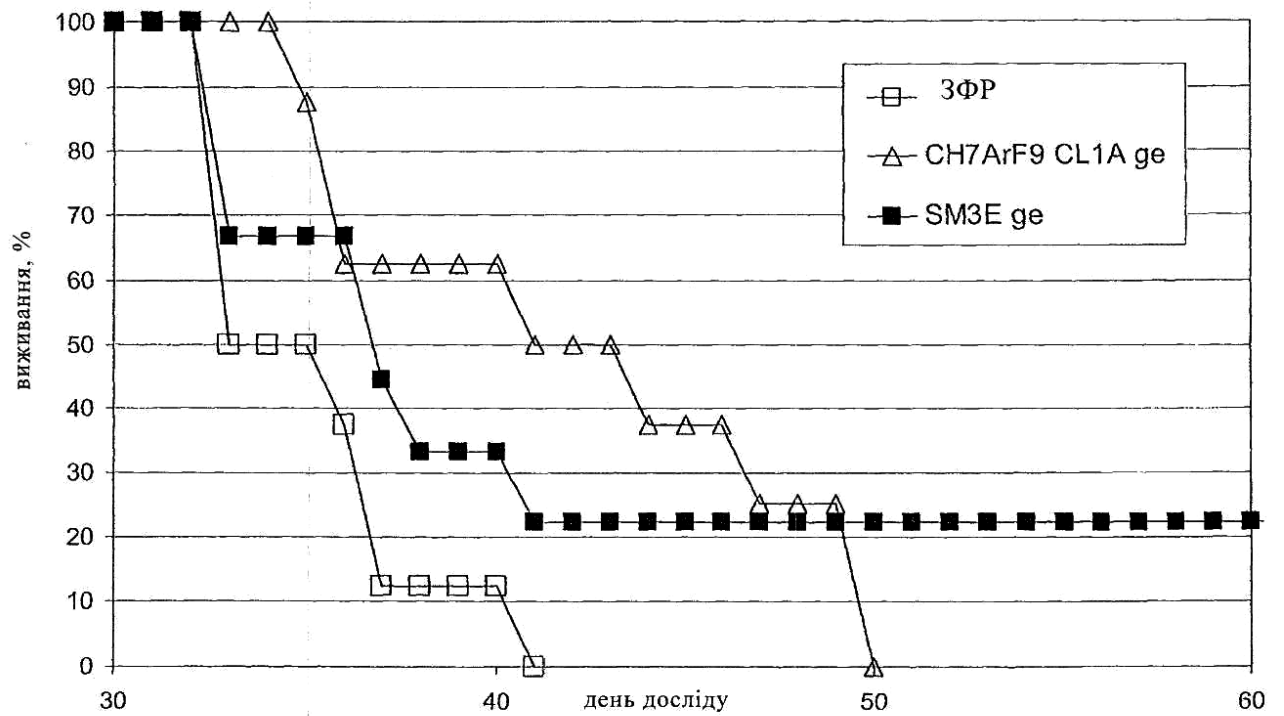


Фіг. 7



Фіг. 8

Модель пухлини лінії MKN45 з метастазами в печінку



Фіг. 9

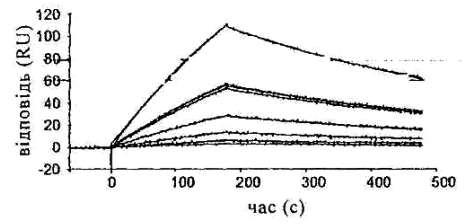
Сенсограма Fab-фрагментів антитіл до СЕА

CH7A H4E9 CL1A

$$k_{on}: 0,527 \times 10^3$$

$$k_{off}: 0,0027$$

$$KD: 518нМ$$

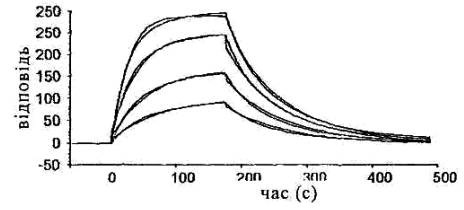


CH7A CL1A pAC18

$$k_{on}: 9,57 \times 10^4$$

$$k_{off}: 0,0206$$

$$KD: 216нМ$$

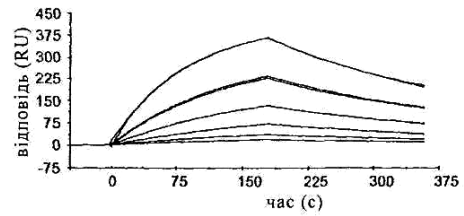


CH7A H4E9 CL1A pAC18

$$k_{on}: 3,64 \times 10^4$$

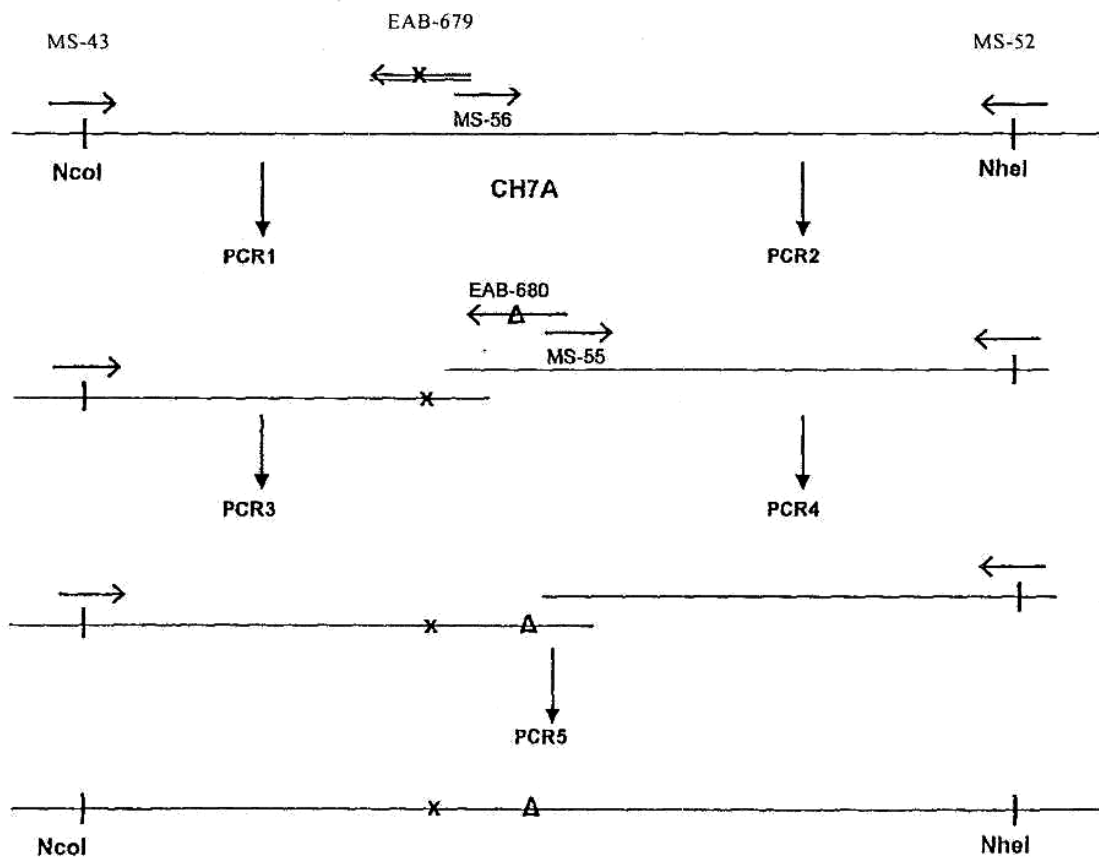
$$k_{off}: 0,0035$$

$$KD: 96нМ$$



Фіг. 10

Схема рандомізації CDR1 і CDR2 VH (антитіла CH7A)



Фіг. 11

Схема рандомізації CDR1 і CDR2 VL (антитіло CL1A)

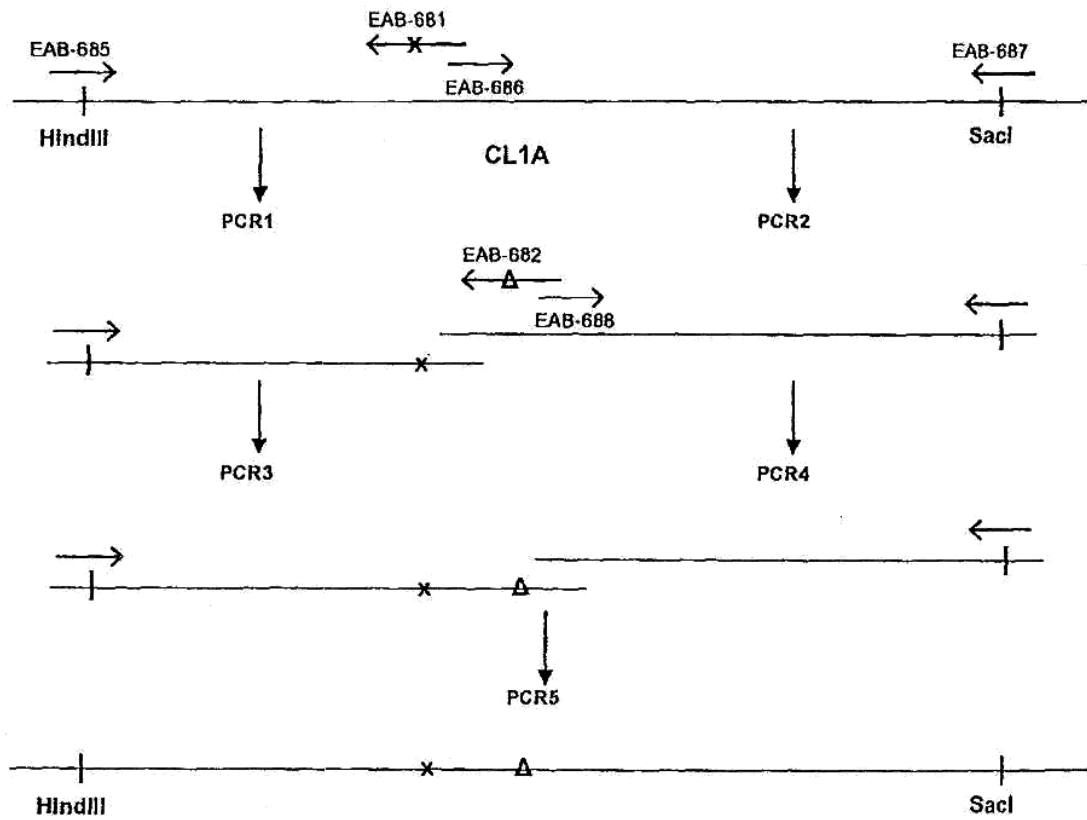
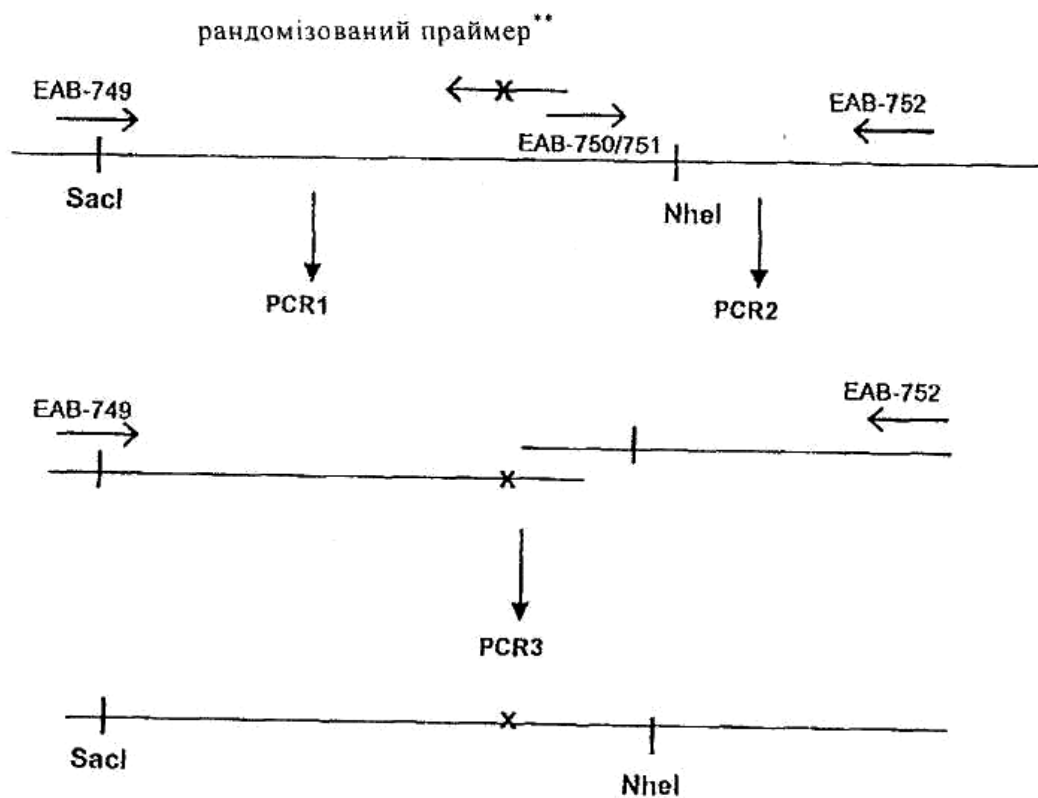


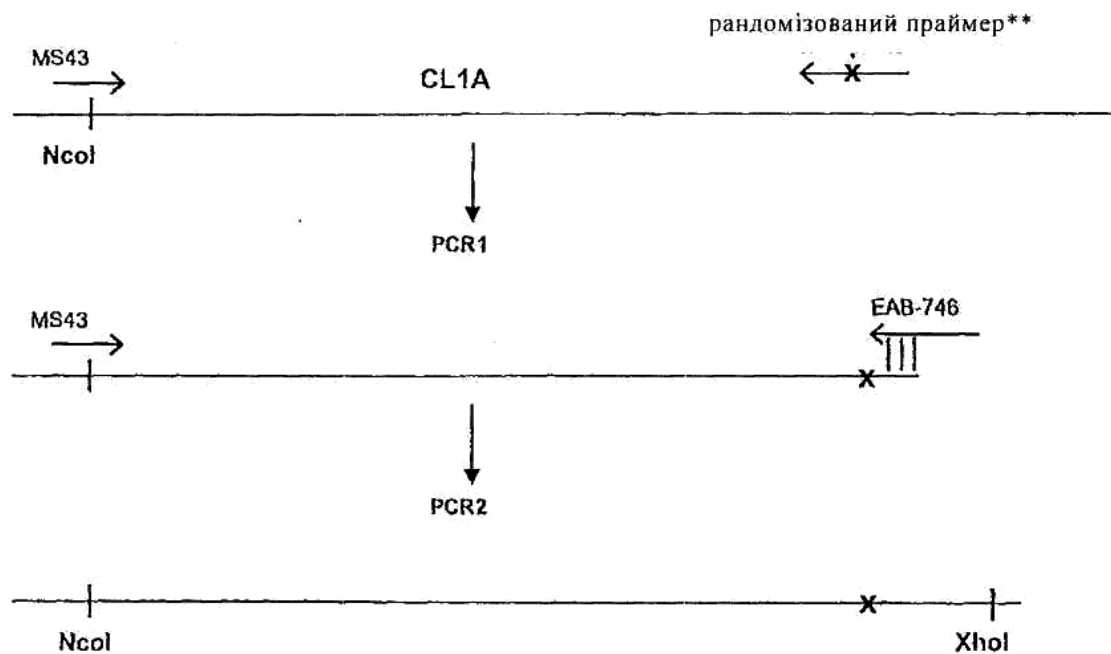
Fig. 12

Схема рандомізації CDR3 VH (антитіло CH7A)

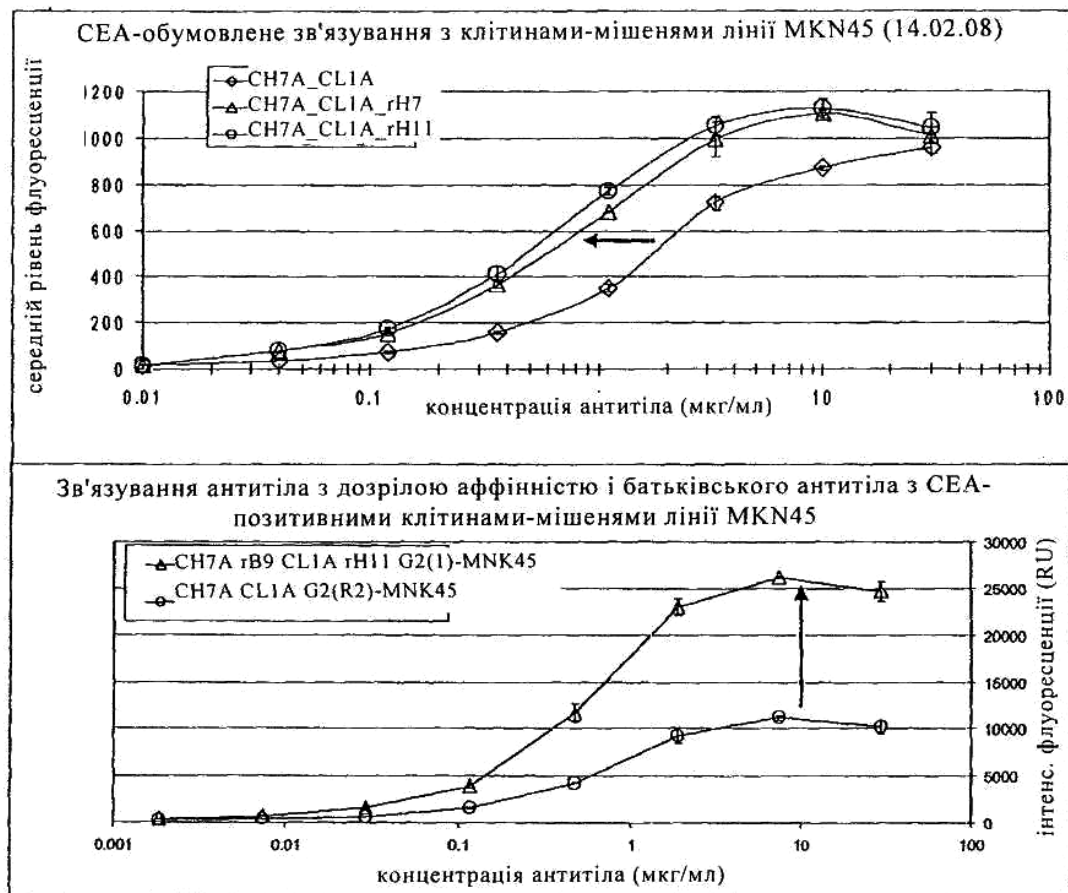


Фіг. 13

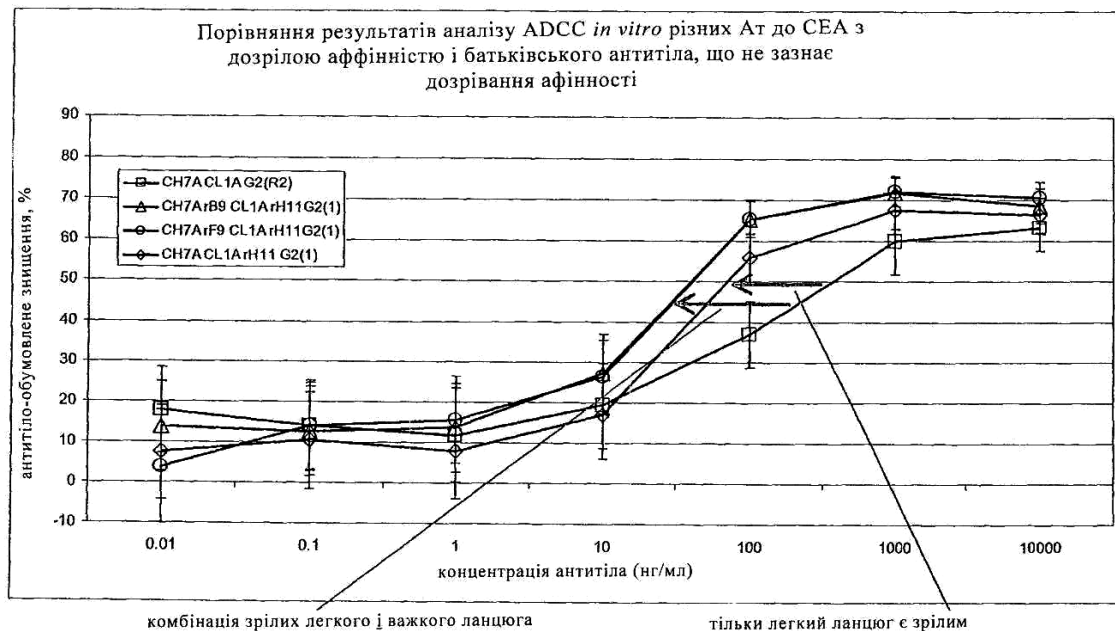
Схема рандомізації CDR3 VL (антитіло CL1A)



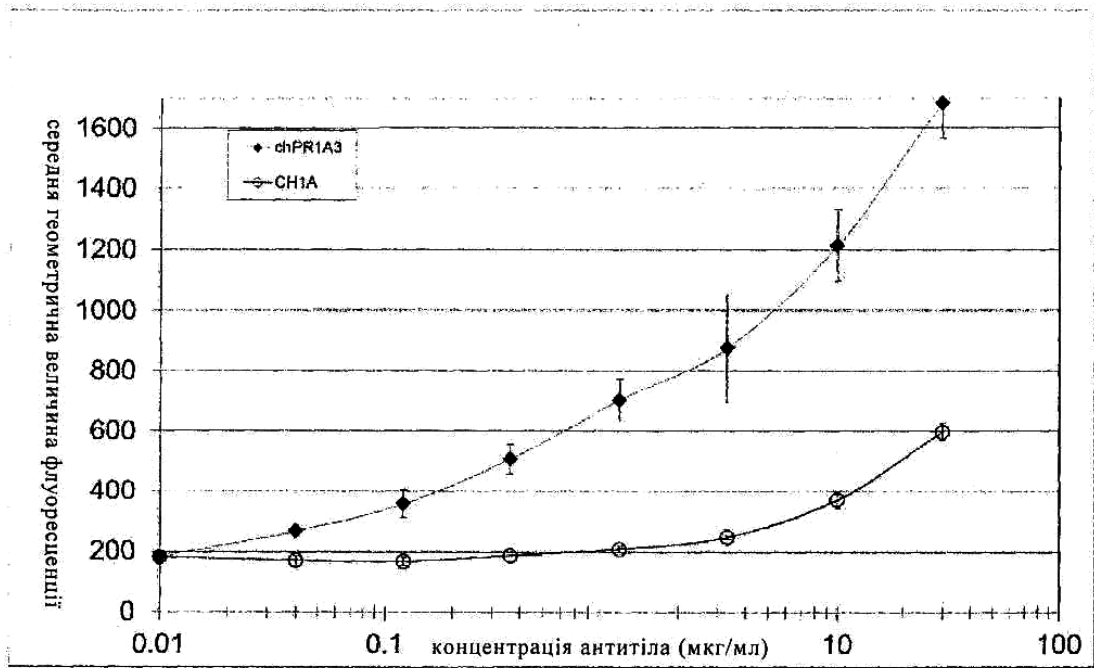
Фіг. 14



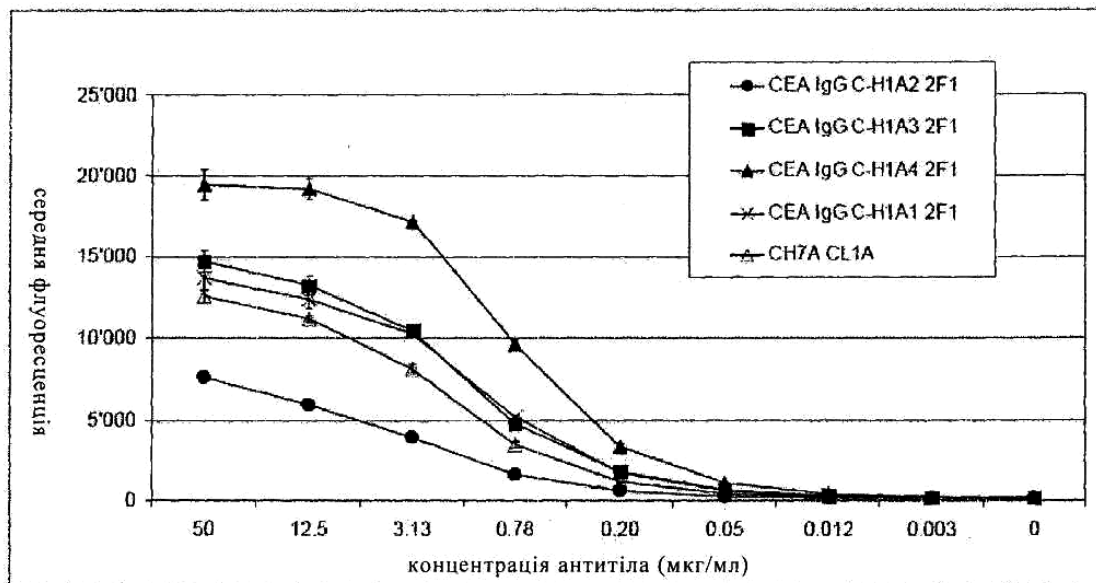
Фіг. 15



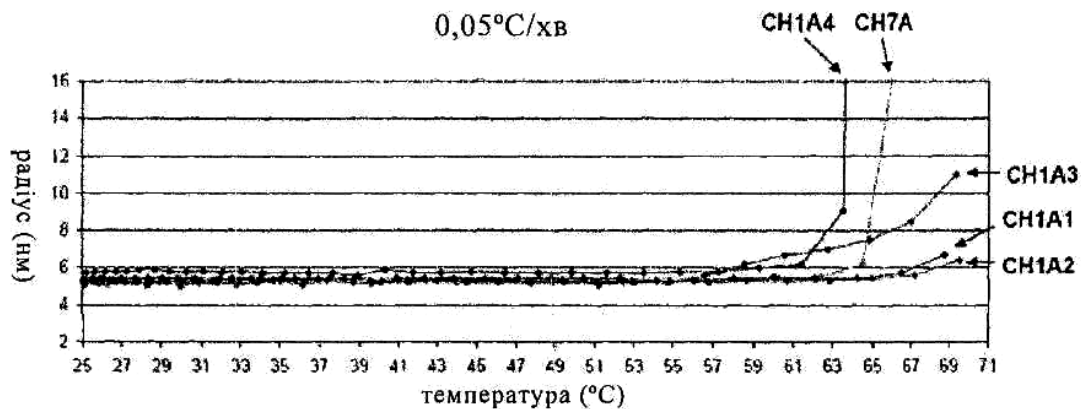
Фіг. 16



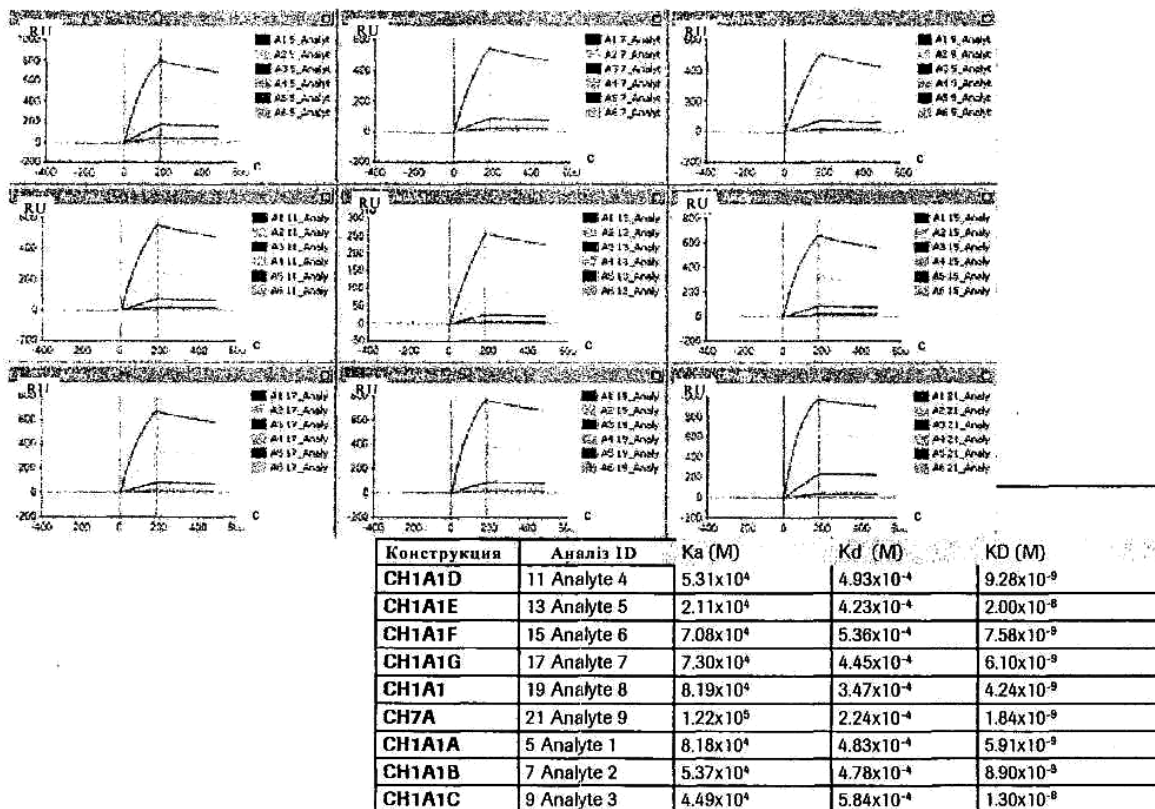
Фіг. 17



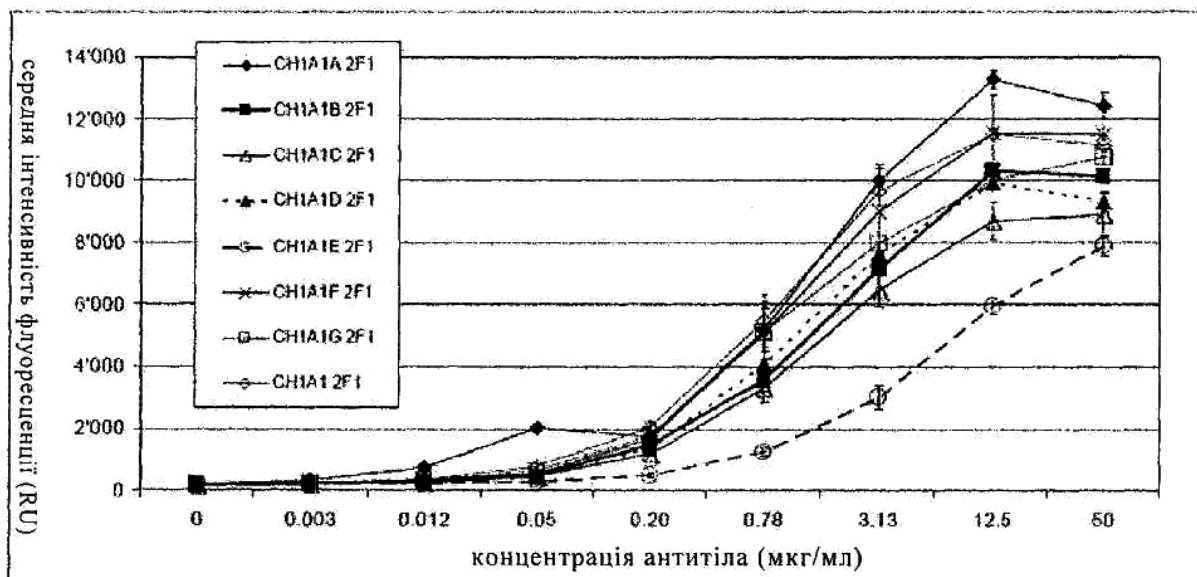
Фіг. 18



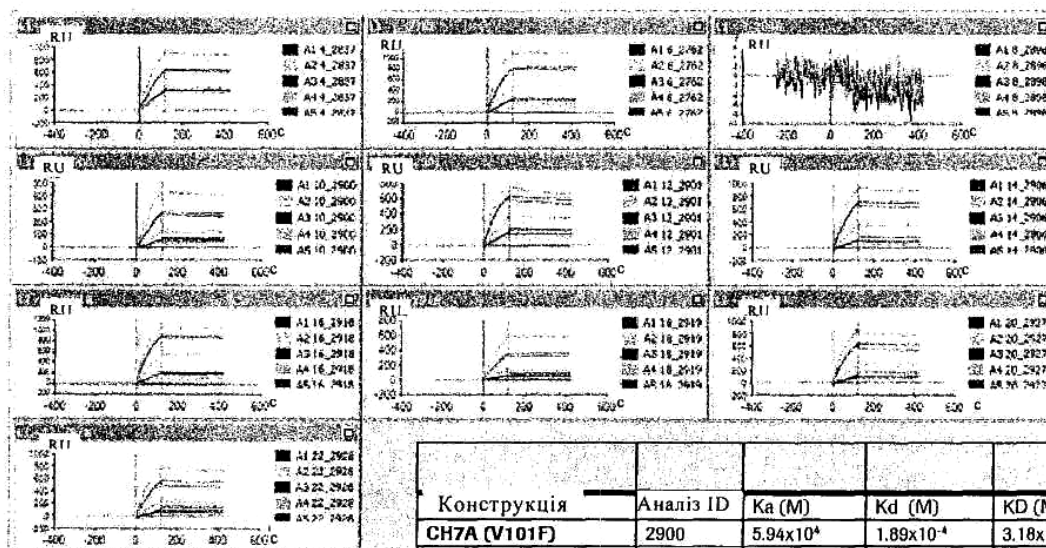
Фіг. 19



Фіг. 20

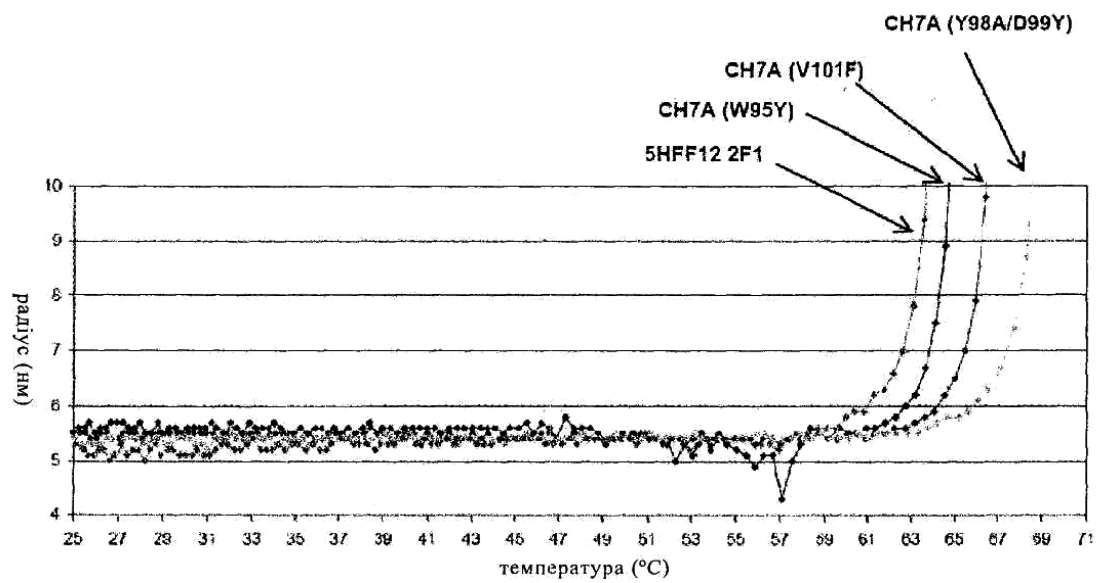


Фіг. 21

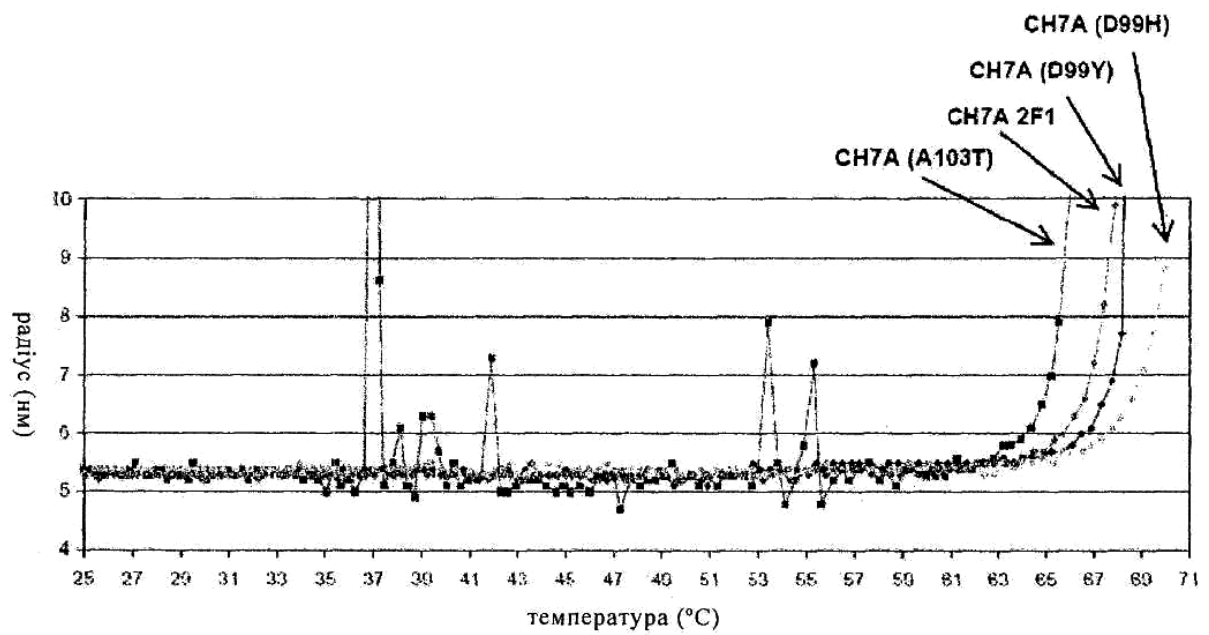


Конструкція	Аналіз ID	Ka (M)	Kd (M)	KD (M)
CH7A (V101F)	2900	5.94×10^4	1.89×10^{-4}	3.18×10^{-9}
CH7A (E102Q)	2901	1.98×10^5	3.24×10^{-4}	1.63×10^{-9}
CH7A (Y98A)	2906	1.32×10^5	6.86×10^{-5}	5.20×10^{-10}
CH7A (Y98A/D99Y)	2918	2.36×10^5	4.40×10^{-5}	1.86×10^{-10}
CH7A (A103T)	2919	2.51×10^4	7.20×10^{-5}	2.87×10^{-9}
CH7A (D99Y)	2927	1.14×10^5	1.97×10^{-4}	1.73×10^{-9}
CH7A (D99H)	2928	8.65×10^4	1.95×10^{-4}	2.25×10^{-9}
CH7A CL1A 2F1	2837	1.32×10^5	1.41×10^{-4}	1.07×10^{-9}
5HFF12 2F1	2762	1.52×10^5	1.94×10^{-5}	1.28×10^{-10}
CH7A (W95Y)	2898	5.61×10^{-4}	109.73	1.95×10^5

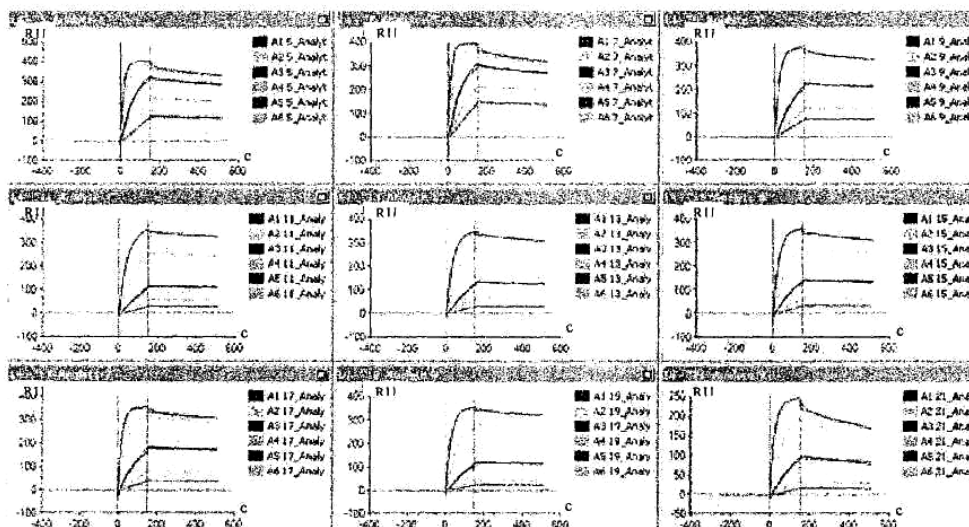
Фіг. 22



Фіг. 23

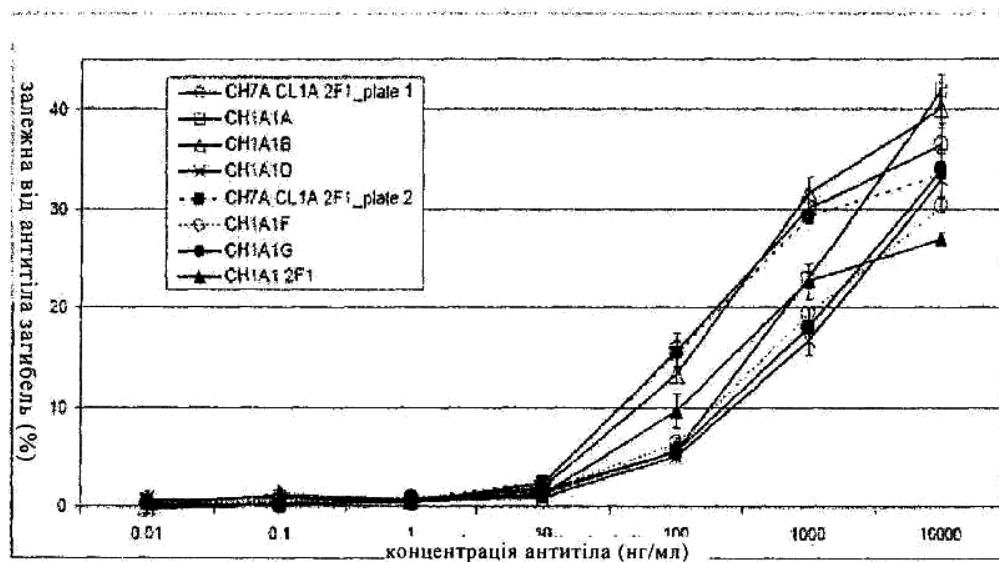


Фіг. 24

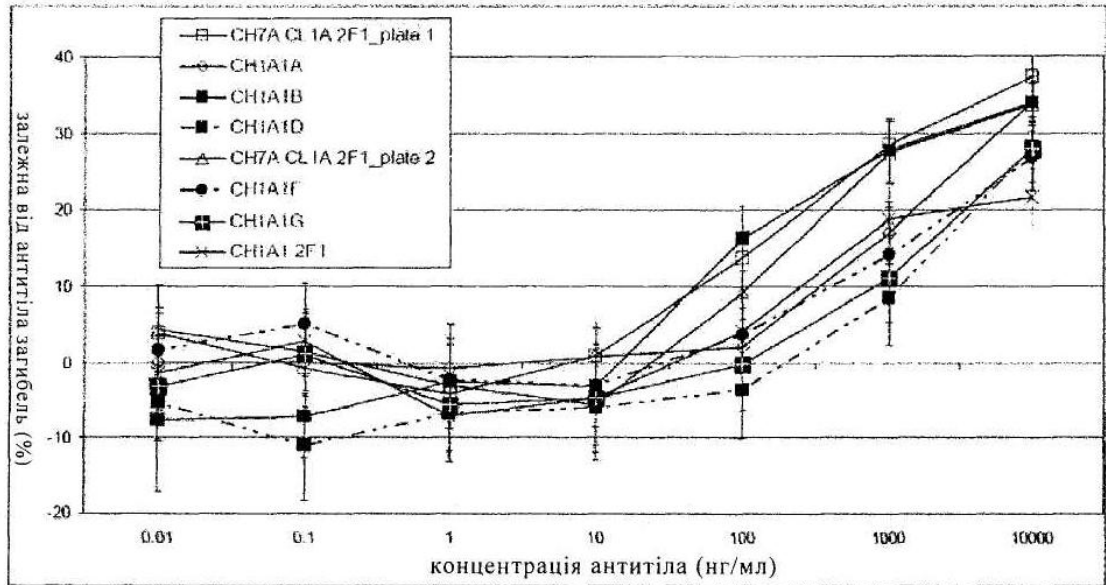


Конструкція	Аналіз ID	Ka (M)	Kd (M)	KD (M)
CH1B 5L1A10 2F1	11 Analyte 4	2.21×10^5	1.54×10^{-4}	6.98×10^{-10}
CH1A1A 5L1A10 2F1	13 Analyte 5	2.80×10^5	2.18×10^{-4}	7.80×10^{-10}
CH1A1B 5L1A10 2F1	15 Analyte 6	3.30×10^5	2.47×10^{-4}	7.47×10^{-10}
CH7A (Y98A/D99Y) 2F1	17 Analyte 7	4.81×10^5	2.24×10^{-4}	4.65×10^{-10}
5L1A10 2F1	19 Analyte 8	3.36×10^5	1.78×10^{-4}	5.29×10^{-10}
CH7A 2F1	21 Analyte 9	3.69×10^5	7.27×10^{-4}	1.97×10^{-9}
CH1A1A (Y98A/D99Y) 2F1	5 Analyte 1	6.28×10^5	3.37×10^{-4}	5.37×10^{-10}
CH1A1B (Y98A/D99Y) 2F1	7 Analyte 2	7.11×10^5	3.61×10^{-4}	5.07×10^{-10}
CH1B (Y98A/D99Y) 2F1	9 Analyte 3	4.19×10^5	2.45×10^{-4}	5.85×10^{-10}

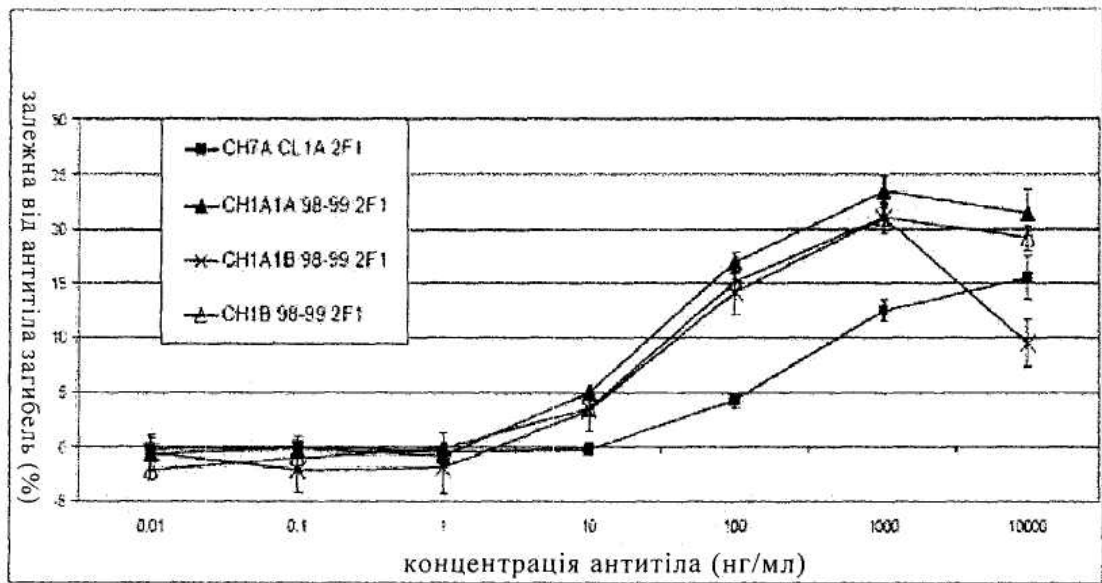
Фіг. 25



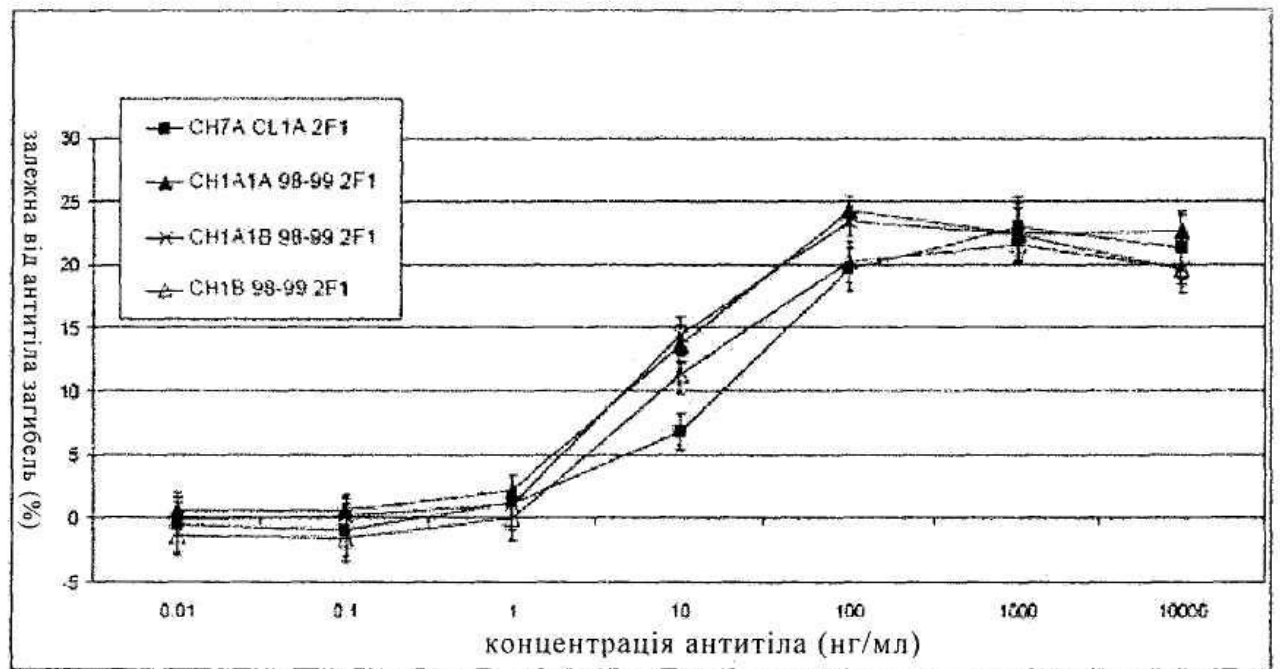
Фіг. 26



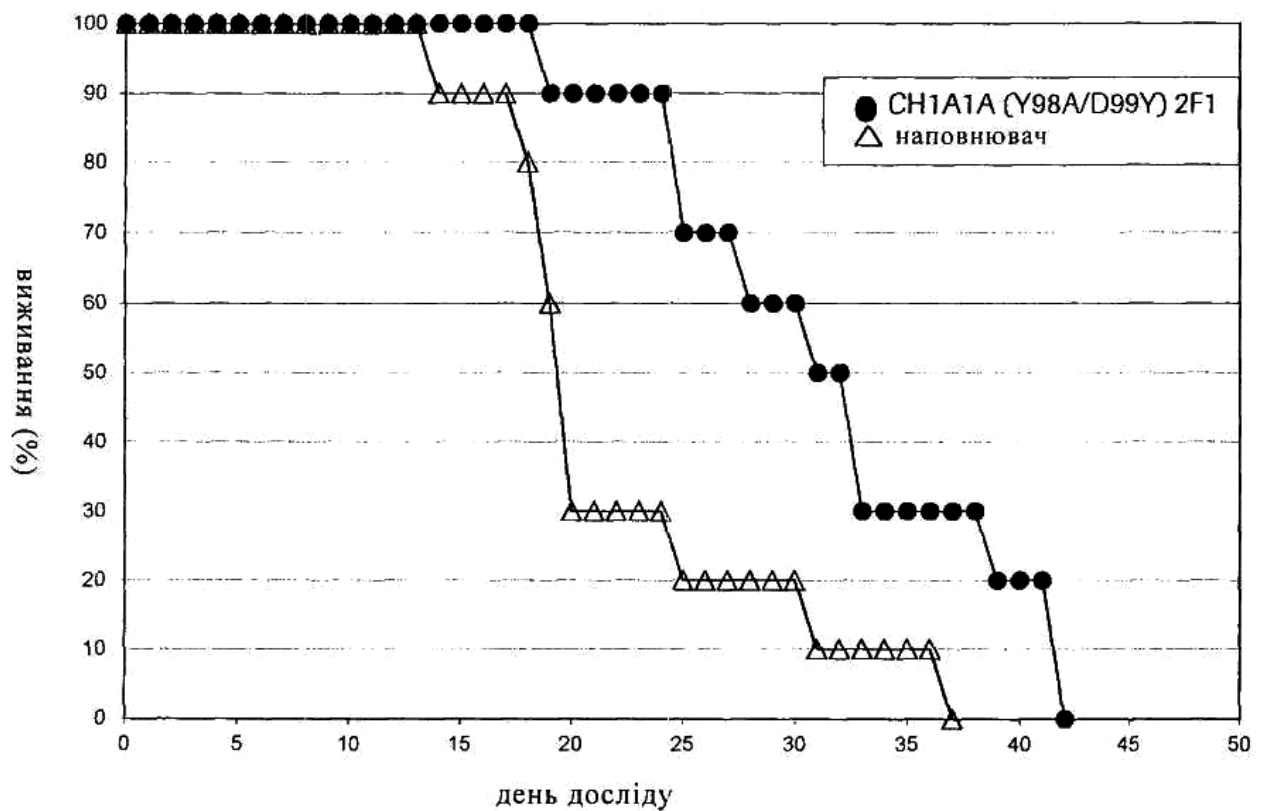
Фіг. 27



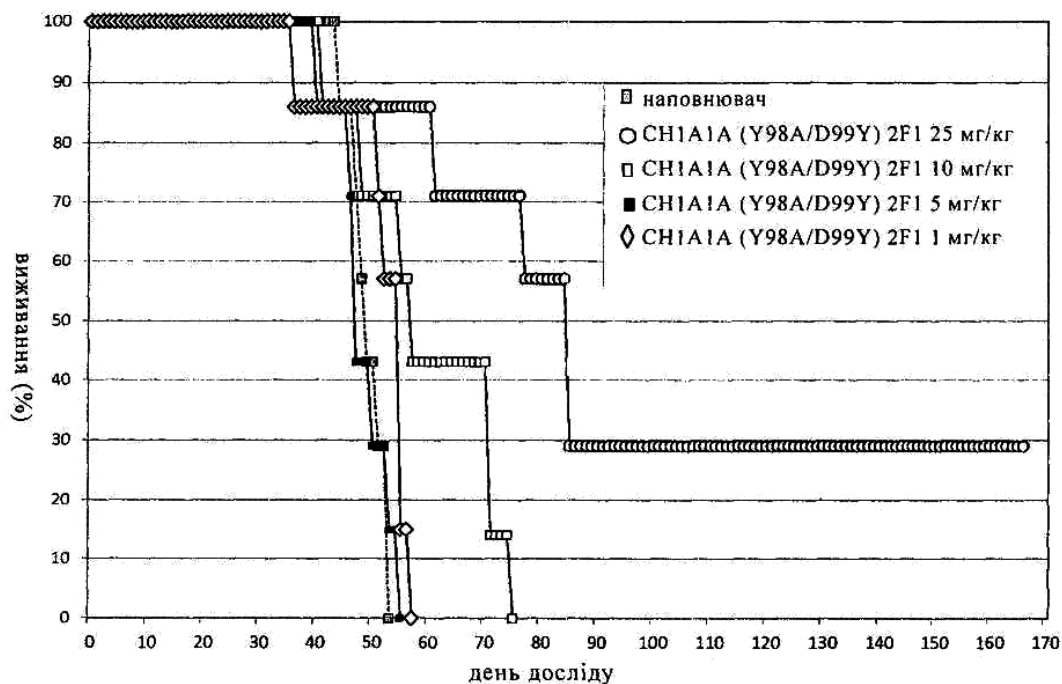
Фіг. 28



Фіг. 29



Фіг. 30



Фіг. 31

CDR		Амінокислотна посл.	SEQ ID NO
CDR1 важкого ланцюга	Ксбот	EFGMN	1
		EYGMN	2
		EYSMN	3
		EFGMS	5
	Хотеа	GYTFTEF	6
		GYTFTEY	7
		GYTFTEFGMN	8
		GYTFTEYGMN	9
	AbM	GYTFTEYSMN	10
		GYTFTEFGMS	12
		WINTKTGEATYVEEFKG	13
		WINTKTGEATYIEEFKG	14
CDR2 важкого ланцюга	Ксбот	WINTKSGEATYVEEFKG	15
		YINTKNGEANYVEEFKG	16
		WINTKNGEATYIEEFKG	17
		NTKTGEAT	18
	Хотеа	NTKSGEAT	19
		NTKNGEAN	20
		WINTKTGEAT	21
		WINTKSGEAT	22
	AbM	YINTKNGEAN	23
		WINTKNGEAN	24
		WDFYDYVEAMDY	25
CDR3 важкого ланцюга	Ксбот	WDFYHYVEAMDY	26
		WDFVDYVEAMDY	27
		WDFYWYVEAMDY	28
		WDAFEYVKALDY	29
	Хотеа	WDFFEYFKTMDY	30
		WDFFYVQTM DY	31
		WDFSYYVEAMDY	32
		WDFAHYFQTM DY	33
	i AbM	WDFAYYFQTM DY	34
		WDFAYYLEAMDY	35

CDR		Амінокислотна посл.	SEQ ID NO
CDR1 легкого ланцюга		KASQNVGTNVA	36
		KASANVGNNVA	37
		KASKNVGTNVA	38
		KASAAVGTYYVA	39
		KASQYASTNVA	40
		KASHNVGTNVA	41
		KASQIMGPNVA	42
		KASQIVGTNVA	43
		KASQKVLNVA	44
		KASQTVSANVA	45
CDR2 легкого ланцюга		SASYRYS	46
		YLASNLGG	47
		YLASYPQI	48
		YSASYRKR	49
		YWASYRYS	50
		YSASHRYS	51
		YLASYHES	52
		YSASHRPS	53
		YLASYRYS	54
		YLASYRYR	55
CDR3 легкого ланцюга		HQYYTYPLFT	56

Фіг. 32

SEQ ID NO:	Конструкція легкого ланцюга	Амінокислотна послідовність
207	pAC21 (3A1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASANVGNNAWYQQKPGKAPKLLIYASNRSGGVPSRFSGS SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
208	pAC19 (2C6)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASKNVGTNAWYQQKPGKAPKPLIYASYPQIGVPSRFSGS SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
209	pAC18 (2F1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYYAWYQQKPGKAPKLLIYASRYKRGVPSRFSGS SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
210	pAC23 (2F11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQIASTNAWYQQKPGKAPKLLIYWASRYSGVPSRFSGS SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
211	легкая цепь H4E9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNAWYQQKPGKAPKPLIYASRYSGVPSRFSGS SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
212	L2D2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASHNVGTNAWYQQKPGKAPKLLIYASHRYSRVPSRFSGS SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
213	pAC6 (C1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQIMGNVNAWYQQKPGKAPKLLIYASVHESGVPSRFSGS SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
214	pAC7 (E10)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQIVGTNAWYQQKPGKAPKLLIYASHRPSGVPSRFSGS SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
215	pAC12 (H7)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQKVLNAWYQQKPGKAPKLLIYASRYSGVPSRFSGS SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT
216	pAC13 (H11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQTVSANVAWYQQKPGKAPKLLIYASRYRGVPSRFSGS SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT

Фіг. 33

SEQ ID NO:	CDR-H3 (рандомізовані залишки представляють собою підкреслені виділені жирним шрифтом залишки)	Афінність (визначена за допомогою Biacore)	Конструкція
25	WDFYDYVEAMDY	3681нМ	PMS22
26	WDFYHYVEAMDY	586нМ	1C8
27	WDFVDYVEAMDY	1893нМ	2E1
28	WDFWYVEAMDY	746нМ	2D7
33	WDFAHYFQTMDY	59нМ	CDRH-3 з дозрілою афінністю
34	WDFAYYFQTMD	44нМ	CDRH-3 з дозрілою афінністю
35	WDFAYYLEAMD	69нМ	CDRH-3 з дозрілою афінністю
29	WDAFEYVKALDY	26нМ	H3, повна бібліотека (5) 19
30	WDFFEYFKTMDY	51нМ	H3, повна бібліотека (5) 8
31	WDFFYVQTMDY	81нМ	H3, повна бібліотека (5) 28
33	WDFSYVEAMDY	132нМ	H3, повна бібліотека (5) 27
	CDR-H1 і CDR-H2		
1 і 13	<u>E</u> FGMN і WINTKT <u>G</u> EATYVEEFKG	3681нМ	PMS22
1 і 14	EFGMN і WINTKTGEATYIEEFKG	402нМ	H4E9
1 і 15	EFGMN і WINTKSGEATYVEEFKG		pAC14 (B9)
2 і 15	EYGMN і WINTKSGEATYVEEFKG		pAC15 (F9)
3 і 16	EYSMN і YINTKNGEAAANYVEEFKG		H1/Y2 (5)2

Фіг. 34A

SEQ ID NO:	CDR-H3 (рандомізовані залишки представляють собою підкреслені виділені жирним шрифтом залишки)	Афінність (визначена за допомогою Biacore)	Конструкція
2 i 17	EYGMN i WINTKNGEATYIEEFKG		H1/H2 (5) 11
1 i 16	EFGMN iYINTKNGEANYVEEFKG		H1/H2 (5) 13
2 i 16	EYGMN i YINTKNGEANYVEEFKG		H1/H2 (5) 14
5 i 13	EFGMS i WINTKTGEATYVEEFKG	26нМ	H3, повна бібліотека (5) 19
	CDR-L1 i CDR-L2		
36 i 46	QNVGTN i YSASYRYS	3681нМ	pMS22
37 i 47	ANVGNN i YLASNLGS	250нМ	pAC21 (3A1)
38 i 48	KNVGTN i YLASYPQI	700нМ	PAC19 (2C6)
39 i 49	AAVGTY i YSASYRKR	220нМ	PAC18 (2F1)
40 i 50	QYASTN iYWASYRYS	290нМ	PAC23 (2F11)
36 i _	QNVGTN i PLI-YSASYRYS	402нМ	H4E9
41 i 51	HNVTGN i YSASHRYS	2255нМ	L2D2
42 i 52	QIMGPN i YLASYHES		pAC6 (C1)
43 i 53	QIVGTN i YSASHRPS		PAC7 (E10)
44 i 54	QKVLTN i YLASYRYS		PAC12 (H7)
45 i 55	QTVSAN i YLASYRYR		PAC13(H11)
	CDR-L3		
56	HQYTYTYPLFT		PMS22

Фіг. 34Б

36/41

Назва клону	Ланцюг	Одновалентна афінність	Двовалентна афінність
PR1A3	wt/wt	$k_{on}: 6,74 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 2,48 \times 10^{-2}$ 1/с; KD 3681×10^{-9} М	$k_{on}: 2,82 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 5,52 \times 10^{-4}$ 1/с; KD 2×10^{-9} М
1C8	hc/wt	$k_{on}: 12,9 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 0,76 \times 10^{-2}$ 1/с; KD 586×10^{-9} М	$k_{on}: 4,67 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 3,24 \times 10^{-4}$ 1/с; KD $0,693 \times 10^{-9}$ М
H4E9	hc/wt	$k_{on}: 5,22 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 0,21 \times 10^{-2}$ 1/с; KD 402×10^{-9} М	$k_{on}: 2,92 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 2,04 \times 10^{-4}$ 1/с; KD $0,7 \times 10^{-9}$ М
H3 Full (5) 19	hc/wt	$k_{on}: 54,2 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 0,13 \times 10^{-2}$ 1/с; KD 24×10^{-9} М	$k_{on}: 9,02 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 1,75 \times 10^{-4}$ 1/с; KD $0,19 \times 10^{-9}$ М
H3 Full (5) 8	hc/wt	$k_{on}: 27,3 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 0,14 \times 10^{-2}$ 1/с; KD 51×10^{-9} М	N/D
3A1	wt/lc	$k_{on}: 46,8 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 1,17 \times 10^{-2}$ 1/с; KD 250×10^{-9} М	$k_{on}: 2,42 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 3,64 \times 10^{-4}$ 1/с; KD $1,5 \times 10^{-9}$ М
2F1	wt/lc	$k_{on}: 95,7 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 2,07 \times 10^{-2}$ 1/с; KD 220×10^{-9} М	$k_{on}: 4,23 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 4,10 \times 10^{-4}$ 1/с; KD $0,952 \times 10^{-9}$ М
5L1A10	hc/wt	$k_{on}: 15,6 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 0,09 \times 10^{-2}$ 1/с; KD 59×10^{-9} М	N/D
5HFF12	hc/wt	$k_{on}: 20,8 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 0,09 \times 10^{-2}$ 1/с; KD 44×10^{-9} М	N/D
M4F1	hc/wt	$k_{on}: 25,7 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 0,17 \times 10^{-2}$ 1/с; KD 69×10^{-9} М	N/D
H4E9 x 2F1	hc/lc	$k_{on}: 36,4 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 0,35 \times 10^{-2}$ 1/с; KD 96×10^{-9} М	$k_{on}: 4,23 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 1,91 \times 10^{-4}$ 1/с; KD $0,452 \times 10^{-9}$ М
H4E9 x 3A1	hc/lc	N/D	$k_{on}: 2,46 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 1,36 \times 10^{-4}$ 1/с; KD $0,55 \times 10^{-9}$ М
1C8 x 2F1	hc/lc	$k_{on}: 68,1 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 0,87 \times 10^{-2}$ 1/с; KD 128×10^{-9} М	$k_{on}: 9,68 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 6,36 \times 10^{-4}$ 1/с; KD $0,66 \times 10^{-9}$ М
1C8 x 3A1	hc/lc	N/D	$k_{on}: 2,89 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 2,57 \times 10^{-4}$ 1/с; KD $0,888 \times 10^{-9}$ М
H3 Full (5) 19 x 2F1	hc/lc	$k_{on}: 206 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 0,25 \times 10^{-2}$ 1/с; KD $12,2 \times 10^{-9}$ М	$k_{on}: 1,76 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 2,84 \times 10^{-4}$ 1/с; KD $0,16 \times 10^{-9}$ М
H3 Full (5) 8 x 2F1	hc/lc	N/D	$k_{on}: 9,93 \times 10^3$ 1/Мс; $k_{off}: 2,71 \times 10^{-4}$ 1/с; KD $0,28 \times 10^{-9}$ М

Фіг. 35

SEQ ID NO:	Конструкції CDR-H3	Амінокислотна послідовність
25	PR1A3 CDR-H3	WDFYDYVEAMDY
33	5HFF12 CDR-H3	WDFAHYFQTMDY
34	5L1A10 CDR-H3	WDFAYYFQTMDY
217	PR1A3 (Y98A)	WDFADYVEAMDY
218	PR1A3 (D99Y)	WDFYYYVEAMDY
219	PR1A3 (D99H)	WDFYHYVEAMDY
220	PR1A3 (V101F)	WDFYDYFEAMDY
221	PR1A3 (E101aQ)	WDFYDYVQAMDY
222	PR1A3 (A103T)	WDFYDYVETMDY
223	PR1A3 (Y98A / D99Y)	WDFAYYVEAMDY
224	PR1A3 (W95Y)	YDFDYVEAMDY

Фіг. 36

SEQ. ID NO:	Конструкція важкого ланцюга	Амінокислотна послідовність
225	CH7A (Y98A)	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFADYVEAMDYWGQGTTVTSS
226	CH7A (D99Y)	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYYYVEAMDYWGQGTTVTSS
227	CH7A (D99H)	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYHYVEAMDYWGQGTTVTSS
228	CH7A (V101F)	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYFEAMDYWGQGTTVTSS
229	CH7A (E102Q)	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYVQAMDYWGQGTTVTSS
230	CH7A (A103T)	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYVETMDYWGQGTTVTSS
231	CH7A (Y98A / D99Y)	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTSS
232	CH7A (W95Y)	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARYDFDYVEAMDYWGQGTTVTSS
233	CH1A1A (Y98A)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRVTFTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFADYVEAMDYWGQGTTVTSS
234	CH1A1A (D99Y)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEE FKGRVTFTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYYYVEAMDYWGQGTTVTSS

Фіг. 37A

SEQ. ID NO:	Конструкція важкого ланцюга	Амінокислотна послідовність
235	CH1A1A (D99H)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYHYVEAMDYWGQGTITVTVSS
236	CH1A1A (V101F)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYFEAMDYWGQGTITVTVSS
237	CH1A1A (E102Q)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVQAMDYWGQGTITVTVSS
238	CH1A1A (A103T)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVETMDYWGQGTITVTVSS
239	CH1A1A (Y98A / D99Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSS
240	CH1A1B (W95Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYDFDYVEAMDYWGQGTITVTVSS
241	CH1A1B (Y98A)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFADYVEAMDYWGQGTITVTVSS
242	CH1A1B (D99Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYYYVEAMDYWGQGTITVTVSS
243	CH1A1B (D99H)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYHYVEAMDYWGQGTITVTVSS
244	CH1A1B (V101F)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYFEAMDYWGQGTITVTVSS

Фиг. 37Б

SEQ. ID NO:	Конструкція важкого ланцюга	Амінокислотна послідовність
245	CH1A1B (E102Q)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVQAMDYWGQGTITVTVSS
246	CH1A1B (A103T)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVETMDYWGQGTITVTVSS
247	CH1A1B (Y98A / D99Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSS
248	CH1A1B (W95Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYDFDYVEAMDYWGQGTITVTVSS
261	CH1A1A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVEAMDYWGQGTITVTVSS
262	CH1A1B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVEAMDYWGQGTITVTVSS
263	CH1A1C	QVQLVQSGPELKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFYDYVEAMDYWGQGTITVTVSS

Фиг. 37В

VH (за Кеботом)		CDR H1	CDR H2
PR1A3	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTEFGMNHWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYYEEFKGR		
CH1A (Y98A)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTEFGMNHWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYYEEFKGR		
CH1A (D99Y)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTEFGMNHWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYYEEFKGR		
CH1A (D99H)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTEFGMNHWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYYEEFKGR		
CH1A (Y98A/D99Y)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTEFGMNHWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYYEEFKGR		
CH1A1A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTEFGMNHWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYYEEFKGR		
CH1A1A (Y98A)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTEFGMNHWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYYEEFKGR		
CH1A1A (D99Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTEFGMNHWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYYEEFKGR		
CH1A1A (D99H)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTEFGMNHWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYYEEFKGR		
CH1A1A (Y98A/D99Y)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTEFGMNHWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYYEEFKGR		
		CDR H3	
PR1A3	FVFSLDTSVSTAYLQISSLKAE DTAVVYCARWDFYDYVEAM	DYWGQGT TTVTVSS	SEQ ID NO: 281
CH1A (Y98A)	FVFSLDTSVSTAYLQISSLKAE DTAVVYCARWDFADYVEAM	DYWGQGT TTVTVSS	SEQ ID NO: 282
CH1A (D99Y)	FVFSLDTSVSTAYLQISSLKAE DTAVVYCARWDFYDYVEAM	DYWGQGT TTVTVSS	SEQ ID NO: 283
CH1A (D99H)	FVFSLDTSVSTAYLQISSLKAE DTAVVYCARWDFYHYVEAM	DYWGQGT TTVTVSS	SEQ ID NO: 284
CH1A (Y98A/D99Y)	FVFSLDTSVSTAYLQISSLKAE DTAVVYCARWDFADYVEAM	DYWGQGT TTVTVSS	SEQ ID NO: 285
CH1A1A	VFTTDTYSTSTAYMELRSLRSDDTAVVYCARWDFYDYVEAM	DYWGQGT TTVTVSS	SEQ ID NO: 286
CH1A1A (Y98A)	VFTTDTYSTSTAYMELRSLRSDDTAVVYCARWDFADYVEAM	DYWGQGT TTVTVSS	SEQ ID NO: 287
CH1A1A (D99Y)	VFTTDTYSTSTAYMELRSLRSDDTAVVYCARWDFYDYVEAM	DYWGQGT TTVTVSS	SEQ ID NO: 288
CH1A1A (D99H)	VFTTDTYSTSTAYMELRSLRSDDTAVVYCARWDFYHYVEAM	DYWGQGT TTVTVSS	SEQ ID NO: 289
CH1A1A (Y98A/D99Y)	VFTTDTYSTSTAYMELRSLRSDDTAVVYCARWDFADYVEAM	DYWGQGT TTVTVSS	SEQ ID NO: 290

Фіг. 38

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601