



УКРАЇНА

(19) UA (11) 93875 (13) C2

(51) МПК (2011.01)  
C07K 16/30 (2006.01)  
C12N 5/24 (2006.01)  
A61K 39/395  
G01N 33/574  
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) ВИДІЛЕНЕ ХИМЕРНЕ АБО ГУМАНІЗОВАНЕ АНТИТІЛО, ЯКЕ СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З ПОЛІПЕПТИДОМ ТАТ10772 (CA125)**

1

2

(21) a200800374  
(22) 14.06.2006  
(24) 25.03.2011  
(86) PCT/US2006/023099, 14.06.2006  
(31) 60/692,092  
(32) 20.06.2005  
(33) US  
(31) 60/793,951  
(32) 21.04.2006  
(33) US  
(46) 25.03.2011, Бюл.№ 6, 2011 р.  
(72) ДЕННІС МАРК, US, МАЛЛЕТ ВІЛЛ'ЯМ, US, ПОЛАКІС ПОЛ, US  
(73) ДЖЕНЕНТЕК, ІНК., US  
(56) WO A2 2004035537, 29.04.2004.  
WO A2 02092836, 21.11.2002.  
WO A2 0206317, 24.01.2002.  
WO A2 2005005638, 20.01.2005.  
YIN B W T ET AL: "Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 276, no. 29, 20 July 2001 (2001-07-20), pages 27371-27375, XP002953227 ISSN: 0021-9258.  
WO A2 2005081711, 09.09.2005.  
WO A2 2004005470, 15.01.2004.  
WO A2 2005080432, 01.09.2005.  
(57) 1. Виділене химерне або гуманізоване антитіло, яке специфічно зв'язується з поліпептидом ТАТ10772 (CA125), що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:2, де антитіло містить три гіперваріабельні ділянки легкого ланцюга (HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3) і три гіперваріабельні ділянки важкого ланцюга (HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3), де:  
(a) HVR-L1 містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:119;  
(b) HVR-L2 містить амінокислотну послідовність, представлену в будь-якій з SEQ ID NOs:120-121;  
(c) HVR-L3 містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:122;

(d) HVR-H1 містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:123;  
(e) HVR-H2 містить амінокислотну послідовність, представлену в будь-якій з SEQ ID NOs:124-127; і  
(f) HVR-H3 містить амінокислотну послідовність, представлену в будь-якій з SEQ ID NOs:128-183.  
2. Виділене антитіло за п. 1, яке додатково містить послідовність акцепторної людської консенсусної каркасної ділянки VH, представлену в будь-якій з SEQ ID NOs:184-193.  
3. Виділене антитіло за п. 1, яке додатково містить послідовність акцепторної людської консенсусної каркасної ділянки VL, представлену в будь-якій з SEQ ID NOs:194-197.  
4. Виділене антитіло за п. 1, яке додатково містить послідовність акцепторної людської консенсусної каркасної ділянки VH, представлену в будь-якій з SEQ ID NOs:184-193, і послідовність акцепторної людської консенсусної каркасної ділянки VL, представлену в будь-якій з SEQ ID NOs:194-197.  
5. Антитіло за п. 1, яке являє собою фрагмент антитіла.  
6. Антитіло за п. 1, яке являє собою химерне або гуманізоване антитіло.  
7. Антитіло за п. 1, кон'юговане із інгібуючим ріст агентом.  
8. Антитіло за п. 1, кон'юговане із цитотоксичним агентом.  
9. Антитіло за п. 8, де цитотоксичний агент вибраний із групи, яка включає токсини, антибіотики, радіоактивні ізотопи і нуклеолітичні ферменти.  
10. Антитіло за п. 8, у якому цитотоксичний агент являє собою токсин.  
11. Антитіло за п. 10, у якому токсин вибраний із групи, яка включає майтансиноїд і каліхеаміцин.  
12. Антитіло за п. 10, у якому токсин являє собою майтансиноїд.  
13. Антитіло за п. 1, яке продукується в бактеріях.  
14. Антитіло за п. 1, яке продукується в CHO-клітинах.  
15. Антитіло за п. 1, яке індукуює загибель клітини, з якою воно зв'язується.

(19) UA (11) 93875 (13) C2

16. Антитіло за п. 15, де зазначена клітина являє собою клітину раку яєчника.  
 17. Антитіло за п. 1, яке несе мітку, що виявляється.  
 18. Антитіло за п. 1, яке містить VH послідовність, представлену в SEQ ID NO:208.  
 19. Антитіло за п. 1, яке містить VL послідовність, представлену в SEQ ID NO:211.  
 20. Антитіло за п. 1, яке містить VH послідовність, представлену в SEQ ID NO:208 і VL послідовність, представлену в SEQ ID NO:211.  
 21. Кон'югат антитіло-лікарський засіб, який містить антитіло, ковалентно приєднане за допомогою лінкера до одного або декількох фрагментів токсичних лікарських засобів, де кон'югат має формулу:  
 Ab-(L-D)<sub>p</sub>,  
 або його фармацевтично прийнятна сіль або сольват, де:  
 Ab являє собою антитіло за п. 1;  
 L являє собою лінкер;  
 D являє собою цитотоксичний агент, вибраний із токсинів, антибіотиків, радіоактивних ізотопів або нуклеолітичних ферментів; і  
 p дорівнює від 1 до приблизно 20.  
 22. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 21, де Ab являє собою 3A5.  
 23. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 21, де D являє собою майтансиноід.  
 24. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 23, де майтансиноід являє собою DM1.  
 25. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 21, де D являє собою ауристин.  
 26. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 25, де ауристин являє собою MMAE або MMAF.  
 27. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 21, де L являє собою MC-val-cit-PAB або MC.  
 28. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 21, де L являє собою SMCC, SPP, або BMPEO.  
 29. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 21, вибраний із формули: Ab-MC-val-cit-PAB-MMAE, Ab-MC-val-cit-PAB-MMAF, Ab-MC-MMAE, Ab-MC-MMAF, Ab-SPP-DM1, і Ab-SMCC-DM1.  
 30. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 29, де Ab являє собою 3A5.  
 31. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 21, де антитіло приєднане до лінкера за допомогою тіолу цистеїну антитіла.  
 32. Фармацевтична композиція, яка містить кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 21 і фармацевтично прийнятний розчинник, носій або наповнювач.

33. Фармацевтична композиція за п. 32, яка додатково містить терапевтично ефективну кількість хіміотерапевтичного агента, вибраного із летрозолу, оксаліплатину, доксетакселу, 5-FU, лейковорину, лапатинібу і гемцитабіну.  
 34. Спосіб інгібування клітинної проліферації, який включає обробку пухлинних клітин ссавця в середовищі для культивування клітин кон'югатом антитіло-лікарський засіб за п. 21, в результаті чого інгібується проліферація пухлинних клітин.  
 35. Спосіб за п. 21, де пухлинними клітинами ссавця є пухлинні клітини яєчника.  
 36. Спосіб лікування злоякісного новоутворення, який включає введення пацієнту композиції фармацевтичної композиції за п. 32.  
 37. Спосіб за п. 36, де злоякісне новоутворення вибране із групи, яка включає рак передміхурової залози, рак сечових шляхів, рак підшлункової залози, рак легень, рак молочної залози, рак ободової кишки і рак яєчника.  
 38. Спосіб за п. 36, де пацієнту вводять хіміотерапевтичний агент в комбінації з кон'югатом антитіло-лікарський засіб, де хіміотерапевтичний агент вибирають із летрозолу, оксаліплатину, доксетакселу, 5-FU, лейковорину, лапатинібу і гемцитабіну.  
 39. Спосіб виявлення ракових клітин, який включає:  
 (а) піддавання клітин впливу кон'югату антитіло-лікарський засіб за п. 21; і  
 (б) визначення ступеня зв'язування сполуки кон'югату антитіло-лікарський засіб із клітинами.  
 40. Спосіб за п. 39, де клітини являють собою клітини пухлин передміхурової залози, підшлункової залози, легень, молочної залози, ободової кишки або яєчника.  
 41. Виріб, який включає  
 кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 21;  
 контейнер; і  
 листівку-вкладиш або етикетку, де вказано, що кон'югат можна застосовувати для лікування злоякісного новоутворення, яке характеризується понадекспресією зв'язаного із пухлиною поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність, яка принаймні на 80 % ідентична до амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO:2.  
 42. Виріб за п. 41, де злоякісне новоутворення являє собою рак передміхурової залози, рак сечових шляхів, рак підшлункової залози, рак легень, рак молочної залози, рак ободової кишки або рак яєчника.

#### Посилання на споріднені заявки

Дана заявка являє собою неопередню заяву, подану відповідно до 37 C.F.R. § 1.53(b)(1), яка претендує на пріоритет відповідно до 35 U.S.C § 119(e) попередніх заявок сер. № 60/692092, що подана 20 червня 2005 р., і сер. № 60/793951, що подана 21 квітня 2006 р., повний зміст яких включений в даний опис як посилання.

Галузь техніки, якої стосується винахід

Даний винахід стосується композицій, пропонує у винаході, які можна застосовувати для діагностики та лікування пухлини у ссавців, і способів застосування для цієї мети композицій, пропонує у винаході.

#### Передумови створення винаходу

Смертність від злоякісних пухлин (різних типів раку) знаходиться на другому місці в Сполучених Штатах після серцево-судинних захворювань



(Boring та ін., CA Cancer J. Clin. 43, 1993, с. 7). Рак характеризується збільшенням кількості аномальних або неопластичних клітин, які утворюються зі здорових тканин, які проліферують, формуючи пухлинну масу, інвазією зазначених неопластичних пухлинних клітин у сусідні тканини й утворенням злоякісних клітин, які зрештою поширюються через кровотік або лімфатичну систему в регіональні лімфатичні вузли та у віддалені ділянки за допомогою процесу, який називають метастазуванням. При злоякісному стані відбувається проліферація клітин в умовах, у яких здорові клітини не можуть рости. Рак проявляється в широкій розмаїтості форм, які відрізняються різним ступенем інвазивності та агресивності.

При створенні даного винаходу з метою виявлення ефективних клітинних мішеней для діагностики та терапії раку розпочаті спроби ідентифікації трансмембранних або інших асоційованих з мембранами поліпептидів, які специфічно експресуються на поверхні одного або декількох типів ракових клітин, у порівнянні з одним або декількома типами здорових неракових клітин. У багатьох випадках рівень експресії таких поліпептидів, асоційованих з мембраною клітин, вищий на поверхні ракових клітин у порівнянні з їх експресією на поверхні неракових клітин. Ідентифікація зазначених асоційованих з пухлиною поліпептидів, які являють собою антигени клітинної поверхні, дає можливість специфічно руйнувати ракові клітини за допомогою терапії, заснованої на застосуванні антитіл. У цьому зв'язку слід зазначити, що терапія, заснована на застосуванні антитіл, є дуже ефективною при лікуванні певних типів раку. Наприклад, HERCEPTIN® і RITUXAN® (обидва препарати фірми Genentech Inc., Південний Сан-Франциско, шт. Каліфорнія) являють собою антитіла, які успішно застосовують для лікування раку молочної залози та не-ходжкінської лімфоми відповідно. Більш конкретно, HERCEPTIN® являє собою одержане з рекомбінантної ДНК моноклональне антитіло, які селективно зв'язується з позаклітинним доменом рецептора 2 людського епідермального фактора росту (HER2), який являє собою проонкоген. Надекспресія білка HER2 виявлена в 25-30% випадків первинного раку молочної залози. RITUXAN® являє собою створене за допомогою генної інженерії химерне мишаче/людське моноклональне антитіло до антигену CD20, що присутній на поверхні здорових і злоякісних В-лімфоцитів. Обидва ці антитіла одержують рекомбінантним шляхом в CHO-клітинах.

Незважаючи на досягнуті успіхи в галузі терапії раку в ссавців, існує велика потреба в додаткових діагностичних і терапевтичних агентах, які мають здатність виявляти присутність пухлини в ссавця й ефективно інгібувати ріст неопластичних клітин відповідно. Таким чином, об'єктом даного винаходу є ідентифікація асоційованих з мембраною поліпептидів, рівень експресії яких вищий на поверхні одного або декількох типів ракових клітин у порівнянні зі здоровими клітинами або іншими типами ракових клітин, і застосування зазначених поліпептидів і кодуючих їх нуклеїнових кислот для одержання композицій, пропонованих у винаході,

які можна застосовувати для терапевтичного лікування та діагностичного виявлення раку в ссавців.

Стислий виклад суті винаходу

A. Варіанти здійснення винаходу

При створенні даного винаходу вперше були ідентифіковані клітинні поліпептиди (і кодуючі їх нуклеїнові кислоти, або їх фрагменти), рівень експресії яких на поверхні одного або декількох типів ракових клітин вищий в порівнянні з рівнем експресії на поверхні одного або декількох типів здорових неракових клітин. Ці поліпептиди позначені в контексті даного опису як асоційовані з пухлиною антигенні поліпептиди-мішені (Tumor-associated Antigenic Target polypeptides) («ТАТ»-поліпептиди), і передбачається, що вони є ефективними мішенями при здійсненні терапії та діагностики раку в ссавців.

Таким чином, одним з варіантів здійснення даного винаходу є виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка має нуклеотидну послідовність, яка кодує асоційований з пухлиною антигенний поліпептид-мішень або його фрагмент («ТАТ»-поліпептид).

Конкретним об'єктом даного винаходу є виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, яка, принаймні, приблизно на 80% або в іншому варіанті принаймні приблизно на 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100% ідентична нуклеотидній послідовності (а) молекули ДНК, яка кодує повнорозмірний ТАТ-поліпептид, який має амінокислотну послідовність, що представлена в даному описі, ТАТ-поліпептид, в амінокислотній послідовності якого відсутній сигнальний пептид, представлений у даному описі, позаклітинний домен трансмембранного ТАТ-поліпептиду, який містить або не містить сигнальний пептид, представлений у даному описі, або будь-який інший конкретний фрагмент повнорозмірної амінокислотної послідовності ТАТ-поліпептиду, представлений у даному описі, або (б) комплементу молекули ДНК, зазначеної в (а).

Іншим об'єктом даного винаходу є виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, яка, принаймні приблизно на 80% або в іншому варіанті принаймні приблизно на 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100% ідентична нуклеотидній послідовності (а) молекули ДНК, яка містить кодуючу послідовність кДНК повнорозмірного ТАТ-поліпептиду, наведену в даному описі, кодуючу послідовність ТАТ-поліпептиду, у якій відсутній сигнальний пептид, представлений у даному описі, кодуючу послідовність позаклітинного домену трансмембранного ТАТ-поліпептиду, яка містить або не містить сигнальний пептид, представлений у даному описі, або кодуючу послідовність будь-якого іншого конкретного фрагмента повнорозмірної амінокислотної послідовності ТАТ-поліпептиду, представлений у даному описі, або (б) комплементу молекули ДНК, зазначеної в (а).

Наступними об'єктами даного винаходу є виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, яка, принаймні, приблизно на 80% або в іншому варіанті принаймні

приблизно на 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100% ідентична нуклеотидній послідовності (а) молекули ДНК, яка кодує такий же зрілий поліпептид, який кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою будь-яких кДНК людського білка, депонованих в АТСС, які представлені в даному описі, або (б) комплементу молекули ДНК, зазначеної в (а).

Наступним об'єктом даного винаходу є виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, яка кодує ТАТ-пептид, у якого або трансмембранний домен вилучений у результаті делеції, або трансмембранний домен інактивований, або послідовність, комплементарну зазначеній кодуючій нуклеотидній послідовності, де трансмембранний(і) домен(и) зазначеного(их) пептиду(ів) представлений(и) у даному описі. Таким чином, під обсяг винаходу підпадають розчинні позаклітинні домени представлених у даному описі ТАТ-поліпептидів.

Іншими об'єктами даного винаходу є виділені молекули нуклеїнової кислоти, які гібридизуються з (а) нуклеотидною послідовністю, яка кодує ТАТ-поліпептид, який має повнорозмірну амінокислотну послідовність, що представлена в даному описі, ТАТ-поліпептид, в амінокислотній послідовності якого відсутній сигнальний пептид, представлений у даному описі, позаклітинний домен трансмембранного ТАТ-поліпептиду, який містить або не містить сигнальний пептид, представлений у даному описі, або будь-який інший конкретний фрагмент повнорозмірної амінокислотної послідовності ТАТ-поліпептиду, представлений у даному описі, або з (б) комплементом нуклеотидної послідовності, зазначеної в (а). У цьому зв'язку одним з варіантів здійснення даного винаходу є фрагменти кодуючої послідовності повнорозмірного ТАТ-поліпептиду або її комплементу, представлені в даному описі, яким можна знайти застосування, наприклад, як зонди, що гібридизуються, які придатні, наприклад, як діагностичні зонди, ПЛР-праймери, антисмислові олігонуклеотидні зонди або кодуючі фрагменти повнорозмірного ТАТ-поліпептиду, які необов'язково можуть кодувати поліпептид, який містить сайт зв'язування антитіла до ТАТ-поліпептиду, ТАТ-зв'язуючий олігопептид або іншу невелику органічну молекулу, яка зв'язується з ТАТ-поліпептидом. Такі фрагменти нуклеїнової кислоти, як правило, складаються принаймні приблизно з 5 нуклеотидів, в іншому варіанті принаймні приблизно з 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 або 1000 нуклеотидів, при цьому в контексті даного опису поняття «приблизно» означає, що довжина зазна-

ченої нуклеотидної послідовності може знаходитися в межах плюс або мінус 10% від зазначеної довжини. Крім того, зазначені фрагменти нуклеїнової кислоти, як правило, містять послідовно розташовані нуклеотиди з повнорозмірної кодуючої послідовності ТАТ-поліпептиду або її комплементу. Слід зазначити, що нові фрагменти кодуючої послідовності ТАТ-поліпептиду або її комплементу можна виявляти загальноприйнятим методом шляхом порівняльного аналізу первинної структури кодуючої послідовності ТАТ-поліпептиду та інших відомих нуклеотидних послідовностей з використанням будь-якої із численних добре відомих програм для порівняльного аналізу первинної структури, визначаючи в такий спосіб які(ий) фрагмент(и) кодуючої послідовності ТАТ-поліпептиду або її комплементу являється(ються) новими. Під обсяг винаходу підпадають всі такі нові фрагменти кодуючої послідовності ТАТ-поліпептиду або її комплементу. Під обсяг винаходу підпадають також фрагменти ТАТ-поліпептиду, які кодуються цими фрагментами нуклеотидної молекули, переважно такі фрагменти ТАТ-поліпептиду, які містять сайт зв'язування антитіла до ТАТ, ТАТ-зв'язуючий олігопептид або іншу невелику органічну молекулу, яка зв'язується з ТАТ-поліпептидом.

Наступним варіантом здійснення винаходу є виділені ТАТ-поліпептиди, які кодуються будь-якими виділеними нуклеотидними послідовностями, зазначеними вище.

Одним з об'єктів винаходу є виділений ТАТ-поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, яка ідентична принаймні приблизно на 80%, в іншому варіанті принаймні приблизно на 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100% амінокислотній послідовності ТАТ-поліпептиду, який має повнорозмірну амінокислотну послідовність, представлена у даному описі, амінокислотній послідовності ТАТ-поліпептиду, у якій відсутній сигнальний пептид, представлена в даному описі, позаклітинного домену трансмембранного білка ТАТ-поліпептиду, який містить або не містить сигнальний пептид, представлена в даному описі, або будь-якого іншого конкретного фрагмента повнорозмірної амінокислотної послідовності ТАТ-поліпептиду, представлена в даному описі.

Іншим об'єктом винаходу є виділений ТАТ-поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, яка, принаймні, приблизно на 80% ідентична, в іншому варіанті принаймні приблизно на 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99% ідентична амінокислотній послідовності, яка кодується будь-якими кДНК людського білка, депонованими в АТСС, які представлені в даному описі.

І ще одним об'єктом винаходу є виділений ТАТ-поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, яка гібридизується з комплементом молекули ДНК, яка кодує (а) ТАТ-поліпептид, який має повнорозмірну амінокислотну послідовність, що представлена в даному описі, (б) амінокислотну послідовність ТАТ-поліпептиду, у якій відсутній сигнальний пептид, представлена в даному описі,

(в) позаклітинний домен трансмембранного білка ТАТ-поліпептиду, який містить або не містить сигнальний пептид, представлений у даному описі, (г) амінокислотну послідовність, яка кодується будь-якими представленими в даному описі нуклеотидними послідовностями, або (д) будь-який інший конкретний фрагмент повнорозмірної амінокислотної послідовності ТАТ-поліпептиду, представлений у даному описі.

Конкретним об'єктом даного винаходу є виділений ТАТ-поліпептид без N-кінцевої сигнальної послідовності і/або без ініціюючого метіоніну та який кодується нуклеотидною послідовністю, яка кодує наведену в даному описі амінокислотну послідовність. Описані також способи їх одержання, які полягають у тому, що культивують клітину-хазяїна, яка містить вектор, який несе відповідну молекулу нуклеїнової кислоти, в умовах, придатних для експресії ТАТ-поліпептиду, і виділяють ТАТ-поліпептид із клітинної культури.

Іншим об'єктом винаходу є виділений ТАТ-поліпептид, у якого або трансмембранний домен видалений у результаті делеції, або трансмембранний домен інактивований. Описані також способи їх одержання, які полягають у тому, що культивують клітину-хазяїна, яка містить вектор, який несе відповідну молекулу нуклеїнової кислоти, в умовах, придатних для експресії ТАТ-поліпептиду, і виділяють ТАТ-поліпептид із клітинної культури.

Іншими варіантами здійснення винаходу є вектори, які містять ДНК, яка кодує будь-який із представлених у даному описі поліпептидів. Описані також клітини-хазяї, які містять будь-який зазначений вектор. Клітини-хазяї можуть являти собою, наприклад, СНО-клітини, клітини *E. coli* або дріжджові клітини. Запропонований також спосіб одержання будь-якого із представлених у даному описі поліпептидів, який полягає у тому, що культивують клітини-хазяї в умовах, придатних для експресії необхідного поліпептиду, і виділяють необхідний поліпептид із клітинної культури.

Іншими варіантами здійснення винаходу є виділені химерні поліпептиди, які містять будь-які із представлених у даному описі ТАТ-поліпептидів, злиті з гетерологічним (не-ТАТ) поліпептидом. Наведені як приклад зазначені химерні молекули містять будь-який із представлених у даному описі ТАТ-поліпептидів, злитий з гетерологічним поліпептидом, таким, наприклад, як послідовність епітопу-мітки або Fc-ділянка імуноглобуліну.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, яке зв'язується, переважно специфічно, з будь-яким з описаних вище або нижче поліпептидів. Антитіло необов'язково являє собою моноклональне антитіло, фрагмент антитіла, химерне антитіло, гуманізоване антитіло, однокланове антитіло або антитіло, яке конкурентно інгібує зв'язування антитіла до ТАТ-поліпептиду з відповідним антигенним епітопом. Антитіла, пропоновані в даному винаході, необов'язково можна кон'югувати із інгібуючим ріст агентом або цитотоксичним агентом, таким як токсин, включаючи, наприклад, майтансиноїд або каліхеаміцин, антибіотиком, радіоактивним ізотопом, нуклеолітичним ферментом або т.п. Антитіла, пропоновані в даному винаході, не-

обов'язково можна одержувати в СНО-клітинах або бактеріальних клітинах, і переважно вони інгібують ріст або проліферацію або індукують загибель клітини, з якою вони зв'язані. Для діагностичних цілей антитіла, пропоновані в даному винаході, можуть являти собою антитіла, що несуть мітку, яка виявляється прикріплені до твердої підкладки або т.п.

Іншими варіантами здійснення даного винаходу є вектори, які містять ДНК, яка кодує будь-яке із представлених у даному описі антитіл. Запропоновані також клітини-хазяї, які містять будь-який зазначений вектор. Наприклад, клітини-хазяїни можуть являти собою СНО-клітини, клітини *E. coli* або дріжджові клітини. Запропонований також спосіб одержання будь-якого з їх представлених у даному описі антитіл, який полягає у тому, що культивують клітини-хазяїни в умовах, придатних для експресії необхідного антитіла, і виділяють необхідне антитіло із клітинної культури.

Іншим варіантом здійснення винаходу є олігопептиди («ТАТ-зв'язуючі олігопептиди»), які зв'язуються, переважно специфічно, з будь-яким із зазначених вище або нижче необхідним ТАТ-поліпептидом. Необов'язково ТАТ-зв'язуючі поліпептиди, пропоновані в даному винаході, можна кон'югувати із інгібуючим ріст агентом або цитотоксичним агентом, таким як токсин, включаючи, наприклад, майтансиноїд або каліхеаміцин, антибіотиком, радіоактивним ізотопом, нуклеолітичним ферментом або т.п. ТАТ-зв'язуючі олігопептиди, пропоновані в даному винаході, можна одержувати в СНО-клітинах або бактеріальних клітинах, і переважно вони інгібують ріст або проліферацію або індукують загибель клітини, з якою вони зв'язані. Для діагностичних цілей ТАТ-зв'язуючі олігопептиди, пропоновані в даному винаході, можуть являти собою олігопептиди, що несуть мітку, яка виявляється, прикріплені до твердої підкладки або т.п.

Іншими варіантами здійснення даного винаходу є вектори, які містять ДНК, яка кодує будь-який із представлених у даному описі ТАТ-зв'язуючий олігопептид. Запропоновані також клітини-хазяї, які містять будь-який зазначений вектор. Наприклад, клітини-хазяїни можуть являти собою СНО-клітини, клітини *E. coli* або дріжджові клітини. Запропонований також спосіб одержання будь-якого з їх представлених у даному описі ТАТ-зв'язуючих олігопептидів, і він полягає у тому, що культивують клітини-хазяїни в умовах, придатних для експресії необхідного олігопептиду, і виділяють необхідний олігопептид із клітинної культури.

Іншим варіантом здійснення винаходу є невеликі органічні молекули («ТАТ-зв'язуючі органічні молекули»), які зв'язуються, переважно специфічно, з будь-яким із зазначених вище або нижче необхідним ТАТ-поліпептидом. Необов'язково ТАТ-зв'язуючі органічні молекули, пропоновані в даному винаході, можна кон'югувати із інгібуючим ріст агентом або цитотоксичним агентом, таким як токсин, включаючи, наприклад, майтансиноїд або каліхеаміцин, антибіотиком, радіоактивним ізотопом, нуклеолітичним ферментом або т.п. ТАТ-зв'язуючі органічні молекули, пропоновані в дано-

му винаході, переважно інгібують ріст або проліферацію або індують загибель клітини, з якою вони зв'язані. Для діагностичних цілей ТАТ-зв'язуючі органічні молекули, пропонувані в даному винаході, можуть являти собою молекули, що несуть мітку, яка виявляється, прикріплені до твердої підкладки, або т.п.

І ще одним варіантом здійснення винаходу є композиція, пропонувана у винаході, яка містить ТАТ-поліпептид, представлений у даному описі, химерний ТАТ-поліпептид, представлений у даному описі, антитіло до ТАТ, представлене в даному описі, ТАТ-зв'язуючий олігопептид, представлений у даному описі, або ТАТ-зв'язуючу органічну молекулу, представлену в даному описі, у сполученні з носієм. Необов'язково носій являє собою фармацевтично прийнятний носій.

І ще одним варіантом здійснення винаходу є виріб у вигляді контейнера й композиції, пропонуваної у винаході, яка знаходиться в контейнері, де композиція, пропонувана у винаході, може містити ТАТ-поліпептид, представлений у даному описі, химерний ТАТ-поліпептид, представлений у даному описі, антитіло до ТАТ, представлене в даному описі, ТАТ-зв'язуючий олігопептид, представлений у даному описі, або ТАТ-зв'язуючу органічну молекулу, представлену в даному описі. Виріб додатково може містити прикріплену до контейнера етикету або листівку-вкладиш у контейнері, на якій наведений спосіб застосування композиції, пропонуваної у винаході, для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення пухлини.

Наступним варіантом здійснення даного винаходу є застосування ТАТ-поліпептиду, представленого в даному описі, химерного ТАТ-поліпептиду, представленого в даному описі, антитіла до ТАТ, представленого в даному описі, ТАТ-зв'язуючого олігопептиду, представленого в даному описі, або ТАТ-зв'язуючої органічної молекули, представлені в даному описі, для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування стану, який сприйнятливий до ТАТ-поліпептиду, химерного ТАТ-поліпептиду, антитіла до ТАТ-поліпептиду, ТАТ-зв'язуючого олігопептиду або ТАТ-зв'язуючої органічної молекули.

Іншими варіантами здійснення винаходу є будь-які виділені антитіла, які містять одну або декілька послідовностей HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 або HVR-H3, представлених у даному описі, або будь-яке антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що й будь-яке зазначене антитіло.

Б. Додаткові варіанти здійснення винаходу

Іншим варіантом здійснення даного винаходу є спосіб інгібування росту клітини, що експресує ТАТ-поліпептид, який полягає у тому, що приводять у контакт клітину з антитілом, олігопептидом або невеликою органічною молекулою, які зв'язуються з ТАТ-поліпептидом, і при цьому зв'язування антитіла, олігопептиду або органічної молекули з ТАТ-поліпептидом викликає інгібування росту клітини, що експресує ТАТ-поліпептид. У кращих варіантах здійснення винаходу клітина являє собою ракову клітину, і зв'язування антитіла, олігопептиду або органічної молекули з ТАТ-поліпептидом

викликає загибель клітини, що експресує ТАТ-поліпептид. Необов'язково антитіло являє собою моноклональне антитіло, фрагмент антитіла, химерне антитіло, гуманізоване антитіло або однокланцове антитіло. Антитіла, ТАТ-зв'язуючі олігопептиди та ТАТ-зв'язуючі органічні молекули, які застосовують у способах, пропонуваних у даному винаході, необов'язково можна кон'югувати із інгібуючим ріст агентом або цитотоксичним агентом, таким як токсин, включаючи, наприклад, майтансиноїд або каліхеаміцин, антибіотиком, радіоактивним ізотопом, нуклеолітичним ферментом або т.п. Антитіла й ТАТ-зв'язуючі олігопептиди, які застосовують у способах, пропонуваних у даному винаході, необов'язково можна одержувати в СНО-клітинах або бактеріальних клітинах.

Ще одним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб терапевтичного лікування ссавця, в організмі якого є присутнім злоякісна пухлина, яка містить клітини, які експресують ТАТ-поліпептид, який полягає у тому, що ссавцю вводять у терапевтично ефективній кількості антитіло, олігопептид або невелику органічну молекулу, які зв'язуються з ТАТ-поліпептидом, що приводить до ефективного терапевтичного лікування пухлини. Необов'язково антитіло являє собою моноклональне антитіло, фрагмент антитіла, химерне антитіло, гуманізоване антитіло або однокланцове антитіло. Антитіла, ТАТ-зв'язуючі олігопептиди та ТАТ-зв'язуючі органічні молекули, які застосовують у способах, пропонуваних у даному винаході, необов'язково можна кон'югувати із інгібуючим ріст агентом або цитотоксичним агентом, таким як токсин, включаючи, наприклад, майтансиноїд або каліхеаміцин, антибіотиком, радіоактивним ізотопом, нуклеолітичним ферментом або т.п. Антитіла й олігопептиди, застосовувані в способах, пропонуваних у даному винаході, необов'язково можна одержувати в СНО-клітинах або бактеріальних клітинах.

І ще одним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб виявлення присутності ТАТ-поліпептиду в зразку, який, як передбачається, містить ТАТ-поліпептид, який полягає у тому, що піддають зразок впливу антитіла, олігопептиду або невеликої органічної молекули, які зв'язуються з ТАТ-поліпептидом, і визначають зв'язування антитіла, олігопептиду або органічної молекули з ТАТ-поліпептидом у зразку, де наявність зв'язування свідчить про присутність у зразку ТАТ-поліпептиду. Необов'язково зразок може містити клітини (які можуть являти собою ракові клітини), які, як передбачається, експресують ТАТ-поліпептид. Антитіло, ТАТ-зв'язуючий олігопептид або ТАТ-зв'язуюча органічна молекула, які застосовують у способі, необов'язково можуть нести мітку, що виявляється, бути прикріпленими до твердої підкладки або т.п.

Наступним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб діагностики наявності пухлини в ссавця, який полягає у тому, що визначають рівень експресії гена, який кодує ТАТ-поліпептид, (а) у тест-зразку тканинних клітин, одержаних з організму ссавця, і (б) у контрольному зразку клітин, взятих із цієї ж тканини або тканини такого ж типу, для яких відомо, що вони являють собою здорові не-

ракові клітини, де більш високий рівень експресії ТАТ-поліпептиду в тест-зразку у порівнянні з контрольним зразком свідчить про наявність пухлини в ссавця, із організму якого одержаний тест-зразок.

Наступним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб діагностики наявності пухлини в ссавця, який полягає у тому, що (а) приводять у контакт тест-зразок, який містить тканинні клітини, які одержані з організму ссавця, з антитілом, олігопептидом або невеликою органічною молекулою, які зв'язуються з ТАТ-поліпептидом, і (б) виявляють утворення комплексу між антитілом, олігопептидом або невеликою органічною молекулою й ТАТ-поліпептидом у тест-зразку, де утворення комплексу свідчить про наявність пухлини в ссавця. Необов'язково застосовуване антитіло, ТАТ-зв'язуючий олігопептид або ТАТ-зв'язуючу органічну молекулу мітять із метою виявлення, прикріплюють до твердої підкладки або т.п., і/або тест-зразок тканинних клітин одержують із організму індивідуума, у якого, як передбачається, присутня злоякісна пухлина.

Наступним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб лікування або попередження пов'язаного із проліферацією клітин захворювання, причиною якого є змінений, переважно підвищений, рівень експресії або активності ТАТ-поліпептиду, який полягає у тому, що індивідуумові, який потребує такого лікування, вводять в ефективній кількості антагоніст ТАТ-поліпептиду. Переважно пов'язане із проліферацією клітин захворювання являє собою рак, а антагоніст ТАТ-поліпептиду являє собою антитіло до поліпептиду ТАТ, ТАТ-зв'язуючий олігопептид, ТАТ-зв'язуючу органічну молекулу або антисмисловий олігонуклеотид. Ефективне лікування або попередження пов'язаного із проліферацією клітин захворювання, може бути результатом безпосереднього знищення клітин або інгібування росту клітин, які експресують ТАТ-поліпептид, або результатом протидії активності ТАТ-поліпептиду, яка потенціює клітинний ріст.

І ще одним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб зв'язування антитіла, олігопептиду або невеликої органічної молекули із клітиною, яка експресує ТАТ-поліпептид, який полягає у тому, що приводять у контакт клітину, яка експресує ТАТ-поліпептид, з антитілом, олігопептидом або невеликою органічною молекулою в умовах, які придатні для зв'язування антитіла, олігопептиду або невеликої органічної молекули з ТАТ-поліпептидом і які дають можливість здійснюватися їх зв'язуванню. У кращих варіантах здійснення винаходу антитіло мітять за допомогою молекули або сполуки, яку можна використовувати для якісного і/або кількісного визначення локалізації і/або кількості антитіла, олігопептиду або невеликої органічної молекули, що зв'язується із клітиною.

Іншими варіантами здійснення даного винаходу є застосування (а) ТАТ-поліпептиду, (б) нуклеїнової кислоти, яка кодує ТАТ-поліпептид, або вектора або клітини-хазяїна, яка містить зазначену нуклеїнову кислоту, (в) антитіла до ТАТ-поліпептиду, (г) ТАТ-зв'язуючого олігопептиду або (д) ТАТ-зв'язуючої невеликої органічної молекули,

для приготування лікарського засобу, який можна застосовувати для (І) терапевтичного лікування або діагностичного визначення раку або пухлини або (ІІ) терапевтичного лікування або попередження пов'язаного із проліферацією клітин захворювання.

Наступним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб інгібування росту ракової клітини, де ріст ракової клітини принаймні частково залежить від потенціюючої(их) ріст дії(дій) ТАТ-поліпептиду (де ТАТ-поліпептид може експресуватися або самою раковою клітиною, або клітиною, яка продукує поліпептид(и), який має(мають) потенціюючу ріст дію на ракові клітини), який полягає у тому, що приводять у контакт ТАТ-поліпептид з антитілом, олігопептидом або невеликою органічною молекулою, які зв'язуються ТАТ-поліпептидом, протидіючи тим самим потенціюючій ріст активності ТАТ-поліпептиду, і, у свою чергу, інгібуючи ріст ракової клітини. Переважно ріст ракової клітини інгібується повністю. Ще більш краще зв'язування антитіла, олігопептиду або невеликої органічної молекули з ТАТ-поліпептидом індукуює загибель ракової клітини. Необов'язкове антитіло являє собою моноклональне антитіло, фрагмент антитіла, химерне антитіло, гуманізоване антитіло, одноланцюгове антитіло. Антитіла, ТАТ-зв'язуючі олігопептиди й ТАТ-зв'язуючі органічні молекули, які застосовують у способах, пропонованих у даному винаході, необов'язково можна кон'югувати із інгібуючим ріст агентом або цитотоксичним агентом, таким як токсин, включаючи, наприклад, майтансиноїд або каліхеаміцин, антибіотиком, радіоактивним ізотопом, нуклеолітичним ферментом або т.п. Антитіла й ТАТ-зв'язуючі олігопептиди, які застосовують у способах, пропонованих у даному винаході, необов'язково можна одержувати в СНО-клітинах або бактеріальних клітинах.

І ще одним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб терапевтичного лікування пухлини в ссавця, де ріст пухлини принаймні частково залежить від потенціюючої(их) ріст дії(дій) ТАТ-поліпептиду, який полягає у тому, що ссавцю, який має потребу в цьому, вводять у терапевтично ефективній кількості антитіло, олігопептид або невелику органічну молекулу, які зв'язуються з ТАТ-поліпептидом, протидіючи потенціюючій клітинний ріст активності ТАТ-поліпептиду й приводячи до ефективного терапевтичного лікування пухлини. Необов'язкове антитіло являє собою моноклональне антитіло, фрагмент антитіла, химерне антитіло, гуманізоване антитіло, одноланцюгове антитіло. Антитіла, ТАТ-зв'язуючі олігопептиди й ТАТ-зв'язуючі органічні молекули, які застосовують у способах, пропонованих у даному винаході, необов'язково можна кон'югувати із інгібуючим ріст агентом або цитотоксичним агентом, таким як токсин, включаючи, наприклад, майтансиноїд або каліхеаміцин, антибіотиком, радіоактивним ізотопом, нуклеолітичним ферментом або т.п. Антитіла й ТАТ-зв'язуючі олігопептиди, які застосовують у способах, пропонованих у даному винаході, необов'язково можна одержувати в СНО-клітинах або бактеріальних клітинах.

В. Інші додаткові варіанти здійснення винаходу

Іншими варіантами здійснення винаходу є наступна група потенційних пунктів формули винаходу, запропонованих у даному описі:

1. Виділена нуклеїнова кислота, нуклеотидна послідовність якої принаймні на 80% ідентична нуклеотидній послідовності:

(а) молекули ДНК, яка кодує амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2;

(б) молекули ДНК, яка кодує амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2, у якій відсутній асоційований з нею сигнальний пептид;

(в) молекули ДНК, яка кодує позаклітинний домен поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) молекули ДНК, яка кодує позаклітинний домен поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) нуклеотидній послідовності, представлений в SEQ ID NO:1;

(е) повнорозмірній кодуючій послідовності, нуклеотидній послідовності, представлений в SEQ ID NO:1; або

(є) комплементу послідовностей, зазначених в (а), (б), (в), (г), (д) або (е).

2. Виділена нуклеїнова кислота, яка має:

(а) нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2;

(б) нуклеотидну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2, у якій відсутній асоційований з нею сигнальний пептид;

(в) нуклеотидну послідовність, яка кодує позаклітинний домен поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) нуклеотидну послідовність, яка кодує позаклітинний домен поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) нуклеотидну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:1;

(е) повнорозмірну кодуючу ділянку нуклеотидної послідовності, представлену в SEQ ID NO:1; або

(є) комплемент послідовностей, зазначених в (а), (б), (в), (г), (д) або (е).

3. Виділена нуклеїнова кислота, яка гібридується з:

(а) нуклеотидною послідовністю, яка кодує амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2;

(б) нуклеотидною послідовністю, яка кодує амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2, у якій відсутній асоційований з нею сигнальний пептид;

(в) нуклеотидною послідовністю, яка кодує позаклітинний домен поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) нуклеотидною послідовністю, яка кодує позаклітинний домен поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) нуклеотидною послідовністю, представлену в SEQ ID NO:1;

(е) повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, представлену в SEQ ID NO:1; або

(ж) комплементом послідовностей, зазначених в (а), (б), (в), (г), (д) або (е).

4. Нуклеїнова кислота за п. 3, гібридизація якої відбувається в строгих умовах.

5. Нуклеїнова кислота за п. 3, яка складається принаймні приблизно з 5 нуклеотидів.

6. Експресійний вектор, який містить нуклеїнову кислоту за п. 1, 2 або 3.

7. Експресійний вектор за п. 6, у якому нуклеїнова кислота функціонально зв'язана з контролюючими послідовностями, розпізнаваними клітиною-хазяїном, яка трансформована вектором.

8. Клітина-хазяїн, яка містить експресійний вектор за п. 7.

9. Клітина-хазяїн за п. 8, яка являє собою CHO-клітину, клітину E. coli або дріжджову клітину.

10. Спосіб одержання поліпептиду, який полягає у тому, що культивують клітини-хазяїни за п. 8 в умовах, придатних для експресії поліпептиду, і виділяють поліпептид із клітинної культури.

11. Виділений поліпептид, амінокислотна послідовність якого принаймні на 80% ідентична амінокислотній послідовності:

(а) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2;

(б) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(в) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) поліпептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO: 1; або

(е) поліпептиду, який кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1.

12. Виділений поліпептид, який має:

(а) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2;

(б) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(в) амінокислотну послідовність позаклітинного домену, представлену в SEQ ID NO:2, включаючи асоційовану з нею послідовність сигнального пептиду;

(г) амінокислотну послідовність позаклітинного домену, представлену в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(д) амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1, або

(е) амінокислотну послідовність, яка кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1.

13. Химерний поліпептид, який містить поліпептид за п. 11 або 12, злитий з гетерологічним поліпептидом.

14. Химерний поліпептид за п. 13, у якому гетерологічний поліпептид являє собою послідовність епітопу-мітки або Fc-ділянки імуноглобуліну.

15. Виділене антитіло, яке зв'язується з поліпептидом, амінокислотна послідовність якого принаймні на 80% ідентична амінокислотній послідовності:

(а) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2;

(б) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(в) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) поліпептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1; або

(е) поліпептиду, який кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1.

16. Виділене антитіло, яке зв'язується з поліпептидом, який має:

(а) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2;

(б) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(в) амінокислотну послідовність позаклітинного домену, представлену в SEQ ID NO:2, включаючи асоційовану з нею послідовність сигнального пептиду;

(г) амінокислотну послідовність позаклітинного домену, представлену в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(д) амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1, або

(е) амінокислотну послідовність, яка кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1.

17. Антитіло за п. 15 або 16, яке являє собою моноклональне антитіло.

18. Антитіло за п. 15 або 16, яке являє собою фрагмент антитіла.

19. Антитіло за п. 15 або 16, яке являє собою химерне антитіло або гуманізоване антитіло.

20. Антитіло за п. 15 або 16, яке кон'юговане з інгібуючим ріст агентом.

21. Антитіло за п. 15 або 16, яке кон'юговане із цитотоксичним агентом.

22. Антитіло за п. 21, де цитотоксичний агент вибраний із групи, яка включає токсини, антибіотики, радіоактивні ізотопи та нуклеолітичні ферменти.

23. Антитіло за п. 21, де цитотоксичний агент являє собою токсин.

24. Антитіло за п. 23, де токсин вибраний із групи, яка включає майтансиноїд і каліхеаміцин.

25. Антитіло за п. 23, де токсин являє собою майтансиноїд.

26. Антитіло за п. 15 або 16, одержане в бактеріях.

27. Антитіло за п. 15 або 16, одержане в CHO-клітинах.

28. Антитіло за п. 15 або 16, яке індукуює загибель клітини, з якою воно зв'язується.

29. Антитіло за п. 15, що несе мітку, яка виявляється.

30. Виділена нуклеїнова кислота, яка має нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіло за п. 15 або 16.

31. Експресійний вектор, який містить нуклеїнову кислоту за п. 30, функціонально зв'язану з контролюючими послідовностями, які розпізнаються клітиною-хазяїном, трансформованою вектором.

32. Клітина-хазяїн, яка містить експресійний вектор за п. 31.

33. Клітина-хазяїн за п. 32, яка являє собою CHO-клітину, клітину *E. coli* або дріжджову клітину.

34. Спосіб одержання антитіла, який полягає у тому, що культивують клітину-хазяїна за п. 32 в умовах, придатних для експресії антитіла, і виділяють антитіло із клітинної культури.

35. Виділений олігопептид, який зв'язується з поліпептидом, амінокислотна послідовність якого принаймні на 80% ідентична амінокислотній послідовності:

(а) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2;

(б) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(в) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) поліпептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1; або

(е) поліпептиду, який кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою, нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1.

36. Виділений олігопептид, який зв'язується з поліпептидом, який має:

(а) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2;

(б) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(в) амінокислотну послідовність позаклітинного домену, представлену в SEQ ID NO:2, включаючи

асоційовану з нею послідовність сигнального пептиду;

(г) амінокислотну послідовність позаклітинного домену, представлену в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(д) амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO: 1, або

(е) амінокислотну послідовність, яка кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1.

37. Олігопептид за п. 35 або 36, який кон'югований з інгібуючим ріст агентом.

38. Олігопептид за п. 35 або 36, який кон'югований із цитотоксичним агентом.

39. Олігопептид за п. 38, де цитотоксичний агент вибраний із групи, яка включає токсини, антибіотики, радіоактивні ізотопи та нуклеолітичні ферменти.

40. Олігопептид за п. 38, де цитотоксичний агент являє собою токсин.

41. Олігопептид за п. 40, де токсин вибраний із групи, яка включає майтансиноїд і каліхеаміцин.

42. Олігопептид за п. 40, де токсин являє собою майтансиноїд.

43. Олігопептид за п. 35 або 36, який індукує загибель клітини, з якою він зв'язується.

44. Олігопептид за п. 35 або 36, що несе мітку, яка виявляється.

45. Органічна молекула, що зв'язується з TAT, яка зв'язується з поліпептидом, амінокислотна послідовність якого принаймні на 80% ідентична амінокислотній послідовності:

(а) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2;

(б) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(в) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) поліпептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO: 1; або

(е) поліпептиду, який кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1.

46. Органічна молекула за п. 45, яка зв'язується з поліпептидом, який має:

(а) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2;

(б) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(в) амінокислотну послідовність позаклітинного домену, представлену в SEQ ID NO:2, включаючи асоційовану з нею послідовність сигнального пептиду;

(г) амінокислотну послідовність позаклітинного домену, представлену в SEQ ID NO:2, у якій відсутня

асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(д) амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1, або

(е) амінокислотну послідовність, яка кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1.

47. Органічна молекула за п. 45 або 46, яка кон'югована з інгібуючим ріст агентом.

48. Органічна молекула за п. 45 або 46, яка кон'югована із цитотоксичним агентом.

49. Органічна молекула за п. 48, де цитотоксичний агент вибраний із групи, яка включає токсини, антибіотики, радіоактивні ізотопи та нуклеолітичні ферменти.

50. Органічна молекула за п. 48, де цитотоксичний агент являє собою токсин.

51. Органічна молекула за п. 50, де токсин вибраний із групи, яка включає майтансиноїд і каліхеаміцин.

52. Органічна молекула за п. 50, де токсин являє собою майтансиноїд.

53. Органічна молекула за п. 45 або 46, яка індукує загибель клітини, з якою вона зв'язується.

54. Органічна молекула за п. 45 або 46, що несе мітку, яка виявляється.

55. Композиція, пропонована у винаході, яка містить:

(а) поліпептид зап. 11;

(б) поліпептид за п. 12;

(в) химерний поліпептид за п. 13;

(г) антитіло за п. 15;

(д) антитіло за п. 16;

(е) олігопептид за п. 35;

(є) олігопептид за п. 36;

(ж) органічну молекулу, яка зв'язується з TAT за п. 45; або

(з) органічну молекулу, яка зв'язується TAT за п. 46; у сполученні з носієм.

56. Композиція, пропонована у винаході, за п. 55, у якій носій являє собою фармацевтично прийнятний носій.

57. Виріб, який являє собою:

(а) контейнер; і

(б) композицію, пропоновану у винаході, за п. 55, яка знаходиться в контейнері.

58. Виріб за п. 57, який додатково містить прикріплену до контейнера етикету або листівку-вкладиш у контейнері, на якій наведений спосіб застосування композиції, пропонованої у винаході, для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

59. Спосіб інгібування росту клітини, яка експресує білок, амінокислотна послідовність якого принаймні на 80% ідентична амінокислотній послідовності:

(а) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2;

(б) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(в) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;



(г) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) поліпептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1; або

(е) поліпептиду, який кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1, який полягає у тому, що приводять у контакт клітину з антитілом, олігопептидом або органічною молекулою, які зв'язуються з білком, при цьому зв'язування антитіла, олігопептиду або органічної молекули з білком викликає інгібування росту клітини.

60. Спосіб за п. 59, у якому антитіло являє собою моноклональне антитіло.

61. Спосіб за п. 59, у якому антитіло являє собою фрагмент антитіла.

62. Спосіб за п. 59, у якому антитіло являє собою химерне або гуманізоване антитіло.

63. Спосіб за п. 59, у якому антитіло, олігопептид або органічну молекулу кон'югують з інгібуючим ріст агентом.

64. Спосіб за п. 59, у якому антитіло, олігопептид або органічну молекулу кон'югують із цитотоксичним агентом.

65. Спосіб за п. 64, у якому цитотоксичний агент вибирають із групи, яка включає токсини, антибіотики, радіоактивні ізотопи та нуклеолітичні ферменти.

66. Спосіб за п. 64, у якому цитотоксичний агент являє собою токсин.

67. Спосіб за п. 66, у якому токсин вибирають із групи, яка включає майтансиноїд і каліхеаміцин.

68. Спосіб за п. 66, у якому токсин являє собою майтансиноїд.

69. Спосіб за п. 59, у якому антитіло одержують у бактеріях.

70. Спосіб за п. 59, у якому антитіло одержують в СНО-клітинах.

71. Спосіб за п. 59, у якому клітина являє собою ракову клітину.

72. Спосіб за п. 71, у якому ракову клітину додатково піддають променевої терапії або обробці хіміотерапевтичним агентом.

73. Спосіб за п. 71, у якому ракову клітину вибирають із групи, яка включає клітину раку молочної залози, клітину колоректального раку, клітину раку легень, клітину раку яєчника, клітину раку центральної нервової системи, клітину раку печінки, клітину раку сечового міхура, клітину раку підшлункової залози, клітину раку шийки матки, клітину меланоми та лейкозну клітину.

74. Спосіб за п. 71, у якому рівень експресії білка в раковій клітині вищий в порівнянні зі здоровою клітиною, одержаною з такої ж тканини.

75. Спосіб за п. 59, який приводить до загибелі клітини.

76. Спосіб за п. 59, у якому білок має:

(а) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2;

(б) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(в) амінокислотну послідовність позаклітинного домену, представлену в SEQ ID NO:2, включаючи асоційовану з нею послідовність сигнального пептиду;

(г) амінокислотну послідовність позаклітинного домену, представлену в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(д) амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1, або

(е) амінокислотну послідовність, яка кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO: 1.

77. Спосіб терапевтичного лікування ссавця, який страждає злоякісною пухлиною, яка містить клітини, що експресують білок, амінокислотна послідовність якого принаймні на 80% ідентична амінокислотній послідовності:

(а) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2;

(б) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(в) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) поліпептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1; або

(е) поліпептиду, який кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1,

який полягає у тому, що ссавцю вводять у терапевтично ефективній кількості антитіло, олігопептид або органічну молекулу, які зв'язуються з білком, що приводить до ефективного лікування ссавця.

78. Спосіб за п. 77, у якому антитіло являє собою моноклональне антитіло.

79. Спосіб за п. 77, у якому антитіло являє собою фрагмент антитіла.

80. Спосіб за п. 77, у якому антитіло являє собою химерне або гуманізоване антитіло.

81. Спосіб за п. 77, у якому антитіло, олігопептид або органічну молекулу кон'югують з інгібуючим ріст агентом.

82. Спосіб за п. 77, у якому антитіло, олігопептид або органічну молекулу кон'югують із цитотоксичним агентом.

83. Спосіб за п. 82, у якому цитотоксичний агент вибирають із групи, яка включає токсини, антибіотики, радіоактивні ізотопи та нуклеолітичні ферменти.

84. Спосіб за п. 82, у якому цитотоксичний агент являє собою токсин.

85. Спосіб за п. 84, у якому токсин вибирають із групи, яка включає майтансиноїд і каліхеаміцин.

86. Спосіб за п. 84, у якому токсин являє собою майтансиноїд.

87. Спосіб за п. 77, у якому антитіло одержують у бактеріях.

88. Спосіб за п. 77, у якому антитіло одержують в СНО-клітинах.

89. Спосіб за п. 77, у якому пухлину додатково піддають променевій терапії або обробці хіміотерапевтичним агентом.

90. Спосіб за п. 77, у якому пухлина являє собою пухлину молочної залози, колоректальну пухлину, пухлину легені, пухлину яєчника, пухлину центральної нервової системи, пухлину печінки, пухлину сечового міхура, пухлину підшлункової залози або пухлину шийки матки.

91. Спосіб за п. 77, у якому рівень експресії білка в ракових клітинах зазначеної пухлини вищий в порівнянні зі здоровою клітиною, одержаною з такої ж тканини.

92. Спосіб за п. 77, у якому білок має:

(а) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2;

(б) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(в) амінокислотну послідовність позаклітинного домену, представлену в SEQ ID NO:2, включаючи асоційовану з нею послідовність сигнального пептиду;

(г) амінокислотну послідовність позаклітинного домену, представлену в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(д) амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1, або

(е) амінокислотну послідовність, яка кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1.

93. Спосіб виявлення присутності білка в зразку, який, як передбачається, містить зазначений білок, у якому амінокислотна послідовність білка принаймні на 80% ідентична амінокислотній послідовності:

(а) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2;

(б) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(в) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) поліпептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1; або

(е) поліпептиду, який кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1,

який полягає у тому, що приводять у контакт зразок з антитілом, олігопептидом або органічною молекулою, які зв'язуються з білком, і визначають зв'язування антитіла, олігопептиду або органічної молекули з білком у зразку, де зв'язування антитіла, олігопептиду або органічної молекули з білком свідчить про присутність білка в зразку.

94. Спосіб за п. 93, у якому зразок містить клітину, яка, як передбачається, експресує зазначений білок.

95. Спосіб за п. 94, у якому клітина являє собою ракову клітину.

96. Спосіб за п. 93, у якому антитіло, олігопептид або органічна молекула несуть мітку, яка виявляється.

97. Спосіб за п. 93, у якому білок містить:

(а) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2;

(б) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(в) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, представлену в SEQ ID NO:2, включаючи асоційовану з нею послідовність сигнального пептиду;

(г) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, представлену в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(д) амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1, або

(е) амінокислотну послідовність, яка кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1.

98. Спосіб діагностики наявності пухлини в ссавця, який полягає у тому, що визначають рівень експресії гена, який кодує білок, амінокислотна послідовність якого ідентична принаймні на 80% амінокислотній послідовності:

(а) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2;

(б) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(в) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) поліпептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1; або

(е) поліпептиду, який кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1,

у тест-зразку клітин тканини, одержаних з організму зазначеного ссавця, і в контрольному зразку клітин, взятих з такого ж типу тканини, для яких відомо, що вони являють собою здорові клітини, де більш високий рівень експресії зазначеного білка в тест-зразку в порівнянні з контрольним зразком свідчить про наявність пухлини в ссавця, з організму якого одержаний тест-зразок.

99. Спосіб за п. 98, у якому стадія визначення рівня експресії гена, що кодує зазначений білок, включає застосування олігонуклеотиду при здійсненні гібридизації *in situ* або ОТ-ПЛР-аналізу.

100. Спосіб за п. 98, у якому стадія визначення рівня експресії гена, який кодує зазначений білок, включає застосування антитіла в імуногістохіміч-

ному аналізі або аналізі методом Вестерн-блоттингу.

101. Спосіб за п. 98, у якому білок містить:

(а) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2;

(б) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(в) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, представлену в SEQ ID NO:2, включаючи асоційовану з нею послідовність сигнального пептиду;

(г) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, представлену в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(д) амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO: 1, або

(е) амінокислотну послідовність, яка кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1.

102. Спосіб діагностики наявності пухлини в ссавця, який полягає у тому, що приводять у контакт тест-зразок клітин тканини, одержаної з організму зазначеного ссавця, з антитілом, олігопептидом або органічною молекулою, яка зв'язується з білком, амінокислотна послідовність якого ідентична принаймні на 80% амінокислотній послідовності:

(а) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2;

(б) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(в) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) поліпептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1; або

(е) поліпептиду, який кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1,

і виявляють утворення комплексу між антитілом, олігопептидом або органічною молекулою та зазначеним білком у тест-зразку, де утворення комплексу свідчить про наявність пухлини в організмі ссавця.

103. Спосіб за п. 102, у якому антитіло, олігопептид або органічна молекула несуть мітку, яка виявляється.

104. Спосіб за п. 102, у якому тест-зразок клітин тканини одержують із організму індивідуума, у якого передбачається наявність злоякісної пухлини.

105. Спосіб за п. 102, у якому білок містить:

(а) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2;

(б) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(в) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, представлену в SEQ ID NO:2, включаючи асоційовану з нею послідовність сигнального пептиду;

(г) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, представлену в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(д) амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1, або

(е) амінокислотну послідовність, яка кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1.

106. Спосіб лікування або попередження пов'язаного із проліферацією клітин захворювання, причиною якого є підвищений рівень експресії або активності білка, амінокислотна послідовність якого ідентична принаймні на 80% амінокислотній послідовності:

(а) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2;

(б) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(в) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) поліпептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1; або

(е) поліпептиду, який кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1,

який полягає у тому, що індивідууму, який потребує такого лікування, вводять в ефективній кількості антагоніст зазначеного білка, що приводить до ефективного лікування або попередження пов'язаного із проліферацією клітин захворювання.

107. Спосіб за п. 106, у якому пов'язане із проліферацією клітин захворювання являє собою рак.

108. Спосіб за п. 106, у якому антагоніст являє собою антитіло до поліпептиду TAT, TAT-зв'язуючий олігопептид, TAT-зв'язуючу органічну молекулу або антисмисловий олігопептид.

109. Спосіб зв'язування антитіла, олігопептиду або органічної молекули із клітиною, яка експресує білок, амінокислотна послідовність якого ідентична принаймні на 80% амінокислотній послідовності:

(а) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2;

(б) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(в) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) поліпептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1; або

(е) поліпептиду, який кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1, який полягає у тому, що приводять у контакт клітину з антитілом, олігопептидом або органічною молекулою, які зв'язуються із зазначеним білком, і дають здійснитися зв'язуванню антитіла, олігопептиду або органічної молекули із зазначеним білком, що приводить до зв'язування антитіла, олігопептиду або органічної молекули із клітиною.

110. Спосіб за п. 109, у якому антитіло являє собою моноклональне антитіло.

111. Спосіб за п. 109, у якому антитіло являє собою фрагмент антитіла.

112. Спосіб за п. 109, у якому антитіло являє собою химерне або гуманізоване антитіло.

113. Спосіб за п. 109, у якому антитіло, олігопептид або органічну молекулу кон'югують з інгібуючим ріст агентом.

114. Спосіб за п. 109, у якому антитіло, олігопептид або органічну молекулу кон'югують із цитотоксичним агентом.

115. Спосіб за п. 114, у якому цитотоксичний агент вибирають із групи, яка включає токсини, антибіотики, радіоактивні ізотопи та нуклеолітичні ферменти.

116. Спосіб за п. 114, у якому цитотоксичний агент являє собою токсин.

117. Спосіб за п. 116, у якому токсин вибраний із групи, яка включає мایتансиноїд і каліхеаміцин.

118. Спосіб за п. 116, у якому токсин являє собою мایتансиноїд.

119. Спосіб за п. 109, у якому антитіло одержують у бактеріях.

120. Спосіб за п. 109, у якому антитіло одержують у CHO-клітинах.

121. Спосіб за п. 109, у якому клітина являє собою ракову клітину.

122. Спосіб за п. 121, у якому ракову клітину додатково піддають променевої терапії або обробці хіміотерапевтичним агентом.

123. Спосіб за п. 121, у якому ракову клітину вибирають із групи, яка включає клітину раку молочної залози, клітину колоректального раку, клітину раку легені, клітину раку яєчника, клітину раку центральної нервової системи, клітину раку печінки, клітину раку сечового міхура, клітину раку підшлункової залози, клітину раку шийки матки, клітину меланоми та лейкозну клітину.

124. Спосіб за п. 123, у якому рівень експресії білка вищий в раковій клітині в порівнянні зі здоровою клітиною, одержаною з такої ж тканини.

125. Спосіб за п. 109, який приводить до загибелі клітини.

126. Застосування нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 1-5 або 30 для приготування лікарського засобу, призначеного для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

127. Застосування нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 1-5 або 30 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування пухлини.

128. Застосування нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 1-5 або 30 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування або попередження пов'язаного із проліферацією клітин захворювання.

129. Застосування експресійного вектора за будь-яким з пп. 6, 7 або 31 для приготування лікарського засобу, призначеного для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

130. Застосування експресійного вектора за будь-яким з пп. 6, 7 або 31 для приготування лікарського засобу, призначеного для пухлини.

131. Застосування експресійного вектора за будь-яким з пп. 6, 7 або 31 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування або попередження пов'язаного із проліферацією клітин захворювання.

132. Застосування клітини-хазіяїна за будь-яким з пп. 8, 9, 32 або 33 для приготування лікарського засобу, призначеного для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

133. Застосування клітини-хазіяїна за будь-яким з пп. 8, 9, 32 або 33 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування пухлини.

134. Застосування клітини-хазіяїна за будь-яким з пп. 8, 9, 32 або 33 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування або попередження пов'язаного із проліферацією клітин захворювання.

135. Застосування поліпептиду за будь-яким з пп. 11-14 для приготування лікарського засобу, призначеного для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

136. Застосування поліпептиду за будь-яким з пп. 11-14 для приготування лікарського засобу, призначеного для пухлини.

137. Застосування поліпептиду за будь-яким з пп. 11-14 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування або попередження пов'язаного із проліферацією клітин захворювання.

138. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 15-29 для приготування лікарського засобу, призначеного для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

139. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 15-29 для приготування лікарського засобу, призначеного для пухлини.

140. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 15-29 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування або попередження пов'язаного із проліферацією клітин захворювання.

141. Застосування олігопептиду за будь-яким з пп. 35-44 для приготування лікарського засобу, призначеного для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

142. Застосування олігопептиду за будь-яким з пп. 35-44 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування пухлини.

143. Застосування олігопептиду за будь-яким з пп. 35-44 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування або попередження пов'язаного із проліферацією клітин захворювання.

144. Застосування ТАТ-зв'язуючої органічної молекули за будь-яким з пп. 45-54 для приготування лікарського засобу, призначеного для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

145. Застосування ТАТ-зв'язуючої органічної молекули за будь-яким з пп. 45-54 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування пухлини.

146. Застосування ТАТ-зв'язуючої органічної молекули за будь-яким з пп. 45-54 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування або попередження пов'язаного із проліферацією клітин захворювання.

147. Застосування композиції, пропонованої у винаході, за будь-яким з пп. 55 або 56 для приготування лікарського засобу, призначеного для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

148. Застосування композиції, пропонованої у винаході, за будь-яким з пп. 55 або 56 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування пухлини.

149. Застосування композиції, пропонованої у винаході, за будь-яким з пп. 55 або 56 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування або попередження пов'язаного із проліферацією клітин захворювання.

150. Застосування виробу за будь-яким з пп. 57 або 58 для приготування лікарського засобу, призначеного для терапевтичного лікування або діагностичного виявлення раку.

151. Застосування виробу за будь-яким з пп. 57 або 58 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування пухлини.

152. Застосування виробу за будь-яким з пп. 57 або 58 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування або попередження пов'язаного із проліферацією клітин захворювання.

153. Спосіб інгібування росту клітини, у якому ріст зазначеної клітини принаймні частково залежить від потенціюючої дії білка, амінокислотна послідовність якого ідентична принаймні на 80% амінокислотній послідовності:

(а) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2;

(б) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(в) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) поліпептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO: 1; або

(е) поліпептиду, який кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1, який полягає у тому, що приводять у контакт зазначений білок з антитілом, олігопептидом або органічною молеку-

лою, які зв'язуються із зазначеним білком, що приводить до інгібування росту зазначеної клітини.

154. Спосіб за п. 153, у якому клітина являє собою ракову клітину.

155. Спосіб за п. 153, у якому зазначений білок експресується зазначеною клітиною.

156. Спосіб за п. 153, у якому зв'язування антитіла, олігопептиду або органічної молекули з білком здійснює антагоністичну дію на потенціюючу ріст клітини активність зазначеного білка.

157. Спосіб за п. 153, у якому зв'язування антитіла, олігопептиду або органічної молекули з білком індукує загибель зазначеної клітини.

158. Спосіб за п. 153, у якому антитіло являє собою моноклональне антитіло.

159. Спосіб за п. 153, у якому антитіло являє собою фрагмент антитіла.

160. Спосіб за п. 153, у якому антитіло являє собою химерне або гуманізоване антитіло.

161. Спосіб за п. 153, у якому антитіло, олігопептид або органічну молекулу кон'югують з інгібуючим ріст агентом.

162. Спосіб за п. 153, у якому антитіло, олігопептид або органічну молекулу кон'югують із цитотоксичним агентом.

163. Спосіб за п. 162, у якому цитотоксичний агент вибирають із групи, яка включає токсини, антибіотики, радіоактивні ізотопи та нуклеолітичні ферменти.

164. Спосіб за п. 162, у якому цитотоксичний агент являє собою токсин.

165. Спосіб за п. 164, у якому токсин вибирають із групи, яка включає майтансиноїд і каліхеаміцин.

166. Спосіб за п. 164, у якому токсин являє собою майтансиноїд.

167. Спосіб за п. 153, у якому антитіло одержують у бактеріях.

168. Спосіб за п. 153, у якому антитіло одержують у CHO-клітинах.

169. Спосіб за п. 153, у якому білок містить:

(а) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2;

(б) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(в) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, представлену в SEQ ID NO:2, включаючи асоційовану з нею послідовність сигнального пептиду;

(г) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, представлену в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(д) амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1, або

(е) амінокислотну послідовність, яка кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1.

170. Спосіб терапевтичного лікування пухлини в ссавця, у якому ріст пухлини принаймні частково залежить від потенціюючої дії білка, амінокислотна послідовність якого принаймні на 80% ідентична амінокислотній послідовності:

(а) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2;

(б) поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(в) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, включаючи асоційований з ним сигнальний пептид;

(г) позаклітинного домену поліпептиду, представленого в SEQ ID NO:2, у якому відсутній асоційований з ним сигнальний пептид;

(д) поліпептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO: 1; або

(е) поліпептиду, який кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1, який полягає у тому, що приводять у контакт зазначений білок з антитілом, олігопептидом або органічною молекулою, які зв'язуються із зазначеним білком, що приводить до ефективного лікування пухлини.

171. Спосіб за п. 170, у якому білок експресується клітинами пухлини.

172. Спосіб за п. 170, у якому зв'язування антитіла, олігопептиду або органічної молекули з білком здійснює антагоністичну дію на потенціюючи ріст клітини активність зазначеного білка.

173. Спосіб за п. 170, у якому антитіло являє собою моноклональне антитіло.

174. Спосіб за п. 170, у якому антитіло являє собою фрагмент антитіла.

175. Спосіб за п. 170, у якому антитіло являє собою химерне або гуманізоване антитіло.

176. Спосіб за п. 170, у якому антитіло, олігопептид або органічну молекулу кон'югують з інгібуючим ріст агентом.

177. Спосіб за п. 170, у якому антитіло, олігопептид або органічну молекулу кон'югують із цитотоксичним агентом.

178. Спосіб за п. 177, у якому цитотоксичний агент вибирають із групи, яка включає токсини, антибіотики, радіоактивні ізотопи та нуклеолітичні ферменти.

179. Спосіб за п. 177, у якому цитотоксичний агент являє собою токсин.

180. Спосіб за п. 179, у якому токсин вибирають із групи, яка включає майтансиноїд і каліхеаміцин.

181. Спосіб за п. 179, у якому токсин являє собою майтансиноїд.

182. Спосіб за п. 170, у якому антитіло одержують у бактеріях.

183. Спосіб за п. 170, у якому антитіло одержують у CHO-клітинах.

184. Спосіб за п. 170, у якому білок містить:

(а) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2;

(б) амінокислотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(в) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, представлену в SEQ ID NO:2, включаючи асоційовану з нею послідовність сигнального пептиду;

(г) амінокислотну послідовність позаклітинного домену поліпептиду, представлену в SEQ ID NO:2, у якій відсутня асоційована з нею послідовність сигнального пептиду;

(д) амінокислотну послідовність, яка кодується нуклеотидною послідовністю, яка представлена в SEQ ID NO:1, або

(е) амінокислотну послідовність, яка кодується повнорозмірною кодуючою ділянкою нуклеотидної послідовності, яка представлена в SEQ ID NO:1.

186. Виділене антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, з яким зв'язується антитіло, яке продукується будь-якою із клітинних ліній гібридом, представлених у таблиці 11.

187. Антитіло за п. 186, яке являє собою моноклональне антитіло.

188. Антитіло за п. 186, яке являє собою фрагмент антитіла.

189. Антитіло за п. 186, яке являє собою химерне або гуманізоване антитіло.

190. Антитіло за п. 186, кон'юговане з інгібуючим ріст агентом.

191. Антитіло за п. 186, кон'юговане із цитотоксичним агентом.

192. Антитіло за п. 191, у якому цитотоксичний агент вибраний із групи, яка включає токсини, антибіотики, радіоактивні ізотопи та нуклеолітичні ферменти.

193. Антитіло за п. 191, у якому цитотоксичний агент являє собою токсин.

194. Антитіло за п. 193, у якому токсин вибраний із групи, яка включає майтансиноїд і каліхеаміцин.

195. Спосіб за п. 193, у якому токсин являє собою майтансиноїд.

196. Антитіло за п. 186, яке одержують у бактеріях.

197. Антитіло за п. 186, яке одержують у CHO-клітинах.

198. Антитіло за п. 186, яке індукує загибель клітини, з якою воно зв'язується.

199. Антитіло за п. 186, що несе мітку, яка виявляється.

200. Антитіло за п. 186, яке містить принаймні одну гіперваріабельну ділянку будь-якого антитіла, яке продукується будь-якою із клітинних ліній гібридом, представлених у таблиці 11.

201. Моноклональне антитіло, яке продукується будь-якою із клітинних ліній гібридом, представлених у таблиці 11.

202. Клітина гібридами, яка продукує моноклональне антитіло, яке зв'язується з TAT-поліпептидом.

203. Спосіб ідентифікації антитіла, яке зв'язується з епітопом, який зв'язується з антитілом, яке продукується будь-якою із клітинних ліній гібридом, представлених у таблиці 11, який полягає у тому, що визначають здатність першого антитіла блокувати зв'язування другого антитіла, яке продукується будь-якою із клітинних ліній гібридом, представлених у таблиці 11, з TAT-поліпептидом, де здатність першого антитіла блокувати зв'язування другого антитіла з TAT-поліпептидом принаймні на 40% і при використанні однакових концентрацій антитіл свідчить про те, що перше

антитіло має здатність зв'язуватися з епітопом, з яким зв'язується друге антитіло.

Інші варіанти здійснення даного винаходу стануть очевидні спеціалісту в даній галузі після ознайомлення з даним описом.

Стислий опис креслень

На кресленнях показано:

на Фіг. 1А-Д - нуклеотидна послідовність (SEQ ID NO:1) кДНК TAT10772, де SEQ ID NO:1 являє собою клон, позначений у даному описі як «DNA772»;

на Фіг. 2А-Б - амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:2), виведена на основі кодувальної послідовності, SEQ ID NO:1, представленої на Фіг. 1;

на Фіг. 3 - порівняльний аналіз первинної структури амінокислотних послідовностей наступних варіабельних ділянок легких ланцюгів: консенсусної послідовності людського легкого ланцюга підгрупи I (huK1; SEQ ID NO:3), мишачого антитіла 11D10 до TAT10772 (mu11D10-L; SEQ ID NO:4) і антитіла 11D10 до TAT10772, яке має трансплантовані (трансплантат) «гуманізовані» ділянки (11D10-трансплантат; SEQ ID NO:5);

на Фіг. 4 - порівняльний аналіз первинної структури амінокислотних послідовностей наступних варіабельних ділянок важких ланцюгів: консенсусної послідовності людського важкого ланцюга підгрупи III (hum III; SEQ ID NO:6), мишачого антитіла 11D10 до TAT10772 (mu11D10-H; SEQ ID NO:7) і антитіла 11D10 до TAT10772, яке має трансплантовані «гуманізовані» ділянки (11D10-трансплантат; SEQ ID NO:8);

на Фіг. 5 - порівняльний аналіз первинної структури амінокислотних послідовностей наступних варіабельних ділянок легких ланцюгів: консенсусної послідовності людського легкого ланцюга підгрупи I (huK1; SEQ ID NO:3), мишачого антитіла 3A5 до TAT10772 (mu3A5-L; SEQ ID NO:9), і антитіла 3A5 до TAT10772, яке має трансплантовані «гуманізовані» ділянки (3A5-трансплантат; SEQ ID NO:10);

на Фіг. 6А-Б - порівняльний аналіз первинної структури амінокислотних послідовностей наступних варіабельних ділянок важких ланцюгів: консенсусної послідовності людського важкого ланцюга підгрупи III (hum III; SEQ ID NO:6), мишачого антитіла 3A5 до TAT10772 (mu3A5-H; SEQ ID NO:11), антитіла 3A5 до TAT10772, яке має трансплантовані «гуманізовані» ділянки, «L-варіант» (3A5.L-трансплантат; SEQ ID NO:12) і антитіла 3A5 до TAT10772, яке має трансплантовані «гуманізовані» ділянки, «F-варіант» (3A5.F-трансплантат; SEQ ID NO:13);

на Фіг. 7 - різні послідовності HVR-L1 (SEQ ID NO:14-34) відібраних виведених з 11D10 антитіл з дозрілою афінністю;

на Фіг. 8 - різні послідовності HVR-L2 (SEQ ID NO: 35-58) відібраних виведених з 11D10 антитіл з дозрілою афінністю;

на Фіг. 9 - різні послідовності HVR-L3 (SEQ ID NO: 59-73) відібраних виведених з 11D10 антитіл з дозрілою афінністю;

на Фіг. 10 - різні послідовності HVR-H1 (SEQ ID NO: 74-93) відібраних виведених з 11D10 антитіл з дозрілою афінністю;

на Фіг. 11 - різні послідовності HVR-H2 (SEQ ID NO: 94-112) відібраних виведених з 11D10 антитіл з дозрілою афінністю;

на Фіг. 12 - різні послідовності HVR-H3 (SEQ ID NO: 113-118) відібраних виведених з 11D10 антитіл з дозрілою афінністю;

на Фіг. 13 - послідовність HVR-L1 (SEQ ID NO:119) відібраного виведеного з 3A5 антитіла з дозрілою афінністю;

на Фіг. 14 - різні послідовності HVR-L2 (SEQ ID NO:120-121) відібраних виведених з 3A5 антитіл з дозрілою афінністю;

на Фіг. 15 - послідовність HVR-L3 (SEQ ID NO:122) відібраного виведеного з 3A5 антитіла з дозрілою афінністю;

на Фіг. 16 - послідовність HVR-H1 (SEQ ID NO:123) відібраного виведеного з 3A5 антитіла з дозрілою афінністю;

на Фіг. 17 - різні послідовності HVR-H2 (SEQ ID NO: 124-127) відібраних виведених з 3A5 антитіл з дозрілою афінністю;

на Фіг. 18А-Б - різні послідовності (SEQ ID NO:128-183) відібраних виведених з 3A5 антитіл з дозрілою афінністю;

на Фіг. 19 - приклади послідовностей акцепторних людських консенсусних каркасних ділянок, які можна використовувати для втілення на практиці даного винаходу, з наступними послідовностями-ідентифікаторами: консенсусна каркасна ділянка людської VH підгрупи I мінус CDR за Кеботом (SEQ ID NO:184), консенсусна каркасна ділянка людської VH підгрупи I мінус подовжені гіперваріабельні ділянки (SEQ ID NO: 185-187), консенсусна каркасна ділянка VH підгрупи II мінус CDR за Кеботом (SEQ ID NO:188), консенсусна каркасна ділянка людської VH підгрупи II мінус подовжені гіперваріабельні ділянки (SEQ ID NO: 189-191), консенсусна каркасна ділянка людської VH підгрупи III мінус CDR за Кеботом, «L-варіант» (SEQ ID NO:192) і консенсусна каркасна ділянка людської VH підгрупи III мінус CDR за Кеботом, «F-варіант» (SEQ ID NO:193);

на Фіг. 20 - приклади послідовностей акцепторних людських консенсусних каркасних ділянок, які можна використовувати для втілення на практиці даного винаходу, з наступними послідовностями-ідентифікаторами: консенсусна каркасна ділянка людської VL-капа підгрупи I мінус CDR за Кеботом (SEQ ID NO:194), консенсусна каркасна ділянка людської VL-капа підгрупи II мінус CDR за Кеботом (SEQ ID NO:195), консенсусна каркасна ділянка людської VL-капа підгрупи III мінус CDR за Кеботом (SEQ ID NO:196) консенсусна каркасна ділянка людської VL-капа підгрупи IV мінус CDR за Кеботом (SEQ ID NO: 197);

на Фіг. 21А-Б - повні послідовності варіабельних ділянок важких ланцюгів наступних антитіл: 3A5v1 (SEQ ID NO:198), 3A5v2 (SEQ ID NO:199), 3A5v3 (SEQ ID NO:200), 3A5v4 (SEQ ID NO:201), 3A5v5 (SEQ ID NO:202), 3A5v6 (SEQ ID NO:203), 3A5v7 (SEQ ID NO:204), 3A5v8 (SEQ ID NO:205), 3A5v1b.52 (SEQ ID NO:206), 3A5v1b.54 (SEQ ID NO:207), 3A5v4b.52 (SEQ ID NO:208) і 3A5v4b.54 (SEQ ID NO:209). Всі ці антитіла містять амінокис-

лотну послідовність, що представлена в SEQ ID NO:3, варіабельної ділянки легкого ланцюга hуKl;

на Фіг. 22 - повні послідовності варіабельних ділянок легких ланцюгів (SEQ ID NO: 210-211), застосовувані для створення конкретних антитіл до TAT10772, представлених у даному описі;

на Фіг. 23 - дані про здатності різних гуманізованих антитіл 3A5 інгібувати зв'язування міченого за допомогою рутенію химерного 3A5 з біотинілованим 5'-доменом поліпептиду-мішені TAT10772. «h2H7 ctr» означає антитіло, застосовуване як негативний контроль, яке не має здатність специфічно зв'язуватися з TAT10772;

на Фіг. 24 - дані про здатності різних гуманізованих антитіл 3A5 інгібувати зв'язування міченого за допомогою рутенію химерного 3A5 з біотинілованим поліпептидом CA125. «h2H7 ctr» означає антитіло, застосовуване як негативний контроль, яке не має здатність специфічно зв'язуватися з TAT10772;

на Фіг. 25 - результати, одержані за допомогою ELISA з використанням різних гуманізованих антитіл 3A5, для оцінки зв'язування із OVCAR-3-клітинами. «h2H7 ctr» означає антитіло, застосовуване як негативний контроль, яке не має здатність специфічно зв'язуватися з TAT10772;

на Фіг. 26 - дані про проліферації in vitro OVCAR-3-клітин (які ендogenно експресують поліпептид TAT10772) після обробки химерними антитілами 11D10-vc-MMAF або 3A5-VC-MMAF;

на Фіг. 27 - дані про проліферації in vitro OVCAR-3-клітин (які ендogenно експресують поліпептид TAT10772) після обробки химерними антитілами 11D10-vc-MMAE або 3A5-VC-MMAE;

на Фіг. 28 - дані про проліферації in vitro OVCAR-3-клітин (які ендogenно експресують поліпептид TAT10772) після обробки химерними антитілами 11D10-MC-MMAF або 3A5-MC-MMAF;

на Фіг. 29 - дані про проліферації in vitro PC3-клітин, трансфектованих вектором, який надає здатність цим клітинам експресувати поліпептид TAT10772 (PC3/A5.3B2), або PC3-клітин, які не експресують поліпептид TAT10772 (PC3/neo), після обробки химерними антитілами 11D10-vc-MMAF або 3A5-VC-MMAF;

на Фіг. 30 - дані про проліферації in vitro PC3-клітин, трансфектованих вектором, який надає здатність цим клітинам експресувати поліпептид TAT10772 (PC3/A5.3B2), або PC3-клітин, які не експресують поліпептид TAT10772 (PC3/neo), після обробки химерними антитілами 11D10-vc-PAB-MMAE або 3A5-VC-PAB-MMAE;

на Фіг. 31 - дані про проліферації in vitro PC3-клітин, трансфектованих вектором, який надає здатність цим клітинам експресувати поліпептид TAT10772 (PC3/A5.3B2), або PC3-клітин, які не експресують поліпептид TAT10772 (PC3/neo), після обробки химерними антитілами 11D10-MC-MMAF або 3A5-MC-MMAF;

на Фіг. 32 - одержані in vivo дані про середній об'єм пухлин, одержаних з PC3/A5.3B2 пухлин (модель, заснована на застосуванні підшкірної ін'єкції) після обробки різними кон'югованими з токсинами химерними антитілами 3A5, контрольними антитілами або тільки наповнювачем;

на Фіг. 33 - одержані in vivo дані про середній об'єм пухлин, одержаних з OVCAR-3-пухлин (модель, створена на мишах лінії SCID з вродженою відсутністю природних клітин-кілерів після трансплантації в жирове тіло молочної залози), після обробки різними кон'югованими з токсинами химерними антитілами 3A5, контрольними антитілами або тільки наповнювачем;

на Фіг. 34 - одержані in vivo дані про середній об'єм пухлин, одержаних з OVCAR-3-пухлин (модель, створена на мишах лінії SCID з вродженою відсутністю природних клітин-кілерів після трансплантації в жирове тіло молочної залози), після обробки різними кон'югованими з токсинами химерними антитілами 3A5, контрольними антитілами або тільки наповнювачем;

на Фіг. 35 - одержані in vivo дані про середній об'єм пухлин, одержаних з OVCAR-3-пухлин (модель, створена на мишах лінії SCID з вродженою відсутністю природних клітин-кілерів після трансплантації в жирове тіло молочної залози), після обробки різними кон'югованими з токсинами химерними антитілами 3A5, контрольними антитілами або тільки наповнювачем;

на Фіг. 36 - одержані in vivo дані про середній об'єм пухлин, одержаних з PC3/A5.3B2 пухлин (пухлини, одержані в результаті введення ксенотрансплантату безтимусним мишам, 10 мільйонів клітин на мишу), після обробки різними кон'югованими з токсинами химерними антитілами 3A5, контрольними антитілами або тільки наповнювачем;

на Фіг. 37 - одержані in vivo дані про середній об'єм пухлин, одержаних з OVCAR-3 пухлин (модель, створена на мишах лінії SCID з вродженою відсутністю природних клітин-кілерів після трансплантації в жирове тіло молочної залози), після обробки різними кон'югованими з токсинами химерними антитілами 3A5, контрольними антитілами або тільки наповнювачем.

Докладний опис кращих варіантів здійснення винаходу

#### I. Визначення

Поняття «TAT-поліпептид, поліпептид TAT» і «TAT», як їх використовують у контексті даного опису, і у випадку, коли за ними впливає чисельне значення, належать до різних поліпептидів, при цьому повне позначення (тобто TAT/номер) стосується конкретних поліпептидних послідовностей, як вони позначені в контексті даного опису. Поняття «TAT/номер поліпептиду» і «TAT/номер», де «номер» являє собою фактичне чисельне позначення, застосовуване в даному описі, стосуються поліпептидів з нативною послідовністю, варіантів поліпептидів і фрагментів нативної послідовності поліпептидів і варіантів поліпептидів (які визначені далі в даному описі). TAT-поліпептиди, пропонувані в даному винаході, можна виділяти з різних джерел, таких як людські тканини різних типів або інші джерела, або одержувати за допомогою рекомбінації або методів синтезу. Поняття «TAT-поліпептид» стосується кожного індивідуального поліпептиду TAT/номер, пропонуваного в даному винаході. У даному описі будь-яке згадування «TAT-поліпептиду» стосується кожного з поліпептидів індивідуально або в сполученні один з од-



ним. Наприклад, опис одержання, очищення, дериватизації, одержання антитіл до нього, одержання ТАТ-зв'язуючих олігопептидів, одержання ТАТ-зв'язуючих молекул, введення, композицій, що містять його, лікування хвороби й т.д., стосується кожного поліпептиду, пропонованого у винаході, індивідуально. Поняття «ТАТ-поліпептид» включає також варіанти поліпептидів ТАТ/номер, пропонованих у даному винаході.

Поняття «нативна послідовність ТАТ-поліпептиду» означає поліпептид, який має однакову амінокислотну послідовність із відповідним ТАТ-поліпептидом, який має природне походження. Такі нативні послідовності ТАТ-поліпептидів можуть мати природне походження або їх можна одержувати рекомбінантно або шляхом синтезу. Поняття «нативна послідовність ТАТ-поліпептиду» стосується конкретно укорочених або секретуючих форм, які зустрічаються в природних умовах, специфічного ТАТ-поліпептиду (наприклад, послідовність позаклітинного домену), варіантних форм, які зустрічаються в природних умовах (наприклад, форм, одержаних у результаті альтернативного сплайсингу) і алейних варіантів поліпептиду, які зустрічаються в природних умовах. У деяких варіантах здійснення винаходу нативна послідовність ТАТ-поліпептидів, пропонованих у винаході, являє собою зрілу або повнорозмірну послідовність нативних поліпептидів, які містять повнорозмірні амінокислотні послідовності, представлені нижче на кресленнях. Стартовий і стоп-кодони (якщо вони позначені) на кресленнях виділені жирним шрифтом і підкреслені. Залишки нуклеїнових кислот, позначені «N» або «X» на представлених нижче кресленнях, означають залишок будь-якої нуклеїнової кислоти. Однак, хоча на прикладених кресленнях показано, що ТАТ-поліпептид починається із залишків метіоніну, які позначені на кресленнях, як амінокислота в положенні 1, представляється можливим застосовувати інші залишки метіоніну, локалізовані на кресленнях проти або за ходом транскрипції відносно амінокислоти в положенні 1, як стартовий амінокислотний залишок ТАТ-поліпептидів.

Поняття «позаклітинний домен» ТАТ-поліпептиду або «ECD» стосується форми ТАТ-поліпептиду, практично вільної від трансмембранних і цитоплазматичних доменів. Як правило, в ECD ТАТ-поліпептиду вміст трансмембранних і/або цитоплазматичних доменів повинен становити менш ніж 1% і переважно вміст зазначених доменів повинен становити менш ніж 0,5%. Повинно бути очевидно, що будь-які трансмембранні домени, ідентифіковані в ТАТ-поліпептидах, пропонованих у даному винаході, виявлені відповідно до критеріїв, які звичайно застосовують у даній галузі для ідентифікації такого типу гідрофобного домену. Точні межі трансмембранного домену можуть варіювати, але найбільш прийнятно не більш ніж приблизно на 5 амінокислот на будь-якому кінці домену, спочатку ідентифікованого в даному описі. Таким чином, необов'язково позаклітинний домен ТАТ-поліпептиду може містити приблизно 5 або меншу кількість амінокислот на будь-якому боці межі трансмембранного домену/позаклітинного

домену, як описано в прикладах або специфікації, і такі поліпептиди, які містять або не містять сигнальний пептид, і нуклеїнові кислоти, які їх кодують підпадають під обсяг даного винаходу.

Приблизна локалізація «сигнальних пептидів» різних ТАТ-поліпептидів, пропонованих у винаході, може бути позначена в даній специфікації і/або в прикладених кресленнях. Однак слід зазначити, що С-кінцева межа сигнального пептиду може варіювати, але найбільш краще не більш ніж приблизно на 5 амінокислот на будь-якому боці С-кінцевої межі сигнального пептиду, спочатку ідентифікованого в даному описі, при цьому С-кінцеву границю сигнального пептиду можна ідентифікувати відповідно до критеріїв, які звичайно застосовують у даній галузі для ідентифікації елемента такого типу амінокислотної послідовності (наприклад, Nielsen та ін., Prot. Eng. 10, 1997, сс. 1-6 von Heinje та ін., Nucl. Acids. Res. 14, 1986, сс. 4683-4690). Однак відомо також, що в деяких випадках відщеплення сигнальної послідовності від секретуючого поліпептиду не є повністю однаковим, що приводить до утворення більш одного виду, який секретується. Ці зрілі поліпептиди, від яких сигнальний пептид відщеплений у межах не більш ніж приблизно 5 амінокислот на будь-якому боці С-кінцевої межі сигнального пептиду, ідентифікованого в даному описі, і полінуклеотиди, що їх кодують, підпадають під обсяг даного винаходу.

Поняття «варіант ТАТ-поліпептид» означає ТАТ-поліпептид, переважно активний ТАТ-поліпептид, як він визначений у контексті даного опису, амінокислотна послідовність якого ідентична принаймні приблизно на 80% повнорозмірній нативній послідовності ТАТ-поліпептиду, що представлена в даному описі, послідовності ТАТ-поліпептиду, позбавленої сигнального пептиду, представленої в даному описі, послідовності позаклітинного домену ТАТ-поліпептиду із сигнальним пептидом або без нього, як вони представлені в даному описі, або будь-якого іншого фрагмента повнорозмірної послідовності ТАТ-поліпептиду, представленого у даному описі (такі як послідовності, які кодуються нуклеїновою кислотою, яка являє собою тільки частину повної кодуючої послідовності повнорозмірного ТАТ-поліпептиду). Такі варіанти ТАТ-поліпептиду включають, наприклад, ТАТ-поліпептиди, у яких один або декілька амінокислотних залишків додані або вилучені в результаті делеції на N- або С-кінці повнорозмірної нативної амінокислотної послідовності. Як правило, амінокислотна послідовність варіанта ТАТ-поліпептиду повинна бути ідентична принаймні приблизно на 80%, в іншому варіанті амінокислотна послідовність принаймні приблизно на 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99% ідентична повнорозмірній нативній послідовності ТАТ-поліпептиду, представлений в даному описі, послідовності ТАТ-поліпептиду, у якій відсутній сигнальний пептид, представлений в даному описі, позаклітинного домену ТАТ-поліпептиду із сигнальним пептидом або без нього, представленого в даному описі, або будь-якого іншого конкретного фрагменту повнорозмірної послідовності ТАТ-поліпептиду, представленого в

даному описі. Як правило, варіанти ТАТ-поліпептидів складаються принаймні приблизно з 10 амінокислот, в іншому варіанті принаймні приблизно з 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 амінокислот або більше. Необов'язково варіанти ТАТ-поліпептидів повинні мати не більше однієї консервативної амінокислотної заміни в порівнянні з нативною послідовністю ТАТ-поліпептиду, в іншому варіанті не більше 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 консервативних амінокислотних заміни у порівнянні з нативною послідовністю ТАТ-поліпептиду.

Поняття «відсоток (%) ідентичності амінокислотних послідовностей» відносно послідовностей ТАТ-поліпептидів, представлених у даному описі, означає відсоток амінокислотних залишків у розглянутій послідовності (послідовності-кандидаті), ідентичних амінокислотним залишкам у конкретній послідовності ТАТ-поліпептиду, після лінеаризації послідовностей і інтродукції при необхідності проломів для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовностей, і при цьому будь-які консервативні заміни не розглядаються при оцінці ідентичності послідовностей. Порівняльний аналіз первинної структури з метою визначення відсотка ідентичності амінокислотних послідовностей можна здійснювати різними шляхами, які відомі спеціалістам у даній ділянці, наприклад, з використанням доступних наукової громадськості комп'ютерних програм, таких як BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Спеціалісти в даній галузі можуть визначати відповідні параметри для здійснення порівняльного аналізу первинної структури, використовуючи будь-які алгоритми, які необхідні для найбільш повного порівняльного аналізу первинної структури відносно повнорозмірних послідовностей, з якими проводять порівняння. Однак для цілей даного опису відсоток (%) ідентичності амінокислотних послідовностей одержують, використовуючи призначену для порівняння послідовностей комп'ютерну програму ALIGN-2, повний вихідний код для програми ALIGN-2 представлений нижче в таблиці 1. Призначена для порівняння послідовностей комп'ютерна програма ALIGN-2 розроблена на фірмі Genentech, Inc., і вихідний код, представлений нижче в таблиці 1, зданий на зберігання разом з документацією для користувачів в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, де він зареєстрований під номером U.S. Copyright Registration No. TXU510087. Наукова громадськість може одержати програму ALIGN-2 від фірми Genentech, Inc., Південний Сан-Франциско, шт. Каліфорнія або може компілювати її на основі вихідного коду, представленого нижче в таблиці 1. Програму ALIGN-2 слід компілювати для застосування в оперативній системі UNIX, бажано цифровій UNIX V4.0D. Всі параметри для порівняння послідовностей закладені в програму ALIGN-2 і не повинні змінюватися.

У ситуаціях, коли для порівняння амінокислотних послідовностей застосовують ALIGN-2, відсоток ідентичності амінокислотних послідовностей для даної амінокислотної послідовності А відносно, у порівнянні з або до даної амінокислотної послідовності Б (в іншому варіанті це можна сформулювати як те, що дана амінокислотна послідовність А має певний відсоток ідентичності амінокислотної послідовності відносно, у порівнянні з або до даної амінокислотної послідовності Б) розраховують у такий спосіб:

$$100 \times X/Y$$

де Х означає кількість амінокислотних залишків, визнаних ідентичними при порівнянні первинної структури послідовностей А і Б з використанням програми порівняльного аналізу первинної структури послідовностей ALIGN-2, і де Y означає кількість амінокислотних залишків у Б. Повинно бути очевидно, що якщо довжина амінокислотної послідовності А не дорівнює довжині амінокислотної послідовності Б, то відсоток ідентичності амінокислотної послідовності А відносно Б не повинен дорівнювати відсотку ідентичності амінокислотної послідовності Б відносно А. Як приклади розрахунків відсотка ідентичності амінокислотних послідовностей за допомогою зазначеного методу в таблицях 2 і 3 продемонстровано як розраховувати відсоток ідентичності амінокислотних послідовностей амінокислотної послідовності, позначеної як «білок, з яким проводять порівняння», відносно амінокислотної послідовності, позначеної як «ТАТ», де «ТАТ» означає амінокислотну послідовність гіпотетичного ТАТ-поліпептиду, який являє інтерес, «білок, з яким проводять порівняння» означає амінокислотну послідовність поліпептиду, з яким слід порівнювати «ТАТ»-поліпептид, що являє інтерес, а «Х», «Y» і «Z» кожний означає різні гіпотетичні амінокислотні залишки. Якщо спеціально не зазначено інше, всі величини відсотка ідентичності амінокислотних послідовностей, зазначені в даному описі, одержують відповідно до методу, описаного в попередньому параграфі, за допомогою комп'ютерної програми ALIGN-2.

Поняття «варіант полінуклеотиду ТАТ» або «варіант нуклеотидної послідовності ТАТ» означає молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує ТАТ-поліпептид, переважно активний ТАТ-поліпептид, як він визначений у контексті даного опису, нуклеотидна послідовність якого ідентична принаймні приблизно на 80% нуклеотидній послідовності, яка кодує повнорозмірну нативну послідовність ТАТ-поліпептиду, представлену в даному описі, повнорозмірну нативну послідовність ТАТ-поліпептиду, позбавлену сигнального пептиду, представлену в даному описі, послідовність позаклітинного домену ТАТ-поліпептиду із сигнальним пептидом або без нього, як вони представлені в даному описі, або будь-який інший фрагмент повнорозмірної послідовності ТАТ-поліпептиду, представлений у даному описі (такі як послідовності, що кодуються нуклеїновою кислотою, яка являє собою тільки частину повної кодуєчої послідовності повнороз-

мірного TAT-поліпептиду). Як правило, нуклеотидна послідовність варіанта полінуклеотиду TAT повинна бути принаймні приблизно на 80% ідентична, в іншому варіанті ідентична принаймні приблизно на 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99% нуклеотидній послідовності, яка кодує повнорозмірну нативну послідовність TAT-поліпептиду, представлену в даному описі, повнорозмірну нативну послідовність TAT-поліпептиду, позбавлену сигнального пептиду, представлену в даному описі, послідовність позаклітинного домену TAT-поліпептиду із сигнальним пептидом або без нього, як вони представлені в даному описі, або будь-який інший фрагмент повнорозмірної послідовності TAT-поліпептиду, представлений у даному описі. Варіанти не містять нативну нуклеотидну послідовність.

Як правило, варіанти полінуклеотидів TAT складаються принаймні приблизно з 5 нуклеотидів, в іншому варіанті складаються принаймні приблизно з 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 або 1000 нуклеотидів, причому, у цьому контексті поняття «приблизно» означає, що довжина зазначеної нуклеотидної послідовності знаходиться у межах  $\pm 10\%$  від зазначеної довжини.

Поняття «відсоток (%) ідентичності нуклеотидних послідовностей» відносно кодуючих TAT нуклеотидних послідовностей, представлених у даному описі, означає відсоток нуклеотидів у розглянутій послідовності (послідовності-кандидаті), ідентичних нуклеотидам у нуклеотидній послідовності TAT, яка являє інтерес, після лінеаризації послідовностей і інтродукції при необхідності дефектів, для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовностей. Порівняльний аналіз первинної структури з метою визначення відсотка ідентичності нуклеотидних послідовностей можна здійснювати різними шляхами, які відомі спеціалістам у даній галузі, наприклад, з використанням доступних наукових громадськості комп'ютерних програм, таких як BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Однак для цілей даного опису величину відсотка ідентичності нуклеотидних послідовностей одержують, використовуючи призначену для порівняння послідовностей комп'ютерну програму ALIGN-2, повний вихідний код програми ALIGN-2 представлений нижче в таблиці 1. Призначена для порівняння послідовностей комп'ютерна програма ALIGN-2 розроблена на фірмі Genentech, Inc., і вихідний код, представлений нижче в таблиці 1, зданий на зберігання разом з документацією для користувачів в U.S.

Copyright Office, Washington D.C., 20559, де він зареєстрований під номером U.S. Copyright Registration No. TXU510087. Наукова громадськість може одержати програму ALIGN-2 через фірму Genentech, Inc., Південний Сан-Франциско, шт. Каліфорнія або може компілювати її на основі вихідного коду, представленого нижче в таблиці 1. Програму ALIGN-2 слід компілювати для застосування в оперативній системі UNIX, переважно цифровій UNIX V4.0D. Всі параметри для порівняння послідовностей закладені в програму ALIGN-2 і не повинні змінюватися.

У ситуаціях, коли ALIGN-2 застосовують для порівняння нуклеотидних послідовностей, відсоток (%) ідентичності нуклеотидних послідовностей для даної нуклеотидної послідовності В відносно, у порівнянні з або до даної нуклеотидної послідовності Г (в іншому варіанті можна позначати так, що дана нуклеотидна послідовність В має певний відсоток ідентичності нуклеотидної послідовності відносно, у порівнянні з або до даної нуклеотидної послідовності Г) розраховують у такий спосіб:

$$100 \times W/Z$$

де W означає кількість нуклеотидів, визнаних ідентичними при порівнянні первинної структури послідовностей В та Г за допомогою програми для порівняльного аналізу первинної структури послідовностей ALIGN-2, і де Z означає кількість нуклеотидів у Г. Повинно бути очевидно, що, якщо довжина нуклеотидної послідовності В не дорівнює довжині нуклеотидної послідовності Г, то відсоток ідентичності нуклеотидної послідовності В відносно Г не повинен дорівнювати відсотку ідентичності нуклеотидної послідовності Г відносно В. Як приклади розрахунків відсотка ідентичності нуклеотидних послідовностей у таблицях 4 і 5 продемонстровано як розраховувати відсоток ідентичності нуклеотидних послідовностей нуклеотидної послідовності, позначеної як «ДНК, з якою проводять порівняння», і нуклеотидної послідовності, позначеної як «ДНК TAT», де «ДНК TAT» означає гіпотетичну нуклеотидну послідовність, яка являє інтерес, яка кодує TAT, «ДНК, з якою проводять порівняння» означає нуклеотидну послідовність молекули нуклеїнової кислоти, з якою слід порівнювати молекулу нуклеїнової кислоти «ДНК TAT», яка являє інтерес, а «N», «L» та «V» кожний означає різні гіпотетичні нуклеотиди. Якщо спеціально не зазначено інше, всі величини відсотка ідентичності нуклеотидних послідовностей, зазначені в даному описі, одержують відповідно до методу, що описаний в попередньому параграфі, за допомогою комп'ютерної програми ALIGN-2.

В інших варіантах здійснення винаходу варіанти полінуклеотидів TAT являють собою молекули нуклеїнових кислот, які кодують TAT-поліпептид і які мають здатність гібридизуватися, переважно в строгих умовах гібридизації та відмивання, з нуклеотидними послідовностями, які кодують повнорозмірний TAT-поліпептид, представлений у даному описі. Варіанти TAT-поліпептидів можуть являти собою поліпептиди, які кодуються варіантами полінуклеотидів TAT.

Поняття «повнорозмірна кодуюча ділянка» відносно нуклеїнової кислоти, яка кодує ТАТ-поліпептид, стосується нуклеотидної послідовності, яка кодує повнорозмірний ТАТ-поліпептид, пропонується у винаході (який на прикладених кресленнях, як правило, позначений між стартовим і стоп-кодонами, включаючи їх). Поняття «повнорозмірна кодуюча ділянка» відносно нуклеїнової кислоти, депонованої в АТСС, стосується фрагменту кДНК, що кодує ТАТ-поліпептид, який вбудований у вектор, депонований в АТСС (який на прикладених кресленнях, як правило, позначений між стартовим і стоп-кодонами, включаючи їх).

Поняття «виділений» відносно різних ТАТ-поліпептидів, представлених у даному описі, означає поліпептид, який був ідентифікований і відділений і/або вилучений з компонента його природного оточення. Забруднювачами в його природному оточенні є продукти, які, як правило, здійснюють вплив при діагностичному або терапевтичному застосуванні поліпептиду, і вони можуть включати ферменти, гормони й інші білкові або небілкові розчинені речовини. У кращих варіантах здійснення винаходу поліпептид повинен бути очищений до (1) ступеня, достатнього для одержання принаймні 15 залишків N-кінцевої або внутрішньої амінокислотної послідовності за допомогою секвенатора з обертовою чашкою або до (2) гомогенного стану за даними ДСН-ПААГ у відновних або невідновних умовах, при забарвленні кумаси брильянтовым блакитним або переважно при забарвленні сріблом. До виділеного поліпептиду належить поліпептид, який знаходиться *in situ* у рекомбінантних клітинах, якщо в них не є присутнім жоден компонент природного оточення ТАТ-поліпептиду. Однак, як правило, виділений поліпептид слід одержувати з використанням принаймні однієї стадії очищення.

Поняття «виділена» нуклеїнова кислота, яка кодує ТАТ-поліпептид або нуклеїнова кислота, яка кодує інший поліпептид стосується молекули нуклеїнової кислоти, яка ідентифікована й відділена принаймні від однієї молекули нуклеїнової кислоти-забруднювача, з якою вона звичайно асоційована в джерелі нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, яке зустрічається в природних умовах. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, має іншу форму або набір відносно того, у якому вона зустрічається в природі. Таким чином, виділені молекули нуклеїнових кислот, які кодують поліпептид, відрізняються від специфічної молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, що присутня у клітинах у природних умовах. Однак виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, включає молекули нуклеїнових кислот, які кодують поліпептид, які містяться в клітинах, які в нормі експресують поліпептид, де, наприклад, хромосомна локалізація молекули нуклеїнової кислоти відмінна від локалізації, властивій клітинам у природних умовах.

Поняття «контролюючі послідовності» стосується послідовностей ДНК, необхідних для експресії функціонально зв'язаної кодуючої послідовності, у конкретному організмі-хазяїні. Контролюючі послідовності, придатні для прокарі-

от, включають, наприклад, промотор, необов'язково послідовність оператора й сайт зв'язування рибосом. Відомо, що еукаріотичні клітини використовують промотори, сигнали поліаденілування й енхансери.

Нуклеїнова кислота «функціонально зв'язана», коли вона знаходиться у функціональній взаємодії з іншою нуклеотидною послідовністю. Наприклад, ДНК передпослідовності або секреторного лідера функціонально зв'язана із ДНК, яка кодує поліпептид, якщо вона експресується у вигляді передбілка, який бере участь у секреції поліпептиду; промотор або енхансер функціонально зв'язаний з кодуючою послідовністю, якщо він впливає на транскрипцію послідовності; або сайт зв'язування рибосом функціонально зв'язаний з кодуючою послідовністю, якщо він розташований так, що полегшує трансляцію. Як правило, «функціонально зв'язана» означає, що послідовності ДНК, будучи зв'язані, є суміжними й, у випадку лідера секреції, суміжними у рамці читування. Однак для енхансерів не є необхідним, щоб вони були суміжними. Зв'язування здійснюють за допомогою вбудовування шляхом лігування у відповідні сайти рестрикції. Якщо такі сайти не існують, то відповідно до загальноприйнятої практики застосовують синтетичні олігонуклеотидні адаптори або лінкери.

«Строгість» реакцій гібридизації легко може визначати звичайний спеціаліст у даній галузі, і, як правило, вона розраховується емпірично залежно від довжини зонда, температури відмивання й концентрації солей. Як правило, при використанні більш довгих зондів для правильної ренатурації (відпалювання) потрібні більш високі температури, а при використанні більш коротких зондів потрібні більш низькі температури. Гібридизація, як правило, залежить від здатності денатурованої ДНК до повторної ренатурації при температурі нижче її температури плавлення, коли в навколишньому середовищі присутні комплементарні ланцюги. Для досягнення більш високого ступеня необхідної гомології між зондом і здатною до гібридизації послідовністю можна застосовувати більш високі відносні температури. У результаті більш високі відносні температури мають тенденцію робити реакційні умови більш строгими, у той час як більш низькі температури знижують строгість. Додаткові подробиці та пояснення строгості гібридизації див., наприклад, в Ausubel та ін., *Current Protocols in Molecular Biology*, вид-во Wiley Interscience Publishers, 1995.

Поняття «строгі умови» або «умови високої строгості» у контексті даного опису можна охарактеризувати як: (1) застосування низької іонної сили та високої температури для відмивання, наприклад, 0,015М хлориду натрію/0,0015М цитрату натрію/0,1% додецилсульфату натрію (ДСН) при 50°C; (2) застосування в процесі гібридизації денатуруючого агента, такого як формамід, наприклад, 50 об. % формаміду, доповненого 0,1% бичачого сироваткового альбуміну/0,1% фіколу/0,1% полівінілпіроліону/50мМ натрійфосфатним буфером при рН 6,5, який містить 750мМ хлорид натрію, 75мМ цитрат натрію при 42°C; або (3) гібридизація протягом ночі в розчині, який містить 50% формаміду,

5×SSC (0,75M NaCl, 0,075M цитрат натрію), 50mM фосфат натрію (pH 6,8), 0,1% пірофосфату натрію, 5×розчин Денхардта, опромінена ультразвуком ДНК сперми лосося (50мкг/мл), 0,1% ДСН і 10% сульфату декстрану при 42°C, з 10-хвилинним відмиванням при 42°C в 0,2×SSC (хлорид натрію/цитрат натрію) з наступним 10-хвилинним відмиванням у строгих умовах з використанням 0,1×SSC, який містить ЕДТК, при 55°C.

«Умови середньої строгості» визначені, зокрема, в Sambrook та ін., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, вид-во Cold Spring Harbor Press, New York, 1989, і передбачають застосування розчину для відмивання й умов для гібридизації (наприклад, температуру, іонну силу й % ДСН) менш строгі в порівнянні з описаними вище. Прикладом умов середньої строгості є інкубація протягом ночі при 37°C у розчині, який містить: 20% формаміду, 5×SSC (150mM NaCl, 15mM тринатрійцитрат), 50mM фосфат натрію (pH 7,6), 5×розчин Денхардта, 10% сульфату декстрану та 20мг/мл недатурованої фрагментованої ДНК сперми лосося, з наступним відмиванням фільтрів в 1×SSC при температурі приблизно 37-50°C. Спеціалісту в даній галузі повинно бути очевидно, як регулювати температуру, іонну силу й т.д., які необхідно погоджувати з такими факторами, як довжина зонду й т.п.

Поняття «мічений епітоп» у контексті даного опису означає химерний поліпептид, який містить ТАТ-поліпептид або антитіло до ТАТ, злите з «поліпептидом-міткою». Поліпептид-мітка має достатню кількість залишків для одержання епітопу, до якого можна створити антитіло, але є в достатньому ступені коротким, щоб не впливати на активність поліпептиду, з яким він злитий. Поліпептид-мітка переважно також фактично є унікальним, у результаті чого антитіло не має помітну перехресну реактивність із іншими епітопами. Прийнятні поліпептиди-мітки, як правило, мають принаймні 6 амінокислотних залишків і звичайно приблизно від 8 до 50 амінокислотних залишків (переважно приблизно від 10 до 20 амінокислотних залишків).

Поняття «активний» або «активність» у контексті даного опису стосується форми(м) ТАТ-поліпептиду, яка(і) зберігає(ють) біологічну і/або імунологічну активність нативного або такого, що зустрічається в природних умовах ТАТ, де поняття «біологічна» активність стосується біологічної функції (або інгібуючої, або стимулюючої), обумовленої нативним або таким, що зустрічається в природних умовах ТАТ, відмінної від здатності продукувати утворення антитіла до антигенного епітопу, яка властива нативному або такому, що зустрічається в природних умовах ТАТ, а поняття «імунологічна активність» стосується здатності продукувати антитіло до антигенного епітопу, властивий нативному або такому, що зустрічається в природних умовах, ТАТ.

Поняття «антагоніст» застосовують у його найбільш широкому сенсі, і воно стосується будь-якої молекули, яка частково або повністю блокує, інгібує або нейтралізує біологічну активність нативного ТАТ-поліпептиду, пропонованого в даному винаході. Аналогічно цьому поняття «аго-

ніст» застосовують у його найбільш широкому сенсі, і воно стосується будь-якої молекули, яка імітує біологічну активність нативного ТАТ-поліпептиду, пропонованого в даному винаході. Прийнятні молекули агоністів або антагоністів включають, насамперед, агоністичні або антагоністичні антитіла або фрагменти антитіл, фрагменти або варіанти амінокислотних послідовностей нативних ТАТ-поліпептидів, пептиди, антисмислові олігонуклеотиди, невеликі органічні молекули й т.д. Методи ідентифікації агоністів або антагоністів ТАТ-поліпептиду можуть передбачати приведення в контакт ТАТ-поліпептиду з молекулою, яка може бути агоністом або антагоністом (молекула-кандидат), оцінку помітної зміни одного або декількох видів біологічної активності, пов'язаної в нормі з ТАТ-поліпептидом.

Поняття «лікувати» або «лікування» або «полегшення» стосується як терапевтичного лікування, так і профілактичних або превентивних мір, де задача полягає в попередженні або вповільненні (послабленні) цільового патологічного стану або порушення. Пацієнти, які потребують лікування, включають пацієнтів, які вже мають порушення, схильні до виникнення порушення або тих пацієнтів, у яких слід попереджати появу порушення. «Лікування» людини або ссавця, який страждає раком, при якому відбувається експресія ТАТ-поліпептиду, є успішним, якщо після введення в терапевтичній кількості антитіла до ТАТ, ТАТ-зв'язуючого олігопептиду або ТАТ-зв'язуючої органічної молекули відповідно до способів, пропонованих у даному винаході, у пацієнта виявлені помітне і/або вимірюване зниження або відсутність одного або декількох наступних параметрів: зменшення кількості ракових клітин або відсутність ракових клітин; зменшення розміру пухлини; інгібування (тобто зниження до деякої міри або краще припинення) інфільтрації ракових клітин у периферичні органи, включаючи поширення раку в м'язу та кісткову тканину; інгібування (тобто зниження до певного ступеня або краще припинення) метастазування пухлини; інгібування до деякого ступеня росту пухлини; і/або полегшення до деякого ступеня одного або декількох симптомів, пов'язаних з конкретним типом раку; зниження поширеності захворювання й смертності та поліпшення в результаті якості життя. Залежно від ступеня, у якому антитіло до ТАТ або ТАТ-зв'язуючий олігопептид можуть попереджати ріст і/або знищувати існуючі ракові клітини, вони можуть бути цитостатичними і/або цитотоксичними. Пацієнт може почувати зменшення цих ознак або симптомів.

Зазначені вище параметри, за якими оцінюють успішність лікування та поліпшення стану хвороби, легко може визначати лікар за допомогою загальноприйнятих процедур. Ефективність терапії раку можна оцінювати, наприклад, визначаючи тривалість розвитку хвороби (ТТР) і/або визначаючи інтенсивність відповіді (RR). Метастази можна визначати шляхом визначення стадії захворювання та сканування кісткової тканини та визначення рівня кальцію й інших ферментів для оцінки поширення в кісткову тканину. Можна здійснювати також сканування за допомогою комп'ютерної томо-

графії (КТ) для визначення поширення в ділянку таза та лімфатичні вузли в цій ділянці. Рентген грудної клітини й визначення рівня ферментів печінки відомими методами використовують для виявлення метастазів у легені та печінку відповідно. Інші загальноприйняті методи моніторингу захворювання включають трансректальну ультразвукову ехографію (TRUS) і трансректальну пункційну біопсію (TRNB).

Поняття «хронічне» введення стосується тривалого введення агента(ів), на протидію гострому введенню, так, щоб підтримувати початкову терапевтичну дію (активність) протягом пролонгованого періоду часу. «Дробове (переривчасте)» введення стосується лікування, яке здійснюють не безперервно, а з перервами, але яке за своєю природою скоріше є циклічним.

Поняття «ссавець», що підлягає лікуванню, полегшенню симптомів або в якого здійснюють діагностику раку, включає будь-яку тварину, що належить до класу ссавців, включаючи людей, домашніх і сільськогосподарських тварин, а також живучих у зоопарку, призначених для спорту або кімнатних тварин, таких як собаки, кішки, корови, коні, вівці, свині, кози, кролики й т.д. Переважно, ссавець являє собою людину.

Введення «у сполученні з» одним або декількома додатковими терапевтичними агентами включає одночасне (конкурентне) і послідовне введення в будь-якому порядку.

Поняття «носії» у контексті даного опису стосується фармацевтично прийнятних носіїв, ексципієнтів або стабілізаторів, які є нетоксичними для клітин або ссавця при застосуванні їх у прийнятних дозах і концентраціях. Часто фізіологічно прийнятний носій являє собою водний рН-забуферувальний розчин. Прикладами фізіологічно прийнятних носіїв є буфери, такі як фосфатний, цитратний і буфер на основі інших органічних кислот; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту; низькомолекулярні (менше приблизно 10 залишків) поліпептиди; білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди й інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатувальні агенти, такі як ЕДТК; цукрові спирти, такі як маніт або сорбіт; солеутворюючі протиіони, такі як іони натрію; і/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі як TWEEN®, поліетиленгліколь (ПЕГ) і PLURONICS®.

Поняття «тверда фаза» або «тверда підкладка» означає неводну матрицю, до якої антитіло, ТАТ-зв'язуючий олігопептид або ТАТ-зв'язуючу органічну молекулу можна прикріплювати або приєднувати. Прикладами твердих фаз у контексті даного опису є фази, які складаються повністю або частково зі скла (наприклад, скла з контрольованими порами), полісахаридів (наприклад, агарози), поліакриламідів, полістиролу, полівінілового спирту та силіконів. У конкретних варіантах здійснення винаходу, залежно від контексту, тверда фаза може являти собою лунку планшета, у якому здійснюють аналіз; в інших вона являє собою ко-

лонку для очищення (наприклад, колонку для афінної хроматографії). Під це поняття підпадає також переривчаста тверда фаза, яка складається з окремих частинок, наприклад, фази, які описані в U.S. 4275149.

«Ліпосома» являє собою невелику бульбашку, яка складається з різних типів ліпідів, фосфоліпідів і/або поверхнево-активних речовин, яку можна застосовувати для введення лікарського засобу (такого як ТАТ-поліпептид, антитіло до нього або ТАТ-зв'язуючий олігопептид) ссавцю. Компоненти ліпосоми, як правило, мають двошарову будову, що нагадує організацію ліпідів у біологічних мембранах.

Поняття «невелика» молекула або «невелика» органічна молекула в контексті даного опису стосується молекули з молекулярною масою менше приблизно 500 Да.

«Ефективна кількість» поліпептиду, антитіла, ТАТ-зв'язуючого олігопептиду, ТАТ-зв'язуючої органічної молекули або їх агоніста або антагоніста, представлених у даному описі, являє собою кількість, достатню для вирішення конкретної поставленої задачі. «Ефективну кількість» можна визначати емпірично й загальноприйнятим чином залежно від поставленої задачі.

Поняття «терапевтично ефективна кількість» стосується кількості антитіла, поліпептиду, ТАТ-зв'язуючого олігопептиду, ТАТ-зв'язуючої органічної молекули або іншого лікарського засобу, що ефективно «лікує» захворювання або порушення в людини або ссавця. У випадку раку терапевтично ефективна кількість лікарського засобу може зменшувати кількість ракових клітин; зменшувати розмір пухлини; інгібувати (тобто знижувати певною мірою або переважно припиняти) інфільтрацію ракових клітин у периферичні органи; інгібувати (тобто знижувати певною мірою або переважно припиняти) метастазування пухлини; інгібувати певною мірою ріст пухлини; і/або полегшувати певною мірою один або декілька симптомів, пов'язаних з раком (див. визначення поняття «лікувати»). Залежно від ступеня, у якому лікарський засіб може попереджати ріст і/або знищувати існуючі ракові клітини, воно може бути цитостатичним і/або цитотоксичним.

«Кількість, що інгібує ріст» антитіла до ТАТ, ТАТ-поліпептиду, ТАТ-зв'язуючого олігопептиду або ТАТ-зв'язуючої органічної молекули являє собою кількість, яка може інгібувати ріст клітини, насамперед пухлинної, наприклад, ракової клітини, або *in vitro*, або *in vivo*. «Кількість, що інгібує ріст» антитіла до ТАТ, ТАТ-поліпептиду, ТАТ-зв'язуючого олігопептиду або ТАТ-зв'язуючої органічної молекули для інгібування росту неопластичних клітин можна визначати емпірично та загальноприйнятим чином.

«Цитотоксична кількість» антитіла до ТАТ, ТАТ-поліпептиду, ТАТ-зв'язуючого олігопептиду або ТАТ-зв'язуючої органічної молекули являє собою кількість, яка може викликати деструкцію клітини, насамперед пухлинної, наприклад, ракової клітини, або *in vitro*, або *in vivo*. «Цитотоксичну кількість» антитіла до ТАТ, ТАТ-поліпептиду, ТАТ-зв'язуючого олігопептиду або ТАТ-зв'язуючої орга-

нічної молекули для інгібування росту неопластичних клітин можна визначати емпірично та загальноприйнятим чином.

Поняття «антитіло» у контексті даного опису застосовують у його найбільш широкому смислі, і воно стосується, наприклад, індивідуальних моноклональних антитіл до ТАТ (включаючи агоністичні, антагоністичні та нейтралізуючі антитіла), композицій антитіл до ТАТ з поліепітопною специфічністю, поліклональних антитіл, одноланцюгових антитіл до ТАТ і фрагментів антитіл до ТАТ (див. нижче), які зберігають свою необхідну біологічну або імунологічну активність. Поняття «імуноглобулін» (Ig) і поняття «антитіло» у контексті даного опису використовують взаємозамінно.

«Виділене антитіло» являє собою антитіло, яке ідентифіковане та відділене від і/або одержане з компонента його природного оточення. Забруднювачами в його природному оточенні є продукти, які можуть здійснювати вплив при діагностичному або терапевтичному застосуванні антитіла, і вони можуть включати ферменти, гормони й інші білкові або небілкові розчинені речовини. У кращих варіантах здійснення винаходу антитіло повинне бути очищене до (1) більше 95% у перерахунку на масу антитіла, що визначають методом Лоурі, і найкраще більше 99 мас.%, до (2) ступеня, достатнього для одержання принаймні 15 залишків N-кінцевої або внутрішньої амінокислотної послідовності за допомогою секвінатора з обертовою чашкою або до (3) гомогенного стану за даними ДСН-ПААГ у відновних або невідновних умовах при забарвленні кумаси брильянтовым блакитним або переважно при забарвленні сріблом. До виділеного антитіла належить антитіло, яке знаходиться *in situ* у рекомбінантній клітині, якщо в ній не присутній будь-який компонент природного оточення антитіла. Однак, як правило, виділене антитіло повинно бути одержане з використанням принаймні однієї стадії очищення.

Основна чотириланцюгова одиниця антитіла являє собою гетеротетрамірний глікопротеїн, який складається із двох ідентичних легких (L) ланцюгів і двох ідентичних важких (H) ланцюгів (антитіло ізотипу IgM складається з 5 основних гетеродимерних одиниць поряд з додатковим поліпептидом, який позначений як J-ланцюг, і в результаті містить 10 антигензв'язуючих центрів, а антитіла ізотипу IgA, що секретуються, можуть полімеризуватися з утворенням полівалентних груп, які містять 2-5 з основних чотирьох ланцюгових одиниць, поряд з J-ланцюгом). У випадку IgG чотириланцюгова одиниця, як правило, має молекулярну масу приблизно 150000 Да. Кожний L-ланцюг зв'язаний з H-ланцюгом за допомогою одного ковалентного дисульфідного зв'язку, у той час як два H-ланцюги зв'язані один з одним за допомогою одного або декількох дисульфідних містків залежно від ізотипу H-ланцюга. Кожний H- і L-ланцюг включає також правильно розташовані в просторі дисульфідні містки всередині ланцюгів. Кожний H-ланцюг має N-кінцеву варіабельну ділянку ( $V_H$ ), за якою ідуть три константні ділянки ( $C_H$ ) у кожному  $\alpha$ - і  $\gamma$ -ланцюгах і 4  $C_H$ -ділянки у  $\mu$ - і  $\epsilon$ -ізотипах. Кожний L-

ланцюг має на N-кінці варіабельну ділянку ( $V_L$ ), за якою розташована константна ділянка ( $C_L$ ) на іншому його кінці.  $V_L$  вистроєна в лінію з  $V_H$ , а  $C_L$  вистроєна в лінію з першою константною ділянкою важкого ланцюга ( $C_H1$ ). Імовірно, визначені амінокислотні залишки утворюють поверхню розділу між варіабельними ділянками легкого ланцюга та важкого ланцюга. При спарюванні  $V_H$  і  $V_L$  утворюють один антигензв'язуючий центр. Структура та властивості різних класів антитіл описані, наприклад, в Basic and Clinical Immunology, 8-ме вид., під ред. Daniel P. Stites, Abba I. Terr і Tristram G. Parslow, вид-во Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, с. 71 і розділ 6.

L-ланцюг будь-яких видів хребетних тварин можна віднести до одного із двох різних чітко виражених типів, позначених як капа- і лямба-тип, на основі амінокислот амінокислотних послідовностей їх константних ділянок. Залежно від амінокислотної послідовності константної ділянки їх важких ланцюгів ( $C_H$ ) імуноглобуліни можна віднести до різних класів або ізотипів. Відомо п'ять класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG та IgM, важкі ланцюги яких позначають як  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  і  $\mu$  відповідно,  $\gamma$ - і  $\alpha$ -класи додатково розділяють на підкласи на основі відносно невеликих розходжень в  $C_H$ -послідовності та функції, наприклад, в організмі людини експресуються наступні підкласи: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 та IgA2.

Поняття «варіабельний» стосується ситуації, коли визначені сегменти варіабельних ділянок різних антитіл у значній мірі відрізняються по послідовності. V-ділянка опосередковує зв'язування антигену та визначає специфічність конкретного антитіла щодо конкретного антигена. Однак варіабельність не рівномірно розподіляється у фрагменті варіабельних ділянок, що складається з 110 амінокислот. Навпроти, V-ділянки складаються з відносно незмінних ділянок, позначених як каркасні ділянки (FR), які складаються з 15-30 амінокислот, розділених більш короткими дуже варіабельними ділянками, які називають «гіперваріабельні ділянки», кожна довжиною 9-12 амінокислот. Кожна з варіабельних ділянок нативних важких і легких ланцюгів містить чотири FR, добре адаптованих до  $\beta$ -складчастої конформації, які зв'язані трьома гіперваріабельними ділянками, які утворюють петлі, що з'єднують і в деяких випадках формують частину  $\beta$ -складчастої структури. Гіперваріабельні ділянки в кожному ланцюзі підтримуються в тісному зв'язку один з одним за допомогою FR і разом з гіперваріабельними ділянками іншого ланцюга приймають участь в утворенні антигензв'язуючого центра антитіл (див. Kabat та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991). Константні ділянки не приймають участі безпосередньо у зв'язуванні антитіла з антигеном, але вони мають різні ефекторні функції, такі як участь антитіла в антитіло-обумовленої клітинозалежної цитотоксичності (ADCC).

Поняття «моноклональне антитіло» у контексті даного опису означає антитіло, одержане з популяції практично гомогенних антитіл, тобто індиві-

дуальні антитіла, що входять до популяції, ідентичні за винятком можливих мутацій, що зустрічаються в природних умовах, які можуть бути присутніми у невеликих кількостях. Моноклональні антитіла є високо специфічними і являють собою антитіла до одного антигенного сайту. Крім того, на відміну від препаратів поліклональних антитіл, які включають різні антитіла до різних детермінантів (епітопам), кожне моноклональне антитіло напрямлене до одного детермінанту на антигені. Крім їх специфічності перевагою моноклональних антитіл є те, що їх можна синтезувати без забруднення іншими антитілами. Прикметник «моноклональне» не має на увазі одержання антитіла за допомогою якого-небудь конкретного методу. Наприклад, моноклональні антитіла, які можна застосовувати відповідно до даного винаходу, можна одержувати за допомогою методу на основі гібридом, уперше описаного Kohler та ін., *Nature*, 256, 1975, с. 495, або їх можна створювати за допомогою методів рекомбінантної ДНК у бактеріях, клітинах еукаріотичних тваринних або рослинних клітинах (див., наприклад, U.S. 4816567). «Моноклональні антитіла» можна виділяти також з фагових бібліотек антитіл за допомогою методик, описаних, наприклад, в Clackson та ін., *Nature*, 352, 1991, сс. 624-628 та в Marks та ін., *J. Mol. Biol.*, 222, 1991, сс. 581-597.

Моноклональні антитіла в контексті даного опису, зокрема, включають «химерні» антитіла, у яких частина важкого і/або легкого ланцюга ідентична або гомологічна відповідним послідовностям антитіл, одержаним з конкретних видів або належить конкретному класу або підкласу антитіл, а інша ділянка ланцюга(ів) ідентична або гомологічна відповідним послідовностям антитіл, одержаним з інших видів або належить іншому класу або підкласу антитіл, включаючи фрагменти таких антитіл, у випадку, якщо вони мають необхідну біологічну активність (U.S. 4816567; та Morrison та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1984, сс. 6851-6855). Химерні антитіла, що являють інтерес, включають «приматизовані» антитіла, які містять варіабельну ділянку антигензв'язуючих послідовностей, виведену із примата крім людини (наприклад, нижчих вузьконосих мавп, мавп і т.д.), і послідовності людських константних ділянок.

«Інтактне антитіло» являє собою антитіло, яке містить антигензв'язуючу ділянку, а також  $C_L$  і принаймні константні ділянки важкого ланцюга  $C_H1$ ,  $C_H2$  та  $C_H3$ . Константні ділянки можуть являти собою константні ділянки, які мають нативні послідовності (наприклад, людські константні ділянки, які мають нативні послідовності), або варіанти їх амінокислотних послідовностей. Переважно інтактне антитіло має одну або декілька ефекторних функцій.

«Фрагменти антитіла» являють собою частину інтактного антитіла, переважно антигензв'язуючий центр або варіабельну ділянку інтактного антитіла. Приклади фрагментів антитіла включають Fab-, Fab'-,  $F(ab')_2$ - та Fv-фрагменти; подвійні антитіла, лінійні антитіла (див. U.S. 5641870, приклад 2; Zapata та ін., *Protein Eng.* 8(10), 1995, сс. 1057-1062); молекули одноланцюгових антитіл; і мульти-

специфічні антитіла, одержані із фрагментів антитіл.

При розщепленні антитіл папаїном утворюються два ідентичних антигензв'язуючих фрагменти, які називають «Fab»-фрагментами, і залишається «Fc»-фрагмент, назва якого відбиває його здатність легко кристалізуватися. Fab-фрагмент складається з повного L-ланцюга поряд з варіабельною ділянкою H-ланцюга ( $V_H$ ) і першою константною ділянкою одного важкого ланцюга ( $C_H1$ ). Кожний Fab-фрагмент є моновалентним відносно антигензв'язуючого центра, тобто він має один антигензв'язуючий центр. Після обробки антитіла пепсином утворюється один великий  $F(ab')_2$ -фрагмент, який грубо відповідає двом зв'язаним дисульфідним містком Fab-фрагментам, має дивалентну антигензв'язуючу активність та ще зберігає здатність до перехресного зв'язування з антигеном. Fab'-фрагменти відрізняються від Fab-фрагментів наявністю додаткових декількох залишків на C-кінці  $C_H1$ -ділянки, включаючи один або декілька залишків цистеїну із шарнірної ділянки антитіла. Fab'-SH у контексті даного опису стосується Fab'-фрагменту, у якому залишок(ки) цистеїну константних ділянок несуть три тільні групи.  $F(ab')_2$ -фрагменти антитіла спочатку одержували у вигляді пар Fab'-фрагментів, між якими знаходяться цистеїни шарнірної ділянки. Відомі також інші хімічні сполучення фрагментів антитіл.

Fc-фрагмент містить C-кінцеві ділянки обох H-ланцюгів, які утримуються разом дисульфідними мостиками. Ефекторні функції антитіл визначаються послідовностями Fc-фрагмента, ця ділянка є також частиною, що розпізнається Fc-рецепторами, які присутні на певних типах клітин.

«Fv» являє собою мінімальний фрагмент антитіла, що містить повний антигенрозпізнавальний і антигензв'язуючий центр. Цей фрагмент складається з димеру, що включає одну варіабельну ділянку важкого ланцюга та одну варіабельну ділянку легкого ланцюга в тісному нековалентному зв'язку. У результаті складчастості цих двох доменів утворюється шість гіперваріабельних петель (по 3 петлі з кожного H- і L-ланцюга), які включають амінокислотні залишки для зв'язування антигену та надають антитілу здатності до зв'язування з антигеном. Однак навіть одна варіабельна ділянка (або половина Fv, що включає тільки три CDR, специфічних для антигену) має здатність розпізнавати та зв'язувати антиген, хоча з більш низькою афінністю, у порівнянні з повним зв'язуючим центром.

«Одноланцюгові Fv», позначені скорочено також як «sFv» або «scFv», являють собою фрагменти антитіла, які містять  $V_H$ - і  $V_L$ -ділянки антитіла, з'єднані у вигляді одноланцюгового поліпептидного ланцюга. Переважно sFv-поліпептид додатково містить поліпептидний лінкер між  $V_L$ - і  $V_H$ -ділянками, що надає scFv-фрагменту будову, необхідну для зв'язування з антигеном. Огляд даних, що відповідають scFv, див. у Pluckthin в: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, том 113, під ред. Rosenbrug і Moore, вид-во Springer-Verlag, New York, сс. 269-315, 1994.



Поняття «подвійні антитіла» стосується невеликих фрагментів антитіл, одержаним шляхом створення sFv-фрагментів (див. попередній параграф) з коротким лінкером (приблизно 5-10 залишків) між  $V_H$ - і  $V_L$ -ділянками, що дозволяє здійснювати спарювання V-ділянок між ланцюгами, але не усередині ланцюгів, це приводить до утворення бівалентного фрагмента, тобто фрагмента із двома антигензв'язуючими сайтами. Біспецифічні подвійні антитіла являють собою гетеродимери двох sFv-фрагментів-«кросоверів», у яких  $V_H$ - та  $V_L$ -ділянки двох антитіл присутні в різних поліпептидних ланцюгах. Подвійні антитіла більш докладно описані, наприклад, в EP 404097; WO 93/11161; та у Hollinger та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1993, сс. 6444-6448.

«Гуманізовані» форми антитіл тварин крім людини (наприклад, гризунів) являють собою химерні антитіла, які включають мінімальну послідовність, одержану з антитіла тварини крім людини. Основна частина гуманізованих антитіл представлена людськими імуноглобулінами (антитіло-реципієнт), у яких залишки з гіперваріабельної ділянки реципієнта замінені залишками з гіперваріабельної ділянки інших видів крім людини (антитіло-донор), таких як миша, щур, кролик або примати крім людини, які мають необхідну специфічність, афінність та потенціал щодо антитіла. У деяких випадках залишки каркасної ділянки (FR) людського імуноглобуліну замінюють відповідними залишками імуноглобуліну виду крім людини. Крім того, гуманізовані антитіла можуть містити залишки, які не присутні в антитілі-реципієнті або в антитілі-донорі. Ці модифікації здійснюються із метою додаткового вдосконалення характеристик антитіла. У цілому, гуманізоване антитіло повинне містити практично повністю принаймні одну, а, як правило, дві варіабельні ділянки, у яких всі або практично всі гіперваріабельні петлі відповідають петлям зазначених імуноглобулінів тварин крім людини, а всі або практично всі FR відповідають послідовності імуноглобуліну людини. Гуманізоване антитіло необов'язково може містити також принаймні частину константної ділянки імуноглобуліну (Fc), як правило, людського імуноглобуліну. Додаткові більш докладні дані див. в 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. 593-59.

«Залежне від виду антитіло», наприклад, антитіло ссавця до людського IgE, являє собою антитіло, яке має більш виражену афінність до зв'язування з антигеном з перших видів ссавців, ніж з гомологом антигену з інших видів ссавців. Як правило, залежне від виду антитіло «зв'язується специфічно» з людським антигеном (тобто характеризується афінністю до зв'язування (значення  $K_d$ ), не вище, ніж приблизно  $1 \times 10^{-7} M$ , переважно не вище, ніж приблизно  $1 \times 10^{-8}$  і більш переважно не більш ніж приблизно  $1 \times 10^{-9} M$ ), але характеризується афінністю до зв'язування з гомологом антигену з інших видів ссавців крім людини принаймні приблизно в 50 разів або принаймні приблизно в 500 разів або принаймні приблизно в 1000 разів більш слабкою в порівнянні з афінністю до зв'язування з

людським антигеном. Залежне від виду антитіло може належати до кожного із зазначених вище типів антитіл, але переважно являє собою гуманізоване або людське антитіло.

Поняття «нумерація залишків варіабельних ділянок за Кеботом» або «нумерація положення амінокислот за Кеботом» і його варіанти стосується системи нумерації, застосовуваної для варіабельних ділянок важкого ланцюга або варіабельних ділянок легкого ланцюга різних антитіл, описаних у Kabat та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1991. На основі цієї системи нумерації фактична лінійна амінокислотна послідовність може містити меншу кількість амінокислот або додаткові амінокислоти, на які вкорочені FR або CDR варіабельні ділянки або які вбудовані в них. Наприклад, варіабельна ділянка важкого ланцюга може включати одну амінокислотну вставку (залишок 52a за Кеботом, розташований за залишком 52 H2 і вбудовані залишки (наприклад, залишки 82a, 82b та 82c і т.д. за Кеботом) після залишку 82 FR важкого ланцюга. Нумерацію залишків за Кеботом для даного антитіла можна визначати шляхом порівняльного аналізу первинної структури ділянок гомології послідовності антитіла та «стандартної» пронумерованої за Кеботом послідовності.

Фраза «практично аналогічний» або «практично такий же» у контексті даного опису означає досить високий ступінь подібності між двома чисельними значеннями (як правило, одне з яких стосується антитіла, пропонованого у винаході, а інше стосується «референс»-антитіла/застосовуваного для порівняння антитілу), так, що спеціаліст у даній галузі може вважати, що розходження між двома значеннями є занадто незначним або не має біологічної і/або статистичної значимості в контексті біологічних характеристик, які описуються цим значенням (наприклад, величини  $K_d$ ). Розходження між цими двома значеннями переважно становить менш ніж приблизно 50%, переважно менш ніж приблизно 40%, переважно менш ніж приблизно 30%, переважно менш ніж приблизно 20%, переважно менш ніж приблизно 10% відносно значення «референс»-антитіла/застосовуваного для порівняння антитіла.

Поняття «афінність до зв'язування», як правило, стосується сили загальної суми нековалентних взаємодій між одним зв'язуючим центром молекули (наприклад, антитіла) і партнером, що зв'язується з ним (наприклад, антигеном). Якщо не зазначене інше, то в контексті даного опису «афінність до зв'язування» стосується властивості компонентам пари, що зв'язується, (наприклад, антитілу та антигену) афінності до зв'язування при їх співвідношенні 1:1. Афінність молекули X до її партнера Y, як правило, можна характеризувати константою дисоціації ( $K_d$ ). Афінність можна оцінювати за допомогою звичайних методів, відомих у даній галузі, у тому числі представлених у даному описі. Антитіла, що мають низьку афінність, як правило, повільно зв'язують антиген і мають тенденцію до швидкої дисоціації, а антитіла, що ма-

ють високу афінність, як правило, зв'язують антиген швидше та знаходяться у зв'язаному стані протягом більш тривалого періоду часу. Різні методи оцінки афінності до зв'язування відомі в даній галузі, для цілей даного винаходу можна використовувати будь-які з них. Нижче описані їх конкретні наведені як ілюстрація варіанти.

В одному з варіантів здійснення винаходу «Kd» або «значення Kd» оцінюють за допомогою аналізу зв'язування радіоактивноміченого антигену (PIA), для здійснення якого використовують версію Fab-фрагмента антитіла, що являє інтерес, і його антиген, як описано в наведеному нижче аналізі, при здійсненні якого вимірюють афінність до зв'язування Fab-фрагментів з антигеном у розчині шляхом урівноважування Fab-фрагмента мінімальною концентрацією міченого за допомогою  $^{125}\text{I}$  антигену в присутності титраційних серій неміченого антигену з наступним захопленням зв'язаного антигену, нанесеним на планшет антитілом до Fab (Chen, та ін., J. Mol. Biol. 293, 1999, сс. 865-881). Для визначення умов аналізу титраційні планшети (фірми Dynex) сенсibiliзують протягом ночі 5мкг/мл захоплюючого антитіла до Fab (фірми Carrel Labs) в 50мМ карбонату натрію (pH 9,6) і потім блокують за допомогою 2% (мас./об.) бичачого сироваткового альбуміну у ЗФР протягом 2-5 год. при кімнатній температурі (приблизно 23°C). При застосуванні планшетів без адсорбенту (Nunc № 269620), 100пМ або 26пМ [ $^{125}\text{I}$ ]-антиген змішують із серійними розведеннями Fab, що являє інтерес (наприклад, при використанні антитіла до VEGF Fab-12, описаного в Presta та ін., Cancer Res. 57, 1997, сс. 4593-4599). Потім Fab, що являє інтерес, інкубують протягом ночі; однак інкубацію можна продовжувати протягом більше тривалого періоду (наприклад, 65 год.) для гарантії того, що рівновагу досягнуто. Потім суміші переносять на планшет для захоплення та витримують при кімнатній температурі (наприклад, протягом 1 год.). Потім розчин видаляють, і планшет промивають 8 разів 0,1% Твін-20 у ЗФР. Після висушування планшета додають 150мкл/пункту сцинтиляційного розчину (MicroScint-20; фірма Packard) і визначають радіоактивність планшета за допомогою лічильника гамма-квантів (фірма Packard) протягом 10 хв. Для застосування в конкурентних аналізах зв'язування вибирають концентрації кожного Fab, при яких рівень зв'язування менше або дорівнює 20% від максимального. Відповідно до іншого варіанта здійснення винаходу Kd або значення Kd визначають за допомогою резонансу поверхневого плазмону з використанням пристрою BIAcore™-2000 або BIAcore™-3000 (фірма BIAcore, Inc., Піскатавей, шт. Нью-Джерсі) при 25°C з використанням чипів з імобілізованим антигеном типу CM5 при ~10 одиницях відповіді (RU). У цілому метод полягає у наступному: біосенсорні чипи (CM5, фірма BIAcore Inc.) з карбоксиметилованого декстрану активують гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (ЕДК) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Антиген розводять в 10мМ ацетату натрію, pH 4,8 до концентрації 5мкг/мл (~0,2мк) перед ін'єкцією при швидкості потоку

5мкл/хв. для досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (RU) зшитого білка. Після ін'єкції антигену ін'єкують 1М етаноламін для того, щоб блокувати групи, які непрореагували. Для кінетичних вимірювань дворазові серійні розведення Fab (від 0,78 до 500нМ) ін'єкують у ЗФР, доповненому 0,05% Твін-20 (ЗФР) при 25°C при швидкості потоку приблизно 25мкл/хв. Швидкість асоціації ( $k_{\text{on}}$ ) і швидкість дисоціації ( $k_{\text{off}}$ ) розраховують за допомогою простої (1:1) моделі зв'язування Ленгмюра (програма BIAcore Evaluation, версія 3.2) шляхом одночасної апроксимації сенсограм асоціації та дисоціації. Константу швидкості дисоціації (Kd) розраховують зі співвідношення  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  (див., наприклад, Chen, Y., та ін., J. Mol. Biol. 293, 1999, сс. 865-881). Якщо швидкість асоціації («on-rate») перевищує  $10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  при аналізі за допомогою описаного вище резонансу поверхневого плазмону, то цю швидкість можна визначати з використанням методу гасіння флуоресценції, який дозволяє оцінювати підвищення або зниження інтенсивності флуоресценції, що випромінюється (довжина хвилі збудження 295нм; випромінювання 340нм, смуга пропускання 16нм) при 25°C при концентрації антитіла до антигену 20нМ (Fab-форма) у ЗФР, pH 7,2 у присутності зростаючих концентрацій антигену, здійснюючи оцінку за допомогою спектрометра, такого як спектрофотометр, обладнаний діафрагмою (фірма Aviv Instruments) або спектрофотометра 8000-серій типу SLM-Aminco (фірма ThermoSpectronic) із кюветою, що перемішується.

«On-rate» або «швидкість асоціації» або « $k_{\text{on}}$ » відповідно до даного винаходу можна визначати також за допомогою такого ж методу резонансу поверхневого плазмону, що описаний вище, з використанням BIAcore™-2000 або BIAcore™-3000 (фірма BIAcore, Inc., Піскатавей, шт. Нью-Джерсі) при 25°C з використанням чипів з імобілізованим антигеном типу CM5 при ~10 одиницях відповіді (RU). У цілому метод полягає у наступному: біосенсорні чипи (CM5, фірма BIAcore Inc.) з карбоксиметилованого декстрану активують гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (ЕДК) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Антиген розводять в 10мМ ацетату натрію, pH 4,8 до концентрації 5мкг/мл (~0,2мкМ) перед ін'єкцією при швидкості потоку 5мкл/хв. для досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (RU) зшитого білка. Після ін'єкції антигену ін'єкують 1М етаноламін для того, щоб блокувати групи, які непрореагували. Для кінетичних вимірювань дворазові серійні розведення Fab (від 0,78 до 500нМ) ін'єкують у ЗФР, доповненому 0,05% Твін-20 (ЗФР) при 25°C при швидкості потоку приблизно 25мкл/хв. Швидкість асоціації ( $k_{\text{on}}$ ) і швидкість дисоціації ( $k_{\text{off}}$ ) розраховують за допомогою простої (1:1) моделі зв'язування Ленгмюра (програма BIAcore Evaluation, версія 3.2) шляхом одночасної апроксимації сенсограм асоціації та дисоціації. Константу швидкості дисоціації (Kd) розраховують зі співвідношення  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  (див., наприклад, Chen Y., та ін., J. Mol. Biol. 293, 1999, сс. 865-881). Якщо швидкість асоціації («on-rate») перевищує  $10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  при аналізі за допомогою описаного вище резонансу поверхневого плазмону, то

цю швидкість можна визначати з використанням методу гасіння флуоресценції, який дозволяє оцінювати підвищення або зниження інтенсивності флуоресценції, що випромінюється (довжина хвилі збудження 295нм; випромінювання 340нм, смуга пропускання 16нм) при 25°C при концентрації антитіла до антигену 20нМ (Fab-форма) у 3ФР при 7,2 у присутності зростаючих концентрацій антигену, здійснюючи оцінку за допомогою спектрометра, такого як спектрофотометр, обладнаний діафрагмою (фірма Aviv Instruments) або спектрофотометра 8000-серій типу SLM-Aminco (фірма ThermoSpectronic) із кюветою, що перемішується. В одному з варіантів здійснення винаходу «Kd» або «значення Kd» оцінюють за допомогою аналізу зв'язування радіоактивноміченого антигену (PIA), для здійснення якого використовують версію Fab-фрагмента антитіла, яке являє інтерес, і його антиген, як описано в наведеному нижче аналізі, при здійсненні якого вимірюють афінність до зв'язування Fab-фрагментів з антигеном у розчині шляхом урівноважування Fab-фрагмента мінімальною концентрацією міченого за допомогою  $^{125}\text{I}$  антигену в присутності титраційних серій неміченого антигену з наступним захопленням зв'язаного антигену нанесеним на планшет антитілом до Fab (Chen, та ін., J. Mol. Biol. 293, 1999, сс. 865-881). Для визначення умов аналізу титраційні планшети (фірми Dynex) сенсibiliзують протягом ночі 5мкг/мл захоплюючого антитіла до Fab (фірми Cappel Labs) в 50мМ карбонату натрію (рН 9,6) і потім блокують за допомогою 2% (мас./об.) бичачого сироваткового альбуміну у 3ФР протягом 2-5 год. при кімнатній температурі (приблизно 23°C). При застосуванні планшетів без адсорбенту (Nunc № 269620), 100пМ або 26пМ [ $^{125}\text{I}$ ]-антиген змішують із серійними розведеннями Fab, що являє інтерес, (наприклад, при використанні антитіла до VEGF Fab-12, описаного Presta та ін., Cancer Res. 57, 1997, сс. 4593-4599). Потім Fab, що являє інтерес, інкубують протягом ночі; однак інкубацію можна продовжувати протягом більш тривалого періоду (наприклад, протягом 65 год.) для гарантії того, що рівновагу досягнуто. Потім суміші переносять на планшет для захоплення та витримують при кімнатній температурі (наприклад, протягом 1 год.). Потім розчин видаляють, і планшет промивають 8 разів 0,1% Твін-20 у 3ФР. Після висушування планшета додають 150мкл/лунку сцинтиляційного розчину (MicroScint-20; фірма Packard) і визначають радіоактивність планшета за допомогою лічильника випромінювання гамма-квантів (фірма Packard) протягом 10 хв. Для застосування в конкурентних аналізах зв'язування вибирають концентрації кожного Fab, при яких рівень зв'язування є меншим або дорівнює 20% від максимального. Відповідно до іншого варіанта здійснення винаходу Kd або значення Kd визначають за допомогою резонансу поверхневого плазмону з використанням пристрою BIAcore™-2000 або BIAcore™-3000 (фірма BIAcore, Inc., Піскатавей, шт. Нью-Джерсі) при 25°C з використанням чипів з імобілізованим антигеном типу CM5 при ~10 одиницях відповіді (RU). У цілому метод полягає у наступному: біосенсорні чипи (CM5, фірма BIAcore

Inc.) з карбоксиметилованого декстрану активують гідрохлоридом

N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (ЕДК) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Антиген розводять в 10мМ ацетаті натрію, рН 4,8 до концентрації 5мкг/мл (~0,2мк) перед ін'єкцією при швидкості потоку 5мкл/хв. для досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (RU) зшитого білка. Після ін'єкції антигену ін'єкують 1М етаноламін для того, щоб блокувати групи, які непрореагували. Для кінетичних вимірювань дворазові серійні розведення Fab (від 0,78 до 500нМ) ін'єкують у 3ФР, доповненому 0,05% Твін-20 (3ФР) при 25°C при швидкості потоку приблизно 25мкл/хв. Швидкість асоціації ( $k_{\text{on}}$ ) і швидкість дисоціації ( $k_{\text{off}}$ ) розраховують за допомогою простої (1:1) моделі зв'язування Ленгмюра (програма BIAcore Evaluation, версія 3.2) шляхом одночасної апроксимації сенсограм асоціації та дисоціації. Константу швидкості дисоціації (Kd) розраховують зі співвідношення  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  (див., наприклад, Chen, Y., та ін., J. Mol. Biol. 293, 1999, сс. 865-881). Якщо швидкість асоціації («on-rate») перевищує  $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  при аналізі за допомогою описаного вище резонансу поверхневого плазмону, то цю швидкість можна визначати з використанням методу гасіння флуоресценції, який дозволяє оцінювати підвищення або зниження інтенсивності флуоресценції, що випромінюється (довжина хвилі збудження 295нм; випромінювання 340нм, смуга пропускання 16нм) при 25°C при концентрації антитіла до антигену 20нМ (Fab-форма) у 3ФР, 7,2 у присутності зростаючих концентрацій антигену, здійснюючи оцінку за допомогою спектрометра, такого як спектрофотометр, обладнаний діафрагмою (фірма Aviv Instruments) або спектрофотометра 8000-серій типу SLM-Aminco (фірма ThermoSpectronic) із кюветою, що перемішується.

«On-rate» або «швидкість асоціації» або « $k_{\text{on}}$ » відповідно до даного винаходу можна визначати також за допомогою такого ж методу резонансу поверхневого плазмону, що описаний вище, з використанням BIAcore™-2000 або BIAcore™-3000 (фірма BIAcore, Inc., Піскатавей, шт. Нью-Джерсі) при 25°C з використанням чипів з імобілізованим антигеном типу CM5 при ~10 одиницях відповіді (RU). У цілому метод полягає у наступному: біосенсорні чипи (CM5, фірма BIAcore Inc.) з карбоксиметилованого декстрану активують гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (ЕДК) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Антиген розводять в 10мМ ацетаті натрію, рН 4,8 до концентрації 5мкг/мл (~0,2мк) перед ін'єкцією при швидкості потоку 5мкл/хв. для досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (RU) зшитого білка. Після ін'єкції антигену ін'єкують 1М етаноламін для того, щоб блокувати групи, які непрореагували. Для кінетичних вимірювань дворазові серійні розведення Fab (від 0,78 до 500нМ) ін'єкують у 3ФР, доповненому 0,05% Tween-20 (3ФР) при 25°C при швидкості потоку приблизно 25мкл/хв. Швидкість асоціації ( $k_{\text{on}}$ ) і швидкість дисоціації ( $k_{\text{off}}$ ) розраховують за допомогою простої (1:1) моделі зв'язування Ленгмюра (програма BIAcore Evaluation, версія 3.2)

шляхом одночасної апроксимації сенсограм асоціації та дисоціації. Константу швидкості дисоціації ( $K_d$ ) розраховують зі співвідношення  $K_{off}/K_{on}$  (див., наприклад, Chen Y., та ін., J. Mol. Biol. 293, 1999, сс. 865-881). Якщо швидкість асоціації («on-rate») перевищує  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  при аналізі за допомогою описаного вище резонансу поверхневого плазмону, то цю швидкість можна визначати з використанням методу гасіння флуоресценції, який дозволяє оцінювати підвищення або зниження інтенсивності флуоресценції, що випромінюється (довжина хвилі збудження 295нм; випромінювання 340нм, смуга пропускання 16нм) при 25°C при концентрації антитіла до антигену 20нМ (Fab-форма) у 3ФР при 7,2 у присутності зростаючих концентрацій антигену, здійснюючи оцінку за допомогою спектрометра, такого як спектрофотометр, обладнаний діафрагмою (фірма Aviv Instruments) або спектрофотометра 8000-серій типу SLM-Aminco (фірма ThermoSpectronic) із кюветою, що перемішується.

Фраза «істотно знижений» або «істотно відмінний» у контексті даного опису означає досить високий рівень розходження між двома чисельними значеннями (як правило, між одним, яке відповідає антитілу, пропонованому у винаході, і іншим, яке відповідає «референс»-антитілу/застосовуваному для порівняння антитілу), так що спеціаліст у даній галузі може розглядати розходження між двома величинами як статистично значиме в контексті біологічної характеристики, що описується цими значеннями (наприклад, значення  $K_d$ , НАМА-відповідь). Розходження між двома зазначеними значеннями переважно перевищує приблизно на 10%, переважно перевищує приблизно на 20%, переважно перевищує приблизно на 30%, переважно перевищує приблизно на 40%, переважно перевищує приблизно на 50% відповідне значення для «референс»-антитіла/застосовуваного для порівняння антитіла.

Поняття «антиген» стосується, насамперед, до антигену, з яким антитіло може вибірково зв'язуватися. Антиген-мішень може являти собою поліпептид, вуглевод, нуклеїнову кислоту, ліпід, гаптен або іншу сполуку, що зустрічається у природних умовах або синтетичну сполуку. Переважно антиген-мішень являє собою поліпептид. Поняття «акцепторна людська каркасна ділянка» у контексті даного опису означає каркасну ділянку, яка містить амінокислотну послідовність каркасної ділянки VL або VH, виведену з каркасної ділянки людського імунoglobуліну або людської консенсусної каркасної ділянки. Акцепторна людська каркасна ділянка, «виведена» з каркасної ділянки людського імунoglobуліну або людської консенсусної каркасної ділянки, може мати таку ж амінокислотну послідовність або може нести раніше існуючі заміни в амінокислотній послідовності. Якщо раніше існуючі амінокислотні заміни присутні, то вони переважно присутні в кількості не більш ніж 5 і переважно в кількості 4 або менше, або 3 або менше. Якщо раніше існуючі амінокислотні заміни присутні в VH, то переважно ці заміни зачіпають тільки 3, 2 або 1 з положень 71Н, 73Н і 78Н; наприклад, амінокислотні залишки в цих положеннях можуть являти собою 71А, 73Т і/або 78А. В одному з варіантів

здійснення винаходу акцепторна людська каркасна ділянка VL ідентична послідовності каркасної ділянки VL людського імунoglobуліну або послідовності людської консенсусної каркасної ділянки.

Антитіла, пропоновані в даному винаході, можуть мати здатність конкурувати за зв'язування із цим же епітопом, з яким зв'язується друге антитіло. Моноклональні антитіла розглядаються як такі, що мають «один і той же епітоп», якщо кожне з них блокує зв'язування іншого на 40% або більше при використанні однакової концентрації антитіла за даними стандартного аналізу конкурентного зв'язування антитіла *in vitro*.

«Людська консенсусна каркасна ділянка» являє собою каркасну ділянку, що складається з амінокислотних залишків, що найбільш часто зустрічаються у відібраних послідовностях каркасної ділянки VL або VH людського імунoglobуліну. Як правило, VL- або VH-послідовності людського імунoglobуліну вибирають із підгрупи послідовностей варіабельної ділянки. Як правило, підгрупа послідовностей являє собою підгрупу за Кеботом зі співавторами. В одному з варіантів здійснення винаходу для VL підгрупа являє собою підгрупу капа I за Кеботом зі співавторами. В іншому варіанті здійснення винаходу для VH підгрупа являє собою підгрупу III за Кеботом зі співавторами.

«Консенсусна каркасна ділянка підгрупи III VH» містить консенсусну послідовність, одержану з амінокислотних послідовностей підгрупи III варіабельної ділянки важкого ланцюга за Кеботом зі співавторами.

«Консенсусна каркасна ділянка підгрупи I VL» містить консенсусну послідовність, одержану з амінокислотних послідовностей підгрупи I варіабельного легкого капа-ланцюга за Кеботом зі співавторами.

«Немодифікована людська каркасна ділянка» являє собою людську каркасну ділянку, що має таку ж амінокислотну послідовність, як й акцепторна людська каркасна ділянка, наприклад, при цьому в акцепторній людській каркасній ділянці відсутня(і) заміна(и) людських амінокислот на амінокислоти, що не належать людині.

«Змінена гіперваріабельна ділянка» у контексті даного опису являє собою гіперваріабельну ділянку, що містить одну або декілька (наприклад, від 1 до приблизно 16) амінокислотних замін.

«Немодифікована гіперваріабельна ділянка» у контексті даного опису являє собою гіперваріабельну ділянку, яка має таку ж амінокислотну послідовність, як й антитіло з організму крім людини, з якого воно виведено, тобто в ньому відсутня одна або декілька амінокислотних замін.

Поняття «гіперваріабельна ділянка», «HVR» або «HV» у контексті даного опису стосується ділянок варіабельної ділянки антитіла, послідовність яких є гіперваріабельною і/або утворює структурно визначені петлі. Як правило, антитіла містять 6 гіперваріабельних ділянок; три в VH (H1, H2, H3) і три в VL (L1, L2, L3). Застосовують декілька визначень гіперваріабельних ділянок і всі вони підпадають під обсяг даного винаходу. Основою ділянок, що визначають комплементарність, (CDR) за Кеботом є варіабельність послідовностей, і така

нумерація є найбільш широко розповсюдженою (Kabat та ін., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1991). І, навпаки, нумерація за Chothia заснована на положенні структурних петель (Chothia і Lesk J. *Mol. Biol.* 196, 1987, сс. 901-917). Виявлення «ділянки контакту» гіперваріабельних ділянок засновано на аналізі доступних складних кристалічних структур. Залишки кожної із цих гіперваріабельних ділянок позначені нижче. Якщо не зазначене інше, слід застосовувати нумерацію за Кеботом. Як правило, положення гіперваріабельних ділянок визначають у такий спосіб: амінокислоти 24-34 (HVR-L1), амінокислоти 49-56 (HVR-L2), амінокислоти 89-97 (HVR-L3), амінокислоти 26-3 5A (HVR-H1), амінокислоти 49-65 (HVR-H2) і амінокислоти 93-102 (HVR-H3).

Гіперваріабельні ділянки можуть являти собою також наступні «подовжені гіперваріабельні ділянки»: амінокислоти 24-36 (L1) і амінокислоти 46-56 (L2) в VL. При описі кожного із зазначених понять, залишки варіабельної ділянки нумерують відповідно до Кебота зі співавторами, вище.

Залишки «каркасної ділянки» або «FR» являють собою залишки варіабельної ділянки, відмінні від залишків гіперваріабельної ділянки, як вони визначені в даному описі.

«Людське антитіло» являє собою антитіло, яке має амінокислотну послідовність, яка відповідає послідовності антитіла, що продукується в організмі людини і/або одержаного за допомогою будь-якого представленого в даному описі методу одержання людських антитіл. Під це поняття людського антитіла не підпадає, зокрема, гуманізоване антитіло, яке містить антигензв'язуючі залишки антитіла з організму крім людини.

Антитіло «з дозрілою афінністю» являє собою антитіло з однією або декількома замінами в одному або декількох з його CDR, що приводить до підвищення афінності антитіла до антигену в порівнянні з батьківським антитілом, у якому відсутня(і) така(і) заміна(и). Для кращих антитіл з дозрілою афінністю афінність до антигену-мішені характеризується наномольними або навіть пікомольними концентраціями. Антитіла з дозрілою афінністю одержують за допомогою методів, добре відомих у даній галузі. Marks та ін. *Bio/Technology* 10, 1992, сс. 779-783 (1992) описали, що для дозрівання афінності можна використовувати перестановку VH- і VL-ділянок. Випадковий мутагенез CDR і/або залишків каркасної ділянки описаний в: Barbas та ін. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91, 1994, сс. 3809-3813; Schier та ін. *Gene* 169, 1995, сс. 147-155; Yelton та ін. *J. Immunol.* 155, 1995, сс. 1994-2004; Jackson та ін., *J. Immunol.* 154(7), 1995, сс. 3310-9; та Hawkins і ін., *J. Mol. Biol.* 226, 1992, сс. 889-896.

«Блокуюче» антитіло, або антитіло-«антагоніст» («антагоністичне» антитіло) являє собою антитіло, яке інгібує або знижує біологічну активність антигену, з яким воно зв'язується. Кращі блокуючі або антагоністичні антитіла практично або повністю інгібують біологічну активність антигена.

«ТАТ-зв'язуючий олігопептид» являє собою олігопептид, який зв'язується, переважно специфічно, з ТАТ-поліпептидом, представленим у даному описі. ТАТ-зв'язуючі олігопептиди можна одержувати шляхом хімічного синтезу з використанням відомих методів синтезу олігопептидів або їх можна одержувати й очищувати за допомогою методу рекомбінантної ДНК. ТАТ-зв'язуючі олігопептиди, як правило, складаються принаймні приблизно з 5 амінокислот, в іншому варіанті принаймні приблизно з 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100 амінокислот або більше, при цьому зазначені олігопептиди повинні мати здатність зв'язуватися, переважно специфічно, з ТАТ-поліпептидом, представленим у даному описі. ТАТ-зв'язуючі олігопептиди можна ідентифікувати без зайвих експериментів з використанням добре відомих методів. У цьому зв'язку слід зазначити, що методи скринінгу бібліотек олігопептидів, які можуть специфічно зв'язуватися з поліпептидом-мішенню, добре відомі в даній галузі (див., наприклад, U.S. 5556762, 5750373, 4708871, 4833092, 5223409, 5403484, 5571689, 5663143; публікації PCT WO 84/03506 та WO 84/03564; Geysen та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, 1984, сс. 3998-4002; Geysen та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 1985, сс. 178-182; Geysen та ін., in *Synthetic Peptides as Antigens*, 1986, сс. 130-149; Geysen та ін., *J. Immunol. Meth.*, 102, 1987, сс. 259-274; Schoofs та ін., *J. Immunol.*, 140, 1988, сс. 611-616, Cwirla S.E. та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, с. 6378; Lowman H.B. та ін., *Biochemistry*, 30, 1991, с. 10832; Clackson T. та ін., *Nature*, 352, 1991, с. 624; Marks J.D. та ін., *J. Mol. Biol.*, 222, 1991, с. 581; Kang A.S. та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, с. 8363 та Smith G.P. *Current Opin. Biotechnol.*, 2, 1991, с. 668).

«ТАТ-зв'язуюча органічна молекула» являє собою органічну молекулу, відмінну від олігопептиду або антитіла, як вони визначені в даному описі, що зв'язується, переважно специфічно, з ТАТ-поліпептидом, представленим у даному описі. ТАТ-зв'язуючі органічні молекули можна ідентифікувати та синтезувати за допомогою відомих методів синтезу (див., наприклад, публікації PCT WO 00/00823 і WO 00/39585). Розмір ТАТ-зв'язуючих органічних молекул, як правило, становить менш приблизно 2000 Да, в іншому варіанті менш приблизно 1500, 750, 500, 250 або 200 Да, при цьому органічні молекули, які мають здатність зв'язуватися, переважно специфічно, з ТАТ-поліпептидами, як вони представлені в даному описі, можна ідентифікувати без зайвих експериментів з використанням добре відомих методів. У цьому зв'язку слід зазначити, що методи скринінгу бібліотек органічних молекул, які можуть специфічно зв'язуватися з поліпептидом-мішенню, добре відомі в даній галузі (див., наприклад, публікації PCT WO 00/00823 та WO 00/39585). Антитіло, олі-

гопептид або інша органічна молекула, «яка зв'язується» з антигеном, що являє інтерес, наприклад, з асоційованим з пухлиною поліпептидним антигеном-мішенню, являє собою зазначену молекулу, що зв'язується з антигеном з достатньою афінністю, у результаті чого антитіло, олігопептид або іншу органічну молекулу можна застосовувати як діагностичний і/або терапевтичний агент, мішенню якого є клітина або тканина, що експресує антиген, і вона не має помітної перехресної реактивності у відношенні інших білків. У зазначених варіантах здійснення винаходу ступінь зв'язування антитіла, олігопептиду або іншої органічної молекули з білком, що «не є мішенню», повинен становити менш ніж приблизно 10% від ступеня зв'язування антитіла, олігопептиду або іншої органічної молекули з її конкретним білком-мішенню при визначенні за допомогою методу розділення з використанням клітинного сортера зі збудженням флуоресценції (FACS) або радіоімунопреципітації (RIA). Відносно зв'язування антитіла, олігопептиду або іншої органічної молекули з молекулою-мішенню, поняття «специфічне зв'язування» або «специфічно зв'язується з» або «специфічний у відношенні» конкретного поліпептиду або епітопу на конкретному поліпептиді-мішені означає зв'язування, що помітно відрізняється за ступенем від неспецифічної взаємодії. Специфічне зв'язування можна оцінювати, наприклад, визначаючи зв'язування молекули в порівнянні зі зв'язуванням контрольної молекули, яка, як правило, являє собою молекулу аналогічної структури, що не має зв'язуючої активності. Наприклад, специфічне зв'язування можна визначати шляхом конкуренції з контрольною молекулою, яка має аналогічну мішень, наприклад у присутності надлишку неміченої мішені. У цьому випадку специфічне зв'язування вважається встановленим, якщо зв'язування міченої мішені із зондом конкурентно інгібується надлишком неміченої мішені. Поняття «специфічне зв'язування» або «специфічно зв'язується з» або «специфічний у відношенні» конкретного поліпептиду або епітопу на конкретному поліпептиді-мішені в контексті даного опису можна вважати встановленим, якщо, наприклад, значення  $K_d$  молекули для мішені становить принаймні приблизно  $10^{-4}$  М, в іншому варіанті принаймні приблизно  $10^{-5}$  М, в іншому варіанті принаймні приблизно  $10^{-6}$  М, в іншому варіанті принаймні приблизно  $10^{-7}$  М, в іншому варіанті принаймні приблизно  $10^{-8}$  М, в іншому варіанті принаймні приблизно  $10^{-9}$  М, в іншому варіанті принаймні приблизно  $10^{-10}$  М, в іншому варіанті принаймні приблизно  $10^{-11}$  М, в іншому варіанті принаймні приблизно  $10^{-12}$  М або більше. В одному з варіантів здійснення винаходу поняття «специфічно зв'язується» стосується зв'язування, при якому молекула зв'язується з конкретним поліпептидом або епітопом на конкретному поліпептиді без помітного зв'язування з будь-яким іншим поліпептидом або поліпептидним епітопом.

Антитіло, олігопептид або інша органічна молекула, яка «інгібує ріст пухлинних клітин, які експресують ТАТ-поліпептид», або антитіло, олігопептид або інша органічна молекула, що «інгібує ріст», являють собою субстанцію, що приводить

до помітного інгібування росту ракових клітин, які експресують або надекспресують відповідний ТАТ-поліпептид. ТАТ-поліпептид може являти собою трансмембранний поліпептид, який експресується на поверхні ракової клітини, або може являти собою поліпептид, який продукується та секретується раковою клітиною. Кращі антитіла до ТАТ, олігопептиди або органічні молекули, що інгібують ріст, інгібують ріст пухлинних клітин, які експресують ТАТ, більш ніж на 20%, переважно від приблизно 20% до приблизно 50% і ще більш переважно більш ніж на 50% (наприклад, від приблизно 50% до приблизно 100%) у порівнянні з відповідним контролем, контролем, як правило, є пухлинні клітини, не оброблені досліджуванням антитілом, олігопептидом або іншою органічною молекулою. В одному з варіантів здійснення винаходу інгібування росту можна оцінювати при концентрації антитіла приблизно від 0,1 до 30 мкг/мл або приблизно від 0,5 до 200 нМ у клітинній культурі, у якій інгібування росту визначають через 1-10 днів після обробки пухлинних клітин антитілом. Інгібування росту пухлинних клітин *in vivo* можна визначати різними шляхами, які описані нижче в розділі «Експериментальні приклади». Антитіло являє собою антитіло, яке інгібує ріст *in vivo*, якщо при введенні антитіла до ТАТ з розрахунку приблизно від 1 мкг/кг до приблизно 100 мкг/кг маси тіла відбувається зниження розміру пухлини або проліферації пухлинних клітин через проміжок часу, що становить приблизно від 5 днів до 3 місяців після першого введення антитіла, переважно приблизно через 5-30 днів.

Антитіло, олігопептид або інша органічна молекула, що «індукує апоптоз», являє собою субстанцію, що індукує запрограмовану загибель клітин, що визначають за зв'язуванням анексину V, фрагментації ДНК, стискуванню клітини, розширенням ендоплазматичного ретикулу, фрагментації клітин і/або утворенню мембранних пухирців (так званих апоптозних тілець). Клітина, як правило, звичайно являє собою клітину, у якій відбувається надекспресія ТАТ-поліпептиду. Переважно клітина являє собою ракову клітину, наприклад, клітину передміхурової залози, молочної залози, яєчника, шлунка, ендометрію, легені, нирки, обоюдої кишки або сечового міхура. Різні методи можна застосовувати для оцінки випадків загибелі клітин, пов'язаної з апоптозом. Наприклад, за зв'язуванням анексину можна оцінювати транслокацією фосфатидилсерину (PS); фрагментацію ДНК можна оцінювати за утворенням ступенів ДНК; конденсацію ядер/хроматину поряд із фрагментацією ДНК можна визначати за збільшенням кількості гіподиплоїдних клітин. Краще антитіло, олігопептид або інша органічна молекула, що індукує апоптоз, являє собою субстанцію, що приводить приблизно до 2-50-кратної індукції зв'язування анексину в порівнянні з необробленими клітинами, переважно приблизно до 5-50-кратного й найбільш краще до 10-50-кратної індукції зв'язування анексину в порівнянні з необробленими клітинами.

Поняття «ефекторні функції» антитіла стосується видів біологічної активності, зв'язаних з Fc-фрагментом (нативною послідовністю Fc-

фрагмента або з варіантом амінокислотної послідовності Fc-фрагмента) антитіла та варіює залежно від ізо типу антитіла. Прикладами ефекторних функцій антитіла є C1q-зв'язування; залежна від комплексу цитотоксичність; зв'язування Fc-рецептора; антитіло-обумовлена клітинно-залежна цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; понижувальна регуляція рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинного рецептора, BCR) і B-клітинна активація.

Поняття «антитіло-обумовлена клітинно-залежна цитотоксичність» або «ADCC» стосується форми цитотоксичності, при якій Ig, що секретується, зв'язаний з Fc-рецепторами (Fc) є присутнім на певних цитотоксичних клітинах (наприклад, природні кілери (NK-клітини), нейтрофіли та макрофаги), що сприяє тому, що ці цитотоксичні ефекторні клітини специфічно зв'язуються з несучою антиген клітиною-мішенню й потім знищують клітину-мішень цитотоксинами. Антитіла «озброюють» цитотоксичні клітини й абсолютно необхідні для такого знищення. Основні клітини, для яких характерна ADCC, тобто NK-клітини, експресують тільки FcγRIII, у той час як моноцити експресують FcγRI, FcγRII і FcγRIII. Дані про експресію FcR на поверхні гематопоетичних клітин узагальнені в таблиці 3 на с. 464 статті Ravetch і Kinet, *Ann. Rev. Immunol.*, 9, 1991, сс. 457-492. Для оцінки ADCC-активності молекули, що являє інтерес, можна застосовувати метод аналізу ADCC *in vitro*, наприклад, описаний в U.S. 5500362 або 5821337. Ефекторні клітини, які можна застосовувати для таких аналізів, являють собою моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC) і природні кілери (NK-клітини). В іншому або додатковому варіанті для оцінки ADCC-активності молекули, що являє інтерес, можна застосовувати аналіз *in vivo*, наприклад, з використанням як моделі тварин відповідно до методу, описаному в Clynes та ін., *PNAS (USA)*, 95, 1998, сс. 652-656.

Поняття «Fc-рецептор» або «FcR» стосується рецептора, що зв'язується з Fc-фрагментом антитіла. Кращий FcR має нативну послідовність людського FcR. Крім того, кращий FcR являє собою FcR, що зв'язується з антитілом ізо типу IgG (гамма-рецептор) і включає підкласи FcγRI-, FcγRII- та FcγRIII-рецепторів, у тому числі алельні варіанти та одержані в результаті альтернативного сплайсингу форми цих рецепторів. FcγRII-рецептори включають FcγRIIA («активуючий рецептор») і FcγRIIB («інгібуєчий рецептор»), які мають подібні амінокислотні послідовності, але відрізняються насамперед своїми цитоплазматичними доменами. Активуючий рецептор FcγRIIA містить імунорецепторний тирозиновмісний активуючий мотив (ITAM) у своєму цитоплазматичному домені. Інгібуєчий рецептор FcγRIIB містить імунорецепторний тирозиновмісний інгібуєчий мотив (ITIM) у своєму цитоплазматичному домені (огляд даних див. в M. Daeron, *Ann. Rev. Immunol.*, 15, 1997, сс. 203-243). Дані про FcR узагальнені в Ravetch та Kinet, *Ann. Rev. Immunol.*, 9, 1991, сс. 457-492; Capel та ін., *Immunomethods*, 4, 1994, сс. 25-34 та в de Haas та ін., *J. Lab. Clin. Med.*, 126, 1995, сс. 330-341. Інші FcR, включаючи FcR, які будуть виявлені

в майбутньому, підпадають під зазначене поняття «FcR». Під це поняття підпадає також неонатальний рецептор, FcRn, що відповідає за перенесення материнських IgG ембріону (Guyer та ін., *J. Immunol.*, 117, 1976, с. 587 і Kim та ін., *J. Immunol.*, 24, 1994, с. 249).

«Людські ефекторні клітини» являють собою лейкоцити, які експресують один або декілька Fc і мають ефекторні функції. Переважно клітини експресують принаймні FcγRIII і мають ADCC-ефекторні функції. Приклади людських лейкоцитів, які опосередковують ADCC, включають моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC), природні кілери (NK-клітини), моноцити, цитотоксичні T-клітини та нейтрофіли; кращими є PBMC і NK-клітини. Ефекторні клітини можна виділяти з їх природного джерела, наприклад, із крові.

Поняття «комплементзалежна цитотоксичність» або «CDC» означає здатність молекули викликати лізис клітини-мішені в присутності комплексу. Класичний шлях активації комплексу ініціюється зв'язуванням першого компонента системи комплексу (C1q) з антитілами (відповідного підкласу), які зв'язані з відповідним щодо них антигеном. Для оцінки активації комплексу можна застосовувати метод аналізу CDC, наприклад, описаний в Gazzano-Santoro та ін., *J. Immunol. Methods*, 202, 1996, с. 163.

Поняття «рак» і «злоякісний» стосуються або описують фізіологічний стан у ссавців, який, як правило, характеризується неконтрольованим ростом клітин. Приклади раку включають (але, не обмежуючись ними) карциному, лімфому, бластоми, саркому та лейкоз або лімфоїдні злоякісні захворювання. Більш конкретні приклади таких видів раку включають рак лускатих клітин (наприклад, рак клітин плоского епітелію), рак легенів, включаючи дрібноклітинний рак легенів, недрібноклітинний рак легенів, аденокарциному легені та плоскоклітинний рак легенів, перитонеальний рак, рак клітин печінки, рак шлунка, включаючи шлунково-кишковий рак, рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчника, рак печінки, рак сечового міхура, рак сечових шляхів, гепатому, рак молочної залози, рак ободової кишки, ректальний рак, колоректальний рак, карциному ендометрію або матки, карциному слинних залоз, рак нирки або ренальний рак, рак передміхурової залози, вульварний рак, рак щитовидної залози, печіночну карциному, анальну карциному, карциному статевих членів, меланому, множинну мієлому та B-клітинну лімфому, рак головного мозку, а також рак голови та шиї й пов'язані з ними метастази.

Поняття «пов'язане із проліферацією клітин захворювання» і «проліферативне захворювання» відноситься до захворювань, які асоційовані з аномальною у деякому ступені проліферацією клітин. В одному з варіантів здійснення винаходу захворювання, пов'язане із проліферацією клітин, являє собою рак.

Поняття «пухлина» у контексті даного опису стосується всіх варіантів неопластичного клітинного росту та проліферації, поза залежністю чи є

вони злоякісними або доброякісними, та усіх перерахованих і ракових клітинах і тканин.

Антитіло, олігопептид або інша органічна молекула, що «індукує загибель клітин», являє собою субстанцію, яка приводить до того, що життєздатна клітина стає нежиттєздатною. Клітина являє собою клітину, що експресує ТАТ-поліпептид, переважно клітину, що надекспресує ТАТ-поліпептид у порівнянні зі здоровою клітиною цього ж типу тканини. ТАТ-поліпептид може являти собою трансмембранний поліпептид, який експресується на поверхні ракової клітини, або може являти собою поліпептид, який продукується та секретується раковою клітиною. Переважно клітина являє собою ракову клітину, наприклад, клітину раку молочної залози, яєчника, шлунка, ендометрію, слинної залози, легені, нирки, ободової кишки, щитовидної залози, підшлункової залози або сечового міхура. Загибель клітини *in vitro* можна визначати за відсутності комплементу та імунних ефекторних клітин для того, щоб відрізнити від загибелі клітин, яка індукується антитіло-обумовленою клітинозалежною цитотоксичністю (ADCC) або комплементозалежною цитотоксичністю (CDC). Так, аналіз загибелі клітин можна здійснювати за допомогою інактивованої тепловою обробкою сироватки (тобто за відсутності комплементу) і за відсутності імункомпетентних ефекторних клітин. Для вирішення питання про те, чи може антитіло, олігопептид або інша органічна молекула індукувати загибель клітин, можна оцінювати втрату цілісності мембран за поглинанням йодиду пропідію (PI), трипанового синього (див. Moore та ін., *Cytotechnology*, 17, 1995, сс. 1-11) або 7AAD у порівнянні з необробленими клітинами. Кращими антитілами, олігопептидами або іншими органічними молекулами, що індукують загибель клітин, є субстанції, які індукують поглинання PI у досліді з поглинання PI клітинами лінії BT474.

«ТАТ-експресуюча клітина» являє собою клітину, що експресує ендогенно ТАТ-поліпептид або на клітинній поверхні, або у формі секрету, або трансфетована ТАТ-поліпептидом. «ТАТ-експресуючий рак» являє собою ракову пухлину, що містить клітини, які несуть ТАТ-поліпептид на клітинній поверхні або які продукують і секретують ТАТ-поліпептид. «ТАТ-експресуючий рак» необов'язково продукує достатні рівні ТАТ-поліпептиду на поверхні клітин, так, що антитіло до ТАТ, олігопептид або інша органічна молекула може зв'язуватися з ним і здійснювати терапевтичну дію щодо раку. В іншому варіанті здійснення винаходу «ТАТ-експресуючий рак» необов'язково продукує і секретує достатні рівні ТАТ-поліпептиду, так, що антитіло до ТАТ, олігопептид або інші антагоністичні органічні молекули можуть зв'язуватися з ним і здійснювати терапевтичну дію щодо раку. Що стосується останнього, то антагоніст може являти собою антисмисловий олігонуклеотид, що знижує, інгібує або перешкоджає виробництву та секреції ТАТ-поліпептиду, який секретується пухлинними клітинами. Рак, що «надекспресує» ТАТ-поліпептид, являє собою рак, при якому на клітинній поверхні присутні або продукуються та секретируются значно більш високі рівні ТАТ-

поліпептиду, у порівнянні з нераковою клітиною цього ж типу тканини. Така надекспресія може викликатися ампліфікацією гена або підвищеним рівнем транскрипції або трансляції. Надекспресію ТАТ-поліпептиду можна визначати з використанням діагностичного або прогностичного аналізу шляхом оцінки підвищених рівнів білка ТАТ, які присутні на поверхні клітини або секретуються клітиною (наприклад, за допомогою імуногістохімічного аналізу з використанням антитіл до ТАТ, одержаних проти виділеного ТАТ-поліпептиду, який можна одержувати за допомогою методу рекомбінантної ДНК із виділеної нуклеїнової кислоти, яка кодує ТАТ-поліпептид; FACS-аналізу й т.д.). В іншому або додатковому варіанті можна оцінювати рівні нуклеїнової кислоти, що кодує ТАТ-поліпептид, або відповідної мРНК у клітині, наприклад, на основі флуоресценції при гібридизації *in situ* з використанням зонду на основі нуклеїнової кислоти, яка відповідає нуклеїновій кислоті, що кодує ТАТ, або її комплементу; (FISH; див. WO 98/45479, опубліковану у жовтні 1998), Саузерн-блотингу, Нозерн-блотингу або полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), наприклад, кількісної ПЛР у реальному часі (РЧ-ПЛР). Можна також оцінювати надекспресію ТАТ-поліпептиду за зниженням рівня антигену в біологічній рідині, такий як сироватка, наприклад, за допомогою заснованих на застосуванні антитіла аналізів (див., наприклад, U.S. 4933294, виданий 12 червня 1990 р.; WO 91/05264, опубліковану 18 квітня 1991 р.; U.S. 5401638, виданий 28 березня 1995 р.; і Sias та ін., *J. Immunol., Methods* 132, 1990, сс. 73-80). Крім описаних вище аналізів спеціалісту в даній галузі відомі різноманітні аналізи *in vivo*. Наприклад, можна обробляти клітини усередині організму пацієнта антитілом, що необов'язково можна мітити міткою, що виявляється, наприклад, радіоактивним ізотопом, і оцінювати зв'язування антитіла із клітиною пацієнта, наприклад, шляхом зовнішнього сканування радіоактивності або шляхом аналізу біопсії, одержаної з організму пацієнта перед обробкою антитілом.

В контексті даного опису поняття «імуноадгезин» означає подібні до антитілу молекули, у яких сполучається здатність до специфічного зв'язування гетерологічного білка («адгезин») з ефекторними функціями константних ділянок імуноглобуліну. Структурно імуноадгезини містять злиття амінокислотної послідовності з необхідною специфічністю зв'язування, що відмінна від сайту антитіла, що розпізнає та зв'язує антиген (тобто є «гетерологічною»), і послідовність константної ділянки імуноглобуліну. Частина молекули імуноадгезину, що відповідає адгезину, як правило, являє собою послідовність, яка складається із суміжних амінокислот та яка містить принаймні зв'язуючий сайт рецептора або ліганду. Послідовність константної ділянки імуноглобуліну в імуноадгезині можна одержувати з будь-якого імуноглобуліну, такого як підтипи IgG-1, IgG-2, IgG-3 або IgG-4, IgA (включаючи IgA-1 і IgA-2), IgE, IgD або IgM.

Поняття «мітка» у контексті даного опису означає сполуку або композицію, що виявляється,



які безпосередньо або побічно кон'юговані з анти-тілом, олігопептидом або іншою органічною молекулою з утворенням «міченого» антитіла, олігопептиду або іншої органічної молекули. Мітка сама може бути такою, що виявляється (наприклад, радіоізотопні мітки або флуоресцентні мітки) або у випадку ферментативної мітки може каталізувати хімічну зміну сполуки-або композиції-субстрату, роблячи його здатним до виявлення.

Поняття «цитотоксичний агент» у контексті даного опису стосується субстанції, яка інгібує або перешкоджає функції клітин і/або викликає руйнування клітини. Мається на увазі, що під поняття підпадають радіоактивні ізотопи (наприклад,  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$  і радіоактивні ізотопи Lu), хіміотерапевтичні агенти, ферменти та їх фрагменти, такі як нуклеолітичні ферменти, антибіотики, і токсини, такі як токсини, що мають невеликий розмір молекул, або ферментативно активні токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, включаючи їх фрагменти і/або варіанти, і різні протипухлинні або протиракові агенти, описані нижче. Нижче описані інші цитотоксичні агенти. Опухольоцидний агент викликає деструкцію пухлинних клітин.

«Хіміотерапевтичний агент» являє собою хімічну сполуку, що застосовують для лікування раку. Приклади хіміотерапевтичних агентів включають алкілувальні агенти, такі як тіотепа та циклофосфамід CYTOXAN®; алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азіридини, такі як бензодопа, карбохуон, метуредопа та уредопа; етиленіміни та метиламеламіни, включаючи алтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід і триметиллоамеламін; ацетогеніни (насамперед булатацин і булатацинон); дельта-9-тетрагідроканабінол (дронабінол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхіцини; бетулінову кислоту; камптотецин (включаючи синтетичний аналог топотекану Hycamtin®, CPT-11 (іринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин і 9-амінокамптотецин); бріостатин; калістатин; CC-1065 (включаючи його синтетичні аналоги адозелесин, карзелесин і бизелесин); подофілотоксин; подофілінову кислоту; теніпосид; криптофіцини (насамперед криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги KW-2189 і CB1-TM1); елеутеробін; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгістатин; азотні аналоги гірчичного газу, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, гідрохлорид оксиду мехлорметаміну, мелфалан, новембіхін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урациловий аналог гірчичного газу; нітрозсечовини, такі як кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, німустин і ранімустин; антибіотики, такі як енедіїнові антибіотики (наприклад, каліхеаміцин, насамперед каліхеаміцин гамалл і каліхеаміцин омегаїї (див., наприклад, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33, 1994, сс. 183-186); динеміцин, включаючи динеміцин А; еспераміцин; а також неокарциностатиновий кремофор і родинні хромопротейдові енедіїнові хромофори,

що мають антибіотичні властивості), аклациномізини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, карабіцин, карміноміцин, карзинофілін, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діаза-5-оксо-L-норлейцин, доксорубіцин ADRIAMYCIN® (включаючи морфолінодоксорубіцин, ціанморфолінодоксорубіцин, 2-піролодоксорубіцин і дезоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцеломіцин, мітоміцини, такі як мітоміцин С, мікофенольну кислоту, ногаламіцин, оливоміцин, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, хеломіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, зиностатин, зорубіцин; антитаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуринові аналоги, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; піримідинові аналоги, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидезоксиуредин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин; андрогени, такі як калустерон, дромостанолонпропіонат, епітіостанол, мепітіостан, тестостерон, антиадренергетики, такі як аміноглутетимід, мітотан, трилостан; замінник фолієвої кислоти, такий як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфамідглікозид; амінолевулінову кислоту; енілурацил; амсакрин; бестрабуцил; бісантрен; едотраксат; дефофамін; демеколцин; діазихон; елфорнітин; еліптінію ацетат; епотилон; етоглуцид; галію нітрат; гідроксисечовину; лентинан; лонідаїнін; майтансіноїди, такі як майтансін і ансамітоцини; мітогазон; мітоксантрон; мопіданмол; нітраєрин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лосоксантрон; 2-етилгідразид; прокарбазин; поліцукоридний комплекс PSK® (фірма JHS Natural Products, Еуген, шт. Орегон); разоксан; ризоксин; сизофіран; спірогерманій; тенуазонову кислоту; триазихон; 2,2',2"-трихлортриетиламін; трихотецени (насамперед токсин Т-2, верракурин А, роридин А та ангуїдин); уретан; віндесин ELDISINE®, FILDESIN®; дакарбазин; маномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид («Ара-С»); тіотепа; таксоїди, наприклад, паклітаксел TAXOL® (фірма Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, шт. Нью-Джерсі), ABRAXANETM (створена на основі альбуміну композиція паклітакселу, що не містить кремофору та має розмір частинок біля нанометра) (фірма American Pharmaceutical Partners, Шаумберг, шт. Іллінойс) і доцетаксел TAXOTERE® (фірма Rhone-Poulenc Rorer, Ентоні, Франція); хлорамбуцил; гемцитабін GEMZAR®; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин VELBAN®; платину; етопозид VP-16; іфосфамід; мітоксантрон; вінкристин ONCOVTN®; оксалиплатин; леукововін; вінорелбін NAVELBINE®; новантрон; едотрексат; дауноміцин; аміноптерин; ібандронат; інгібітор топоізомери RFS-2000; диформетилорнітин DMFO; ретиноїди, такі як ретиноева кислота; капецитабін XELODA®; їх фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні кожної із зазначених вище сполук; а також комбінації двох або більшої кількості зазначених

вище сполук, такі як CHOP (скорочене позначення комбінованої терапії на основі циклофосфаміду, доксорубіцину, вінкристину та преднізолону) і FOLFOX (скорочене позначення схеми лікування з використанням оксаліплатину (ELOXATIN™) у сполученні з 5-ФУ та лейковотином).

Під це визначення підпадають також антигормональні агенти, які мають здатність регулювати, знижувати, блокувати або інгібувати дію гормонів, що можуть підсилювати ріст раку, вони часто знаходяться у формі для системного введення або обробки всього організму. Багато які з них самі являють гормони, їх прикладами є антиестрогени та селективні модулятори рецептора естрогену (SERM), включаючи, наприклад, тамоксифен (у тому числі тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен EVISTA®, дролоксифен, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон і тореміфен FARESTON®; антипрогестерони; знижувальні регулятори рецепторів естрогенів (ERD); агенти, функцією яких є пригнічення функції або закупорка яєчників, наприклад, агоністи лютеїнізуючого гормону (ЛГРФ), такі як LUPRON® і леупролід ацетат ELIGARD®, гoserеліну ацетат, бусереліну ацетат і триптерелін; інші антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід і бікалутамід; і інгібітори ароматази, які інгібують фермент ароматазу, що регулює виробництво естрогену в надниркових залозах, такі, наприклад, як 4(5)-імідазоли, аміноглутетимід, мегестеролу ацетат MEGASE®, ексеместан AROMASIN®, форместан, фадрозол, ворозол RIVISOR®, летрозол FEMARA® і анастрозол ARIMIDEX®. Крім того, під визначення хімотерапевтичних агентів підпадають бісфосфонати, такі як клодронат (наприклад, BONEFOS® або OSTAC®), етидронат DIDROCAL®, NE-58095, золедронові кислота/золедронат ZOMETA®, алендронат FOSAMAX®, памідронат AREDIA®, тилудронат SKELID® або ризедронат ACTONEL®; а також троксацитабін (1,3-діоксолановий аналог нуклеозиду цитозину); антисмислові олігонуклеотиди, насамперед такі, що інгібують експресію генів шляхів передачі сигналу, які приймають участь у проліферації прикріплених клітин, таких, наприклад, як PKC-альфа, Raf, H-Ras, і рецептори епідермального фактора росту (EGF-R); вакцини, такі як вакцина THERATOPE®, і вакцини, застосовувані в генній терапії, наприклад, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® і вакцина VAXID®; інгібітор топоізомери 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® gmRH; лапатиніба дитосилат (подвійний низькомолекулярний тирозинкіназний інгібітор ErbB-2 і EGFR, відомий також як GW572016); і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якого з перерахованих агентів.

Поняття «агент, що інгібує ріст» у контексті даного опису означає сполуку або композицію, які інгібують ріст клітини, насамперед TAT-експресуючої ракової клітини, або *in vitro*, або *in vivo*. Так, агент, що інгібує ріст, може в значній мірі знижувати відсоток TAT-експресуючих клітин, які знаходяться на S-фазі розвитку. Приклади інгібую-

чих ріст агентів включають агенти, які блокують циклічний розвиток клітини (на фазі, відмінній від S-фази), такі як агенти, які індують припинення G1-фази або M-фази. Класичні блокатори M-фази являють собою похідні вінку (вінкристин і вінбласти́н), таксани та інгібітори топоізомери II, такі як доксорубіцин, епірубіцин, даунорубіцин, етопозид і блеоміцин. Дія агентів, які індують припинення G1-фази, також поширюється на припинення S-фази, наприклад, таких алкілюючих ДНК агентів, як тамоксифен, преднізон, дакабразин, мехлоретамін, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил і ара-С. Додаткову інформацію можна знайти в Molecular Basis of Cancer, під ред. Mendelson та Israel, вид-во WB Saunders: Philadelphia, 1995, у главі 1: Murakami та ін., «Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs», насамперед на стор. 13. Таксани (паклітаксел і доцетаксел) являють собою протиракові лікарські засоби, обидва одержані з тису. Доцетаксел (TAXOTERE®, фірма Rhone-Poulenc Rorer), одержаний з європейського тису, являє собою напівсинтетичний аналог паклітакселу (TAXOL®, фірма Bristol-Myers Squibb). Паклітаксел і доцетаксел стимулюють складання мікротрубок з димерів тубуліну та стабілізують мікротрубки, попереджаючи деполімеризацію, що приводить до інгібування мітозу клітин.

«Доксорубіцин» являє собою антрацикліновий антибіотик. Повна хімічна назва доксорубіцину (8S-цис)-10-[(3-аміно-2,3,6-тридезоксис- $\alpha$ -L-ліксогексапіранозил)окси]-7,8,9,10-тетрагідро-6,8,11-тригідрокси-8-(гідроксіацетил)-1-метокси-5,12-нафтацендіон.

Поняття «цитокін» є загальним для білків, що вивільняються однією популяцією клітин, які впливають на іншу клітину як міжклітинні медіатори. Прикладами таких цитокінів є лімфокіни, монокіни та традиційні поліпептидні гормони. До цитокінів належать гормони росту, такі як людський гормон росту, N-метіонільний людський гормон росту та бичачий гормон росту; паратиреоїдний гормон; тироксин; інсулін; проінсулін; релаксин; пролераксин; глікопротеїнові гормони, такі як фолікулостимулюючий гормон (ФСГ), тиреостимулюючий гормон (ТСГ) і лютеїнізуючий гормон (ЛГ); гепатитарний фактор росту; фактор росту фібробластів; пролактин; плацентарний лактоген; фактор- $\alpha$  та - $\beta$  некрозу пухлини; мулеріанінгібуюча субстанція; мишачий асоційований з гонадотропіном пептид; інгібін; активін; судинний ендотеліальний фактор росту; інтегрин; тромбopoетин (ТРО); фактори росту нерва, такі як NGF- $\beta$ ; фактор росту тромбоцитів; фактори, що трансформують ріст (TGF), такі як TGF- $\alpha$  та TGF- $\beta$ ; інсуліноподібний ростовий фактор -I і -II; еритропоетин (ЕПО); остеогенні фактори; інтерферони, такі як інтерферон - $\alpha$ , - $\beta$  і - $\gamma$ ; колонієстимулюючі фактори (КСФ), такі як колонієстимулюючий фактор макрофагів (М-КСФ); колонієстимулюючий фактор гранулоцитів і макрофагів (ГМ-КСФ); і колонієстимулюючий фактор гранулоцитів (Г-КСФ); інтерлейкіни (ІЛ), такі як ІЛ-1, ІЛ-1а, ІЛ-2, ІЛ-3, ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-7, ІЛ-8, ІЛ-9, ІЛ-11, ІЛ-12; фактор некрозу пухлини, такий як TNF- $\alpha$  або TNF- $\beta$ ; і інші поліпептидні фактори, включаючи LIF (фактор, інгібуючий міграцію

лімфоцитів) і набір лігандів (KL). У контексті даного опису поняття цитокін стосується білків, одержаних із природних джерел або з рекомбінантної культури клітин, та біологічно активних еквівалентів нативних послідовностей цитокінів.

Поняття «лістівка-вкладиш в упаковці» у контексті даного опису стосується інструкцій, які зви-

чайно знаходяться у упаковках терапевтичних продуктів, які надходять до продажу, що містять інформацію про показання, застосування, дозу, шлях введення, протипоказання і/або застереження, щодо застосування терапевтичних продуктів.

Таблиця 1

```
/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M -8 /* value of a match with a stop */

int _day[26][26] = {
/* A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ { _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};
```

```

/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jmps in an path */
#define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0 8 /* penalty for a gap */
#define DINS1 1 /* penalty per base */
#define PINS0 8 /* penalty for a gap */
#define PINS1 4 /* penalty per residue */

struct jmp {
    short n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int score; /* score at last jmp */
    long offset; /* offset of prev block */
    short ijmp; /* current jmp index */
    struct jmp jp; /* list of jmps */
};

struct path {
    int spc; /* number of leading spaces */
    short n[JMPS]; /* size of jmp (gap) */
    int x[JMPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char *ofile; /* output file name */
char *namex[2]; /* seq names: getseqs() */
char *prog; /* prog name for err msgs */
char *seqx[2]; /* seqs: getseqs() */
int dmax; /* best diag: nw() */
int dmax0; /* final diag */
int dna; /* set if dna: main() */
int endgaps; /* set if penalizing end gaps */
int gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
int len0, len1; /* seq lens */
int ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int smax; /* max score: nw() */
int *xbm; /* bitmap for matching */
long offset; /* current offset in jmp file */
struct diag *dx; /* holds diagonals */
struct path pp[2]; /* holds path for seqs */

char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char *getseq(), *g_calloc();

```

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 * where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 * The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
 * Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 * Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 * A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 * Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
    int ac;
    char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;          /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";  /* output file */

    nw();                 /* fill in the matrix, get the possible jumps */
    readjumps();          /* get the actual jumps */
    print();              /* print stats, alignment */

    cleanup(0); /* unlink any tmp files */
}

```

**main**

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */

```

```

nw()

```

```

nw

```

```

{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;      /* keep track of delx */
    int       *tmp;             /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;              /* score for each type */
    int       ins0, ins1;       /* insertion penalties */
    register   id;               /* diagonal index */
    register   ij;               /* jmp index */
    register   *col0, *col1;     /* score for curr, last row */
    register   xx, yy;           /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongong del
     */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over dely
     */

```

...nw

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;

```

```

else if (delx >= dely[yy]) {
    coll[yy] = delx,
    ij = dx[id] ijmp,
    if (dx[id] jp n[0] && ('dna' || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id] jp x[ij]+MX) || mis > dx[id] score+DINS0)) {
        dx[id] ijmp++,
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id),
            ij = dx[id] ijmp = 0,
            dx[id] offset = offset,
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset),
        }
    }
    dx[id] jp n[ij] = ndelx,
    dx[id] jp x[ij] = xx,
    dx[id] score = delx,
}
else {
    coll[yy] = dely[yy],
    ij = dx[id] ijmp,
if (dx[id] jp n[0] && ('dna' || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id] jp x[ij]+MX) || mis > dx[id] score+DINS0)) {
        dx[id] ijmp++,
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id),
            ij = dx[id] ijmp = 0,
            dx[id] offset = offset,
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset),
        }
    }
    dx[id] jp n[ij] = -ndely[yy],
    dx[id] jp x[ij] = xx,
    dx[id] score = dely[yy],
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy),
    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy],
        dmax = id,
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx),
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1],
    dmax = id,
}
}
tmp = col0, col0 = coll, coll = tmp,    }
(void) free((char *)ndely),
(void) free((char *)dely),
(void) free((char *)col0),
(void) free((char *)coll),    }

```



```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static.
 * getmat() -- trace back best path, count matches print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[] print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars pr_align()
 * nums() -- put out a number line dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]) dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26],
int olen, /* set output line length */
FILE *fx, /* output file */

print()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap, /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, '%s can't write %s\n', prog, ofile),
        cleanup(1),
    }
    fprintf(fx, "< first sequence %s (length = %d)\n", namex[0], len0),
    fprintf(fx, "< second sequence %s (length = %d)\n", namex[1], len1),
    olen = 60,
    lx = len0,
    ly = len1,
    firstgap = lastgap = 0,
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0] spc = firstgap = len1 - dmax - 1,
        ly -= pp[0] spc,
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1] spc = firstgap = dmax - (len1 - 1),
        lx -= pp[1] spc,
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1,
        lx -= lastgap,
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1),
        ly -= lastgap,
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap),
    pr_align(),
}

```

print

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
    int lx, ly;          /* "core" (minus endgaps) */
    int firstgap, lastgap, /* leading trailing overlap */
{
    int nm, i0, i1, siz0, siz1,
    char outx[32],
    double pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;
    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc,
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1,
    nm = 0,
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++,
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++,
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++],
                p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100 * (double)nm / (double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "< %d match%s in an overlap of %d. % 2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct),

```

getmat

```

fprintf(fx, "< gaps in first sequence %d", gapx),
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base" "residue", (ngapx == 1)? "" "s"),
    fprintf(fx, "%s", outx),
fprintf(fx, ", gaps in second sequence %d", gapy),
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base" "residue", (ngapy == 1)? "" "s"),
    fprintf(fx, "%s", outx),
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n< score %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1),
else
    fprintf(fx,
        "\n< score %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1),
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "< endgaps penalized left endgap %d %s%s, right endgap %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" "residue", (firstgap == 1)? "" "s",
        lastgap, (dna)? "base" "residue", (lastgap == 1)? "" "s"),
else
    fprintf(fx, "< endgaps not penalized\n"),
}
static nm, /* matches in core -- for checking */
static lmax, /* lengths of stripped file names */
static ij[2], /* jmp index for a path */
static nc[2], /* number at start of current line */
static ni[2], /* current elem number -- for gapping */
static siz[2],
static char *ps[2], /* ptr to current element */
static char *po[2], /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE], /* output line */
static char star[P_LINE], /* set by stars() */
/*
* print alignment of described in struct path pp[]
*/
static
pr_align()
{
    int nn, /* char count */
    int more,
    register i,

    for (i = 0, lmax = 0, i < 2, i++) {
        nn = stripname(nameex[i]),
        if (nn > lmax)
            lmax = nn,
        nc[i] = 1,
        ni[i] = 1,
        siz[i] = ij[i] = 0,
        ps[i] = seqx[i],
        po[i] = out[i],
    }
}

```

...getmat

pr\_align

```

for (nn = nm = 0, more = 1, more;) {
    for (i = more = 0, i < 2, i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue,
            more++;
        if (pp[i] spc) {          /* leading space */
            *po[i]++ = ' ',
            pp[i] spc--;
        }
        else if (siz[i]) {       /* in a gap */
            *po[i]++ = '-',
            siz[i]--;
        }
        else {                   /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i],
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]),
            po[i]++,
            ps[i]++,
            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i] x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i] n[ij[i]]++,
                while (ni[i] == pp[i] x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i] n[ij[i]]++,
            }
            ni[i]++,
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock(),
        for (i = 0, i < 2, i++)
            po[i] = out[i],
        nn = 0,
    }
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i,
    for (i = 0, i < 2, i++)
        *po[i]-- = '\0',

```

...pr\_align

dumpblock

...dumpblock

```

(void) putc('\n', fx),
for (i = 0, i < 2, i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i),
        if (i == 0 && *out[i])
            stars(),
        putline(i),
        if (i == 0 && *out[i])
            fprintf(fx, star),
        if (i == 1)
            nums(i),
    }
}
}
/*
 * put out a number line dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int ix, /* index in out[] holding seq line */
{
    char nline[P_LINE],
    register i, j,
    register char *pn, *px, *py,
    for (pn = nline, i = 0, i < lmax + P_SPC, i++, pn++)
        *pn = ' ',
    for (i = nc[ix], py = out[ix], *py, py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ',
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i - 1,
                for (px = pn, j, j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0',
                if (i < 0)
                    *px = '-',
            }
            else
                *pn = ' ',
            i++,
        }
    }
    *pn = '\0',
    nc[ix] = i,
    for (pn = nline, *pn, pn++)
        (void) putc(*pn, fx),
    (void) putc('\n', fx),
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]) dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int ix, {

```

nums

putline

...putline

```

int      i;
register char    *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int      i;
    register char    *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

stars

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file nw()
 */
#include "nw h"
#include <sys/file h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX", /* tmp file for jumps */
FILE *fj,
int cleanup(), /* cleanup tmp file */
long lseek(),
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
    int i,
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname),
        exit(i),
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ',', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)
    char *file, /* file name */
    int *len, /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq,
    register char *px, *py,
    int natgc, tlen,
    FILE *fp,

```

stripname

cleanup

getseq

```

if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s can't read %s\n", prog, file),
    exit(1),
}
tlen = natgc = 0,
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ',' || *line == '<' || *line == '>')
        continue,
    for (px = line, *px != '\n', px++)
        if (isupper(*px) || islower(*px))
            tlen++,
}
if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file),
    exit(1),
}
pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0',

py = pseq + 4,
*len = tlen,
rewind(fp),
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ',' || *line == '<' || *line == '>')
        continue,
    for (px = line, *px != '\n', px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px,
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px),
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++,
    }
}
*py++ = '\0',
*py = '\0',
(void) fclose(fp),
dna = natgc > (tlen/3),
return(pseq+4),
}
char *
g_calloc(msg, nx, sz)
char *msg, /* program, calling routine */
int nx, sz, /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc(),
    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz),
            exit(1),
        }
    }
    return(px),
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax main()
 */

```

...getseq

g\_calloc



readjumps()

readjumps

```

{
    int      fd = -1,
    int      siz, i0, i1,
    register  i, j, xx,
    if (fj) {
        (void) fclose(fj),
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s can't open() %s\n", prog, jname),
            cleanup(1),
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0, , i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax] ijmp, j >= 0 && dx[dmax] jp x[j] >= xx, j--)

                if (j < 0 && dx[dmax] offset && fj) {
                    (void) lseek(fd, dx[dmax] offset, 0),
                    (void) read(fd, (char *)&dx[dmax] jp, sizeof(struct jmp)),
                    (void) read(fd, (char *)&dx[dmax] offset, sizeof(dx[dmax] offset)),
                    dx[dmax] ijmp = MAXJMP-1,
                }
                else
                    break,
        }
        if (i >= JMPS) {
            fprintf(stderr, "%s too many gaps in alignment\n", prog),
            cleanup(1),
        }
        if (j >= 0) {
            siz = dx[dmax] jp n[j],
            xx = dx[dmax] jp x[j],
            dmax += siz,
            if (siz < 0) { /* gap in second seq */
                pp[1] n[i1] = -siz,
                xx += siz,
                /* id = xx - yy + len1 - 1 */
                pp[1] x[i1] = xx - dmax + len1 - 1,
                gapy++,
                ngapy -= siz,
            }
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz MAXGAP,
            i1++,
        }
        else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
            pp[0] n[i0] = siz,
            pp[0] x[i0] = xx,
            gapx++,
            ngapx += siz,
        }
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz MAXGAP,
        i0++,
    }
}

```

...readjumps

```

    }
    else
        break,
    }
    /* reverse the order of jmps */
    for (j = 0, i0--, j < i0, j++, i0--) {
        i = pp[0] n[j]; pp[0] n[j] = pp[0] n[i0], pp[0] n[i0] = i,
        i = pp[0] x[j]; pp[0] x[j] = pp[0] x[i0], pp[0] x[i0] = i,
    }
    for (j = 0, i1--, j < i1, j++, i1--) {
        i = pp[1] n[j], pp[1] n[j] = pp[1] n[i1], pp[1] n[i1] = i,
        i = pp[1] x[j], pp[1] x[j] = pp[1] x[i1], pp[1] x[i1] = i,
    }
    if (fd >= 0)
        (void) close(fd),
    if (fj) {
        (void) unlink(jname),
        fj = 0,
        offset = 0,
    }
}

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix)
    int ix;
{
    char *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

**writejumps**

Таблиця 2

TAT	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(довжина = 15 амінокислот)	% ідентичності амінокислотних послідовностей = (кількість повністю співпадаючих амінокислотних залишків у двох поліпептидних послідовностях, що визначають за допомогою програми ALIGN-2) ділена на (загальну кількість амінокислотних залишків TAT-поліпептиду) = 5 ділене на 15 = 33,3%
білок, з яким проводиться порівняння («референс»-білок)	XXXXXXXXYYYYYYY	(довжина = 12 амінокислот)	

Таблиця 3

TAT	XXXXXXXXXXXX	(довжина = 10 амінокислот)
Білок, з яким проводиться порівняння	XXXXXXXXYYYYYYZZYZ	(довжина = 15 амінокислот)

% ідентичності амінокислотних послідовностей = (кількість повністю співпадаючих амінокис-

лотних залишків у двох поліпептидних послідовностях, що визначають за допомогою програми

ALIGN-2) ділена на (загальну кількість амінокислотних залишків ТАТ-поліпептиду) = 5 ділене на

10 = 50%

Таблиця 4

ДНК ТАТ	NNNNNNNNNNNNNN	(довжина = 14 нуклеотидів)
ДНК, з якою проводиться порівняння	NNNNNNLLLLLLLL	(довжина = 16 нуклеотидів)

% ідентичності нуклеотидних послідовностей = (кількість повністю співпадаючих нуклеотидів у двох нуклеотидних послідовностях, що визнача-

ють за допомогою програми ALIGN-2) ділена на (загальну кількість нуклеотидів у нуклеотидній послідовності ДНК ТАТ) = 6 ділене на 14 = 42,9%

Таблиця 5

ДНК ТАТ	NNNNNNNNNNNN	(довжина = 12 нуклеотидів)
ДНК, з якої проводиться порівняння	NNNNLLLLVV	(довжина = 9 нуклеотидів)

% ідентичності нуклеотидних послідовностей = (кількість повністю співпадаючих нуклеотидів у двох нуклеотидних послідовностях, що визначають за допомогою програми ALIGN-2) ділена на (загальну кількість нуклеотидів у нуклеотидній послідовності ДНК ТАТ) = 4 ділене на 12 = 33,3%

II. Композиції та способи, пропоновані у винаході

#### А. Антитіла до ТАТ

Одним з варіантів здійснення даного винаходу є антитіла до ТАТ, які можуть знайти застосування як терапевтичні і/або діагностичні агенти. Прикладами антитіл є поліклональні, моноклональні, гуманізовані, біспецифічні антитіла та антитіла, що являють собою гетерокон'югати.

#### 1. Поліклональні антитіла

Поліклональні антитіла переважно утворюються у тварин у відповідь на декілька підшкірні (sc) або внутрішньочеревних (ip) ін'єкцій відповідного антигену та ад'юванту. Їх можна застосовувати для кон'югації відповідного антигену (насамперед, коли використовують синтетичні пептиди) з білком, імуногенним для видів, що підлягають імунізації. Наприклад, антиген можна кон'югувати із гемоціаніном лімфи равлика (KLH), сироватковим альбуміном, бичачим тироглобуліном або інгібітором трипсину із сої, використовуючи біфункціональний або дериватизуючий агент, наприклад, складний сульфосукцинімідний ефір малеїмідобензоїлу (кон'югація через залишки цистеїну), N-гідроксисукцинімід (через залишки лізину), глутаровий альдегід, бурштиновий ангідрид,  $\text{SOCl}_2$  або  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , де  $\text{R}$  і  $\text{R}^1$  означають різні алкілні групи.

Тварин імунізують антигеном, імуногенними кон'югатами або похідними, поєднуючи, наприклад, 100 або 5 мкг білка або кон'югату (для кроликів або мишей відповідно) з 3 об'ємами повного ад'юванту Фрейнда та вводячи розчин внутрішньочеревно в декілька точок. Через 1 місяць тварин піддають бустер-ін'єкціям, використовуючи від 1/5 до 1/10 вихідної кількості пептиду або кон'югату в повному ад'юванті Фрейнда, шляхом підшкірної ін'єкції в декілька точок. Через 7-14 днів у тварин беруть зразки крові, і аналізують титр антитіл у сироватці. Тварин піддають бустер-ін'єкціям до виходу титру антитіл на плато. Кон'югати можна створювати також у культурі рекомбінантних клітин у вигляді білкових злиттів. Для посилення імунної

відповіді можна використовувати також агрегуючі агенти, такі як квасци.

#### 2. Моноклональні антитіла

Моноклональні антитіла можна одержувати за допомогою методу гібридом, уперше описаного в Kohler та ін., Nature, 256, 1975, с. 495, або за допомогою методів рекомбінантної ДНК (U.S. 4816567).

При використанні методу на основі гібридом мишу або іншу придатну тварину-хазяїна, таку як хом'ячок, імунізують згідно з описаною вище методикою для того, щоб викликати утворення лімфоцитів, які продукують або можуть продукувати антитіла, що мають здатність специфічно зв'язуватися з білком, застосовуваним для імунізації. Відповідно до іншого варіанта лімфоцити можна одержувати в результаті імунізації in vitro. Після імунізації лімфоцити виділяють і потім зливають із клітинною лінією мієломи за допомогою прийнятного з'єднуючого агента, такого як поліетиленгліколь, з одержанням клітини гібридом (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, вид-во Academic Press, 1986, сс. 59-103).

Одержані в такий спосіб клітини гібридоми виживають і вирощують у придатному культуральному середовищі, що переважно містить одну або декілька речовин, які інгібують ріст або виживання незлитих батьківських клітин мієломи (які називають також партнерами для злиття). Наприклад, якщо батьківські клітини мієломи не містять фермент гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансферазу (HGPRT або HPRT), то культуральне середовище для гібридом, як правило, повинно включати гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (НАТ-середовище), тобто речовин, які перешкоджають росту клітин з дефіцитом HGPRT.

Кращими застосовуваними як партнер для злиття клітинами мієломи є клітини, які легко піддаються злиттю, підтримують стабільний високий рівень виробництва антитіл вибраними клітинами, що продукують антитіла, й чутливі до вибіркового середовища, на якому відбувається відбирання незв'язаних батьківських клітин. Кращими лініями клітин мієлом є лінії мишачої мієломи, такі як створені на основі мишачих пухлинних клітин ліній MOPC-21 і MPC-11, які можна одержувати з Salk Institute Cell Distribution Center, Сан-Дієго, шт. Каліфорнія, США, і лінії SP-2 і їх похідних, наприклад,

клітин лінії X63-Ag8-653, які можна одержувати з Американської колекції типових культур, Роквілл, шт. Меріленд, США. Описане також застосування ліній клітин людської мієломи та гетеромієломи типу «миша-людина» для виробництва моноклональних антитіл (Kozbor J. Immunol., 133, 1984, с. 3001; і Brodeur та ін., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, вид-во Marcel Dekker Inc., New York, 1987, сс. 51-63).

Культуральне середовище, у якому вирощують клітини гібридоми, аналізують відносно виробництва моноклональних антитіл до антигена. Переважно специфічність зв'язування моноклональних антитіл, одержаних з використанням клітин гібридоми, визначають методом імунопреципітації або за допомогою аналізу зв'язування *in vitro*, такого як радіоімунний аналіз (RIA) або твердофазовий імуноферментний аналіз (ELISA).

Афінність зв'язування моноклонального антитіла можна, наприклад, визначати за допомогою аналізу Скетчарда, описаного в Munson та ін., Anal. Biochem., 107, 1980, с. 220.

Після виявлення клітин гібридоми, які продукують антитіла необхідної специфічності, афінності і/або активності, клони можна субклонувати за допомогою процесів обмежуючого розведення та вирощувати стандартними методами (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, вид-во Academic Press, 1986, сс. 59-103). Придатні для цієї мети культуральні середовища включають, наприклад, середовище D-MEM або RPMI-1640. Крім того, клітини гібридоми можна вирощувати *in vivo* у вигляді асцитних пухлин в організмі тварин, наприклад, шляхом і.р.-ін'єкції клітин мишам.

Моноклональні антитіла, що секретуються субклонами, можна відокремлювати від культурального середовища, асцитної рідини або сироватки за допомогою звичайних методів очищення антитіл, наприклад, афінною хроматографією (наприклад, з використанням протеїну А- або протеїну G-сефарози), або іонообмінною хроматографією, хроматографією на гідроксилапатитах, гелелектрофорезом, діалізом і т.д.

ДНК, що кодує моноклональні антитіла, можна легко виділяти та секвенувати за допомогою загальноприйнятих процедур (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, які мають здатність специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі та легкі ланцюги мишачих антитіл). Кращим джерелом таких ДНК є клітини гібридоми. Після виділення ДНК можна включати до експресійних векторів, якими потім трансфектують клітини-хазяї, такі як клітини *E. coli*, мавпячі COS-клітини, клітини яєчника китайського хом'ячка (СНО) або клітини мієломи, які без трансфекції не продукують білок антитіла, що приводить до синтезу моноклональних антитіл у рекомбінантних клітинах-хазяїнах. Огляд статей про рекомбінантну експресію в бактеріях ДНК, що кодує антитіло, див. в Skerra та ін., Curr. Opinion in Immunol., 5, 1993, сс. 256-262 і Pluckthun, Immunol. Revs. 130, 1992, сс. 151-188.

Відповідно до ще одного варіанту здійснення винаходу моноклональні антитіла або фрагменти антитіл можна виділяти з фагових бібліотек анти-

тіл, створених за допомогою методів, описаних в McCafferty та ін., Nature, 348, 1990, сс. 552-554. В Clarkson та ін., Nature, 352, 1991, сс. 624-628 та Marks та ін., J. Mol. Biol., 222, 1991, сс. 581-597 описане виділення мишачих і людських антитіл відповідно за допомогою фагових бібліотек. У наступних публікаціях було описане виробництво високоафінних (нМ-діапазон) людських антитіл за допомогою перестановки ланцюга (Marks та ін., Bio/Technology, 10, 1992, сс. 779-783), а також комбіаторна інфекція та рекомбінація *in vivo* як стратегія конструювання дуже великих фагових бібліотек (Waterhouse та ін., Nucl. Acids. Res., 21, 1991, сс. 2265-2266). Таким чином, ці методи являють собою реальну альтернативу традиційним методам виділення моноклональних антитіл на основі гібридом моноклональних антитіл.

ДНК, що кодує антитіло, можна модифікувати, наприклад таким чином, щоб одержувати химерні або злиті поліпептиди антитіл, наприклад, шляхом заміни послідовностей константних ділянок важкого та легкого ланцюга ( $C_H$  і  $C_L$ ) на гомологічні мишачі послідовності (U.S. 4816567 і Morrison та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 81, 1984, с. 6851) або за допомогою ковалентного зв'язування кодуючої послідовності імуноглобуліну з усією або із частиною кодуючої послідовності поліпептиду, який не належить до імуноглобулінів (гетерологічного поліпептиду). Поліпептидні послідовності, що не належать до імуноглобулінів, можна замінити константними ділянками антитіла або замінити на варіабельні ділянки антигензв'язуючого центра антитіла, створюючи химерне бівалентне антитіло, яке містить один антигензв'язуючий центр, що має специфічність щодо антигену, і інший антигензв'язуючий центр, що має специфічність щодо іншого антигена.

### 3. Людські та гуманізовані антитіла

Антитіла до ТАТ, пропонувані у винаході, можуть являти собою також гуманізовані антитіла або людські антитіла. Гуманізовані форми антитіл, що не належать людині (наприклад, мишачих), являють собою химерні імуноглобуліни, ланцюги імуноглобулінів або їх фрагменти (такі як Fv-, Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>- фрагменти або інші антигензв'язуючі підпослідовності антитіл), які містять мінімальні послідовності, виведену з імуноглобуліну організму крім людини. Гуманізовані антитіла включають людські імуноглобуліни (антитіло-реципієнт), у яких залишки гіперваріабельної ділянки (CDR) реципієнта замінені залишками з CDR видів крім людини (антитіло-донор), такого як миша, щур або кролик, що мають необхідну специфічність, афінність і потенціал. У деяких випадках залишки каркасної ділянки (FR) людського імуноглобуліну замінюють відповідними залишками імуноглобуліну інших видів крім людини. Крім того, гуманізовані антитіла можуть містити залишки, які не присутні ні в антитілі-реципієнті, ні в імпортованому CDR, ні в послідовностях каркасної ділянки. У цілому, гуманізоване антитіло повинне містити практично повну принаймні одну, а як правило, дві варіабельні ділянки, у яких всі або практично всі CDR відповідають гіперваріабельним ділянкам імуноглобулінів інших тварин крім людини, а всі або практично всі

FR відповідають послідовності людського імуноглобуліну. Гуманізоване антитіло необов'язково може містити також принаймні частину константної ділянки імуноглобуліну (Fc), як правило, людського імуноглобуліну (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).

Методи створення «гуманізованих» антитіл тварин крім людини добре відомі в даній галузі. Як правило, гуманізоване антитіло має один або декілька вбудованих у нього амінокислотних залишків, одержаних із джерела, відмінного від людини. Ці одержані із джерела, відмінного від людини, амінокислотні залишки часто називають «імпорними» залишками, оскільки їх звичайно одержують із «імпортової» варіабельної ділянки. Гуманізацію в цілому можна здійснювати відповідно до методу Winter зі співавторами (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 CDR або послідовностей CDR гризунів на відповідні послідовності людського антитіла. Таким чином, «гуманізовані» антитіла являють собою химерні антитіла (U.S. 4816567), у яких ділянка, істотно менша, ніж інтактна людська варіабельна ділянка, замінена відповідною послідовністю, одержаною з видів крім людини. На практиці гуманізовані антитіла являють собою, як правило, людські антитіла, у яких частина залишків CDR і можливо частина залишків FR замінені залишками з аналогічних ділянок антитіл гризунів.

Вибір людських варіабельних ділянок як легкого, так і важкого ланцюга, призначених для одержання гуманізованих антитіл, дуже важливий для зниження антигенності та НАМА-відповіді (людське мишаче антитіло), коли антитіло призначене для лікування людини. Відповідно до так називаного методу «найкращого підбирання» послідовність варіабельної ділянки антитіла гризунів піддають скринінгу відносно повної бібліотеки відомих послідовностей людських варіабельних ділянок. Людську послідовність V-ділянки, що найбільш близька до послідовності з організму гризунів, ідентифікують і усередині її вибирають людську каркасну ділянку (FR), придатний для застосування в гуманізованому антитілі (Sims та ін., *J. Immunol.*, 151, 1993, с. 2296); Chothia та ін., *J. Mol. Biol.*, 196, 1987, с. 901). В іншому методі використовують визначену каркасну ділянку, одержану з консенсусної послідовності певної підгрупи легких або важких ланцюгів всіх людських антитіл. Одну і ту саму каркасну ділянку можна застосовувати для декількох різних гуманізованих антитіл (Carter та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 89, 1992, с. 4285; Presta та ін., *J. Immunol.*, 151, 1993, с. 2623).

Важливо також, щоб антитіла були гуманізовані зі збереженням високої здатності зв'язування до антигену та інших важливих біологічних властивостей. Для рішення цієї задачі відповідно до кращого способу гуманізовані антитіла одержують за допомогою аналізу батьківських послідовностей і різних гуманізованих продуктів з використанням уможливлених тривимірних моделей батьківських і

гуманізованих послідовностей. Тривимірні моделі імуноглобулінів загальнодоступні й добре відомі спеціалістам у даній ділянці. Відомі комп'ютерні програми, які ілюструють і відображають можливі тривимірні конформаційні структури вибраних перспективних послідовностей (послідовності-«кандидати») імуноглобулінів. Вивчення цих зображень дозволяє здійснювати аналіз можливої ролі залишків у функції перспективної послідовності імуноглобуліну, тобто аналіз залишків, які впливають на здатність перспективного імуноглобуліну (імуноглобулін-«кандидат») зв'язуватися з його антигеном. Таким шляхом можна вибирати залишки в FR і поєднувати з реципієнтними та імпорними послідовностями для досягнення необхідних характеристик антитіла, таких як підвищена афінність до антигену(ам)-мішені(ням). Як правило, залишки гіперваріабельної ділянки здійснюють безпосередній й найбільш істотний вплив на зв'язування антигена.

Відомі різні форми гуманізованого антитіла до ТАТ. Наприклад, гуманізоване антитіло може являти собою фрагмент антитіла, такий як Fab-фрагмент, необов'язково кон'югований з одним або декількома цитотоксичним(ними) агентом(ами) для створення імунокон'югату. В альтернативному варіанті гуманізоване антитіло може являти собою інтактне повнорозмірне антитіло, наприклад, інтактне повнорозмірне антитіло у вигляді IgG1.

Як альтернатива гуманізації, можна одержувати людські антитіла. Наприклад, у цей час можна створювати трансгенних тварин (наприклад, мишей), які після імунізації можуть продукувати повний спектр людських антитіл без виробництва ендогенного імуноглобуліну. Наприклад, було описано, що гомозиготна делеція ділянок стику гена важкого ланцюга антитіла (J<sub>H</sub>-сегмента) в організмі химерних мишей і мишей з мутацією в зародковій лінії приводить до повного інгібування виробництва ендогенного антитіла. Переніс набору зародкової лінії гена людського імуноглобуліну в таку мутантну зародкову лінію мишей приводить до виробництва людських антитіл після контрольного зараження антигеном (див., наприклад, Jakobovits та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 90, 1993, с. 2551; Jakobovits та ін., *Nature*, 362, 1993, сс. 25-258; Bruggemann та ін., *Year in Immune*, 7, 1993, с. 33; і US 5545806, 5569825, 5591669 (у сел ім'я фірми GenPharm); 5545807; і WO 97/17852).

В альтернативному варіанті для одержання людських антитіл і фрагментів антитіл *in vitro* зі спектра генів варіабельної ділянки (V) імуноглобуліну з організму імунованих донорів можна використовувати фагову дисплейну технологію (McCafferty та ін., *Nature*, 348, 1990, сс. 552-553). Відповідно до цієї методики гени V-ділянки антитіла клонують у рамці зчитування або з основним, або з міноним геном оболонкового білка нитчастого бактеріофага, такого як M13 або fd, і презентують у вигляді функціональних фрагментів антитіла на поверхні фагової частинки. Оскільки нитчаста частинка містить копію одноланцюгової ДНК фагового геному, селекції по ознаці функціональних властивостей антитіла також приводять до відбору гена, що кодує антитіло, яке має зазна-

чені властивості. Таким чином, фаг імітує деякі властивості В-клітини. Фагову презентацію можна здійснювати в різних форматах (огляд яких див., наприклад, в Johnson Kevin S. і Chiswell David J., *Current Opinion in Structural Biology*, 3, 1993, сс. 564-571). Для фагової презентації можна використовувати різні джерела сегментів V-генів. Clackson та ін., *Nature*, 352, 1991, сс. 624-628 виділили різні набори антитіл до оксазолону з невеликої довільної комбінаторної бібліотеки V-генів, одержаної із селезінок імунізованих мишей. Можна конструювати спектр V-генів, одержаних з організму імунізованих людей-донорів, і антитіла до різного набору антигенів (включаючи аутоантигени) можна виділяти в цілому відповідно до методів, описаних у Marks та ін., *J. Mol. Biol.*, 222, 1991, сс. 581-597 або в Griffith та ін., *EMBO J.*, 12, 1993, сс. 725-734 (див. також U.S. 5565323 і 5537905).

Як описано вище, людські антитіла можуть продукуватися також *in vitro* активованими В-клітинами (див. U.S. 5567610 і 5229275).

#### 4. Фрагменти антитіла

За певних обставин доцільно застосовувати фрагменти антитіл, а не повні антитіла. Менший розмір фрагментів сприяє їх швидкому кліренсу та може сприяти кращому проникненню в щільні пухлини.

Для одержання фрагментів антитіл розроблені різні методи. Традиційно ці фрагменти одержували шляхом протеолітичного розщеплення інтактних антитіл (див., наприклад, Morimoto та ін., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24, 1992, сс. 107-117 та Brennan та ін., *Science*, 229, 1985, с. 81). Однак у цей час ці фрагменти можна одержувати безпосередньо за допомогою рекомбінантних клітин-хазяїнів. Fab-, Fv- і scFv-фрагменти антитіл можна експресувати і секретувати із *E. coli*, що дозволяє полегшувати виробництво великих кількостей зазначених фрагментів. Фрагменти антитіл можна виділяти з описаних вище фагових бібліотек антитіл. Відповідно до іншого варіанта Fab'-SH-фрагменти можна безпосередньо виділяти з *E. coli* і хімічно зшивати з одержанням F(ab')<sub>2</sub>-фрагментів (Carter та ін., *Bio/Technology*, 10, 1992, сс. 163-167). Відповідно до іншого підходу F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти можна виділяти безпосередньо з культури рекомбінантних клітин-хазяїнів. Fab- і F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти з підвищеним часом напівжиття *in vivo*, у яких збережені залишки епітопу-«рятувальника», що зв'язується з рецептором, описані в U.S. 5869046. Спеціалістам у даній галузі повинні бути очевидні інші методики одержання фрагментів антитіл. В інших варіантах здійснення винаходу вибране антитіло являє собою одноланцюговий Fv-фрагмент (scFv) (див. WO 93/16185; U.S. 5571894 і U.S. 5587458). Fv і scFv являють собою єдині види, які мають інтактні з'єднуючі сайти, позбавлені константних ділянок; у результаті чого їх можна застосовувати для зниженого неспецифічного зв'язування при застосуванні *in vivo*. Злиті білки, що несуть scFv, можна конструювати для одержання злиття ефекторного білка або на N-, або на C-кінці scFv (див. *Antibody Engineering*, під ред. Borrebaeck, вище). Фрагмент антитіла може являти собою також «лінійне анти-

тіло», наприклад описане в U.S. 5641870. Такі фрагменти лінійного антитіла можуть бути моноспецифічними або біспецифічними.

#### 5. Біспецифічні антитіла

Біспецифічні антитіла являють собою антитіла, які мають здатність до специфічного зв'язування принаймні із двома різними епітопами. Наведені в даному описі як приклад біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися із двома різними епітопами TAT-білка. Інші такі антитіла можуть нести сайт зв'язування TAT у сполученні із сайтом зв'язування іншого білка. В альтернативному варіанті плече антитіла до TAT можна поєднувати із плечем, що зв'язується зі стимулюючою молекулою на поверхні лейкоцита, такою як молекула T-клітинного рецептора (наприклад, CD3), або з Fc-рецептором для IgG (FcγR), таким як FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) і FcγRIII (CD16) у результаті чого відбувається фокусування захисних механізмів клітини на експресуючій TAT клітині. Біспецифічні антитіла можна застосовувати також для локалізації цитотоксичних агентів у клітинах, які експресують TAT. Ці антитіла несуть TAT-сполучне плече та плече, що зв'язується із цитотоксичним агентом (наприклад із сапорином, антиінтерфероном-α, алкалоїдом вінку, ланцюгом рицину A, метотрексатом або міченим за допомогою радіоактивного ізотопу гаптенем). Біспецифічні антитіла можна одержувати у вигляді повнорозмірних антитіл або фрагментів антитіл (наприклад, F(ab')<sub>2</sub>-фрагментів біспецифічних антитіл).

В WO 96/16673 описане біспецифічне антитіло до ErbB2/FcγRIII, а в U.S. 5837234 описане біспецифічне антитіло до ErbB2/FcγRII. Біспецифічне антитіло до ErbB2/Fcα описано в WO 96/16673. В U.S. 5821337 описане біспецифічне антитіло до ErbB2/CD3.

Методи створення біспецифічних антитіл відомі в даній галузі. Загальноприйняте одержання повнорозмірних біспецифічних антитіл засновано на спільній експресії двох пар важких і легких ланцюгів імуноглобуліну, де обидва ланцюги мають різну специфічність (Millstein та ін., *Nature*, 305, 1983, сс. 537-539). Через випадковий набір важких і легких ланцюгів імуноглобуліну, ці гібридами (квадроми) потенційно можуть продукувати суміш із 10 різних молекул антитіл, з яких тільки одна має правильну біспецифічну структуру. Очищення правильної молекули, що звичайно здійснюють у декілька стадій за допомогою афінної хроматографії, є досить трудомісткою, а вихід продукту - низьким. Аналогічні процеси описані в WO 93/08829 і в Trautnecker та ін., *EMBO J.*, 10, 1991, сс. 3655-3659.

Відповідно до іншого підходу варіабельні ділянки антитіла з необхідною специфічністю зв'язування (антигензв'язуючі центри антитіла) зливають із послідовностями константної ділянки імуноглобуліну. Злиття переважно здійснюють із константною ділянкою важкого ланцюга Ig, яка включає принаймні частину шарнірних C<sub>H</sub>2- і C<sub>H</sub>3-ділянок. Краще, щоб принаймні в одному зі злиттів була присутня перша константна ділянка важкого ланцюга (C<sub>H</sub>1), що містить сайт, необхідний для зв'язування легкого ланцюга. ДНК, що кодують злиття

важкого ланцюга імуноглобуліну та при необхідності легкого ланцюга імуноглобуліну, вбудовують у різні експресійні вектори й ними спільно трансфектують прийнятний організм-хазяїн. Це забезпечує велику гнучкість у підборі загальних пропорцій трьох поліпептидних фрагментів у варіантах, коли в конструкції використовують нерівні співвідношення трьох поліпептидних ланцюгів з метою оптимізації виходу необхідного біспецифічного антитіла. Однак можна також вбудовувати кодуючі послідовності, двох або всіх трьох поліпептидних ланцюгів в один експресійний вектор, коли експресія принаймні двох поліпептидних ланцюгів у рівних пропорціях забезпечує високі виходи або коли співвідношення не мають вирішального значення для виходу необхідної комбінації ланцюгів.

В кращому варіанті здійснення зазначеного підходу біспецифічні антитіла являють собою гібрид важкого ланцюга імуноглобуліну, що забезпечує першу специфічність зв'язування в першому плечі, і гібрид пари важкий ланцюг-легкий ланцюг імуноглобуліну (що забезпечує другу специфічність зв'язування) у другому плечі. Було виявлено, що ця асиметрична структура полегшує відділення необхідної біспецифічної молекули від небажаних комбінацій ланцюгів імуноглобулінів, оскільки присутність легкого ланцюга імуноглобуліну тільки в одній половині біспецифічної молекули полегшує розділення. Цей підхід описаний в WO 94/04690. Більш докладний опис одержання біспецифічних антитіл наведено, наприклад в Suresh та ін., *Methods in Enzymology*, 121, 1986, с. 210.

Відповідно до наступного підходу, описаного в U.S. 5731168, можна сконструювати ділянку контакту між парою молекул антитіл з метою підвищення до максимального рівня процентного вмісту гетеродимерів, які одержують із культури рекомбінантних клітин. Краща ділянка контакту включає принаймні частину C<sub>H</sub>3-ділянки. Відповідно до цього методу одну або декілька невеликих амінокислот з бічними ланцюгами з ділянки контакту першої молекули антитіла заміняють на молекули з більшими бічними ланцюгами (наприклад, на тирозин або триптофан). Врівноважувальні «порожнини», що ідентичні або близькі за розмірами великому(им) бічному(им) ланцюгу(ам), створюють в ділянці контакту другої молекули антитіла шляхом заміни амінокислот з великими бічними ланцюгами на амінокислоти з більш дрібними бічними ланцюгами (наприклад, на аланін або треонін). Це забезпечує механізм, який сприяє підвищенню виходу гетеродимеру відносно інших небажаних кінцевих продуктів, таких як гомодимери.

Біспецифічні антитіла включають перехресно-зшиті антитіла або «гетерокон'югати». Наприклад, одне з антитіл у гетерокон'югаті може бути зшите з авідином, а інше з біотином. Такі антитіла можна використовувати, наприклад, для напрямленого переносу клітин імунної системи до небажаних клітин (U.S. 4676980) і для лікування ВІЛ-інфекції (WO 91/00360, WO 92/200373 і EP 03089). Антитіла-гетерокон'югати можна створювати за допомогою будь-якого зі звичайних методів введення перехресних зшивок. Прийнятні крос-лінкери добре відомі в даній галузі й описані в U.S. 4676980 по-

ряд з різними методами введення перехресних зшивок.

Методи одержання біспецифічних антитіл із фрагментів антитіл також відомі з літератури. Наприклад, біспецифічні антитіла можна одержувати за допомогою хімічного зв'язування. Brennan та ін., *Science*, 229, 1985, с. 81, описали методику, відповідно до якої інтактні антитіла піддають протеолітичному розщепленню, одержуючи F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти. Ці фрагменти відновлюють у присутності агента, що утворює комплекси з дитіолом, такого як арсеніт натрію, для стабілізації сусідніх дитіолів і попередження утворення міжмолекулярних дисульфідних зв'язків. Одержані Fab'-фрагменти потім перетворюють на тіонітробензоатне (TNB) похідне. Одне з Fab'-TNB-похідних потім повторно перетворюють на Fab'-тіол шляхом відновлення меркаптоетиламіном і змішують із еквімолярною кількістю іншої Fab'-TNB-похідної, одержуючи біспецифічне антитіло. Одержані біспецифічні антитіла можна застосовувати як агенти для вибіркової іммобілізації ферментів.

Досягнутий у наш час прогрес дозволяє полегшувати безпосереднє виділення з *E. coli* Fab'-SH-фрагментів, які можна хімічно зшивати з утворенням біспецифічних антитіл. Shalaby та ін., *J. Exp. Med.*, 175, 1992, сс. 217-225 описали одержання молекули F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента повністю гуманізованого біспецифічного антитіла. Кожний Fab'-фрагмент окремо секретували з *E. coli* і його піддавали безпосередньому хімічному зв'язуванню *in vitro* з одержанням біспецифічного антитіла. Одержане в такий спосіб біспецифічне антитіло мало здатність зв'язуватися із клітинами, для яких характерна надекспресія рецептора ErbB2, і зі здоровими людськими Т-клітинами, а також стимулювати літичну активність людських цитотоксичних лімфоцитів, мішенню яких є пухлина молочної залози людини.

Описані також різні методи одержання та виділення фрагментів біспецифічних антитіл безпосередньо з культури рекомбінантних клітин. Наприклад, біспецифічні антитіла одержували за допомогою лейцинових «застібко-блискавок» (Kostelny та ін., *J. Immunol.*, 148(5), 1992, сс. 1547-1553). Пептиди лейцинових «застібко-блискавок» з білків Fos і Jun зв'язували з Fab'-фрагментами двох різних антитіл шляхом генного злиття. Гомодимери антитіл відновлювали в шарнірній ділянці з одержанням мономерів, а потім шляхом повторного окиснення одержували гетеродимери антитіл. Цей метод можна застосовувати також для одержання гомодимерів антитіл. Технологія на основі «подвійних антитіл», описана Hollinger та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1993, сс. 6444-6448, являє собою інший механізм одержання фрагментів біспецифічних антитіл. Фрагменти містять V<sub>H</sub>-ділянку, зв'язану з V<sub>L</sub>-ділянкою лінкером, що є занадто коротким, для того щоб дозволити відбутися спарюванню двох доменів одного й того ж ланцюга. Таким чином, V<sub>H</sub>- і V<sub>L</sub>-ділянки одного фрагмента повинні спарюватися з комплементарними V<sub>L</sub>- і V<sub>H</sub>-ділянками іншого фрагмента, утворюючи тим самим два антигензв'язуючих центри. Описана також інша стратегія одержання фрагментів біспецифіч-

них антитіл, заснована на застосуванні одноланцюгових Fv-(sFv) димерів (див. Gruber та ін., J. Immunol., 152, 1994, с. 5368).

Під обсяг винаходу підпадають також антитіла, що мають більше двох валентностей. Наприклад, можна одержувати триспецифічні антитіла (Tutt та ін., J. Immunol., 147, 1991, с. 60).

#### 6. Антитіла-гетерокон'югати

Під обсяг даного винаходу підпадають також антитіла-гетерокон'югати.

Антитіла-гетерокон'югати складаються із двох ковалентно зв'язаних антитіл. Такі антитіла, наприклад, можна застосовувати для напрямленого переносу клітин імунної системи до небажаних клітин (U.S. 4676980) і для лікування ВІЛ-інфекції (WO 91/00360, WO 92/200373 і EP 03089). Очевидно, що такі антитіла можна одержувати *in vitro* за допомогою звичайних методів хімічного синтезу білків, включаючи застосування крос-лінкерів. Наприклад, можна конструювати імунотоксини з використанням реакції дисульфідного обміну або за допомогою формування тіоефірного зв'язку. Прикладами прийнятних реагентів є імінотіолат і метил-4-меркаптобутиримідат і інші реагенти, описані, наприклад, в U.S. 4676980.

#### 7. Полівалентні антитіла

Полівалентне антитіло може інтерналізуватися (і/або дисимілюватися) клітиною, яка експресує антиген, з яким зв'язується антитіло, швидше, ніж бівалентне антитіло. Антитіла, пропоновані в даному винаході, можуть являти собою полівалентні антитіла (відмінні від класу IgM) із трьома або більшою кількістю антигензв'язуючих центрів (наприклад, тетравалентні антитіла), які можна легко одержувати шляхом рекомбінантної експресії нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептидні ланцюги антитіла. Полівалентне антитіло може містити димеризований домен і три або більшу кількість антигензв'язуючих центрів. Кращий димеризований домен містить (або складається з) Fc-ділянку або шарнірну ділянку. У такому випадку антитіло повинне містити Fc-ділянку і три або більшу кількість антигензв'язуючих центрів, розташованих на N-кінці відносно Fc-ділянки. Відповідно до даного опису краще полівалентне антитіло містить (або складається з) від 3 до приблизно 8, але переважно 4 антигензв'язуючих центрів. Полівалентне антитіло містить принаймні один поліпептидний ланцюг (і переважно два поліпептидні ланцюги), при цьому поліпептидний(і) ланцюг(и) містить(ять) дві або більшу кількість варіабельних ділянок. Наприклад поліпептидний(і) ланцюг(и) може(уть) містити VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-(X2)<sub>n</sub>-Fc, де VD1 означає першу варіабельну ділянку, VD2 означає другу варіабельну ділянку, Fc означає один поліпептидний ланцюг Fc-ділянки, X1 і X2 означають амінокислоту або поліпептид і n означає 0 або 1. Наприклад, поліпептидний(і) ланцюг(и) може(уть) містити наступний ланцюг: VH-CH1-гнучкий лінкер-VH-CH1-Fc-ділянка; або VH-CH1-VH-CH1-Fc- ділянка. Полівалентне антитіло, пропоноване в даному винаході, переважно додатково містить принаймні 2 (і переважно 4) поліпептиди варіабельної ділянки легкого ланцюга. Полівалентне антитіло, пропоноване в даному винаході, може, наприклад, містити

від приблизно 2 до приблизно 8 поліпептидів варіабельної ділянки легкого ланцюга. У контексті даного опису мається на увазі, що поліпептиди варіабельної ділянки легкого ланцюга містять варіабельну ділянку легкого ланцюга та необов'язково додатково містять CL-ділянку.

#### 8. Створення ефекторних функцій

Може виявитися бажаним модифікувати антитіло, пропоноване у винаході, у відношенні його ефекторної функції, наприклад, для того, щоб підвищувати антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність (ADCC) і/або комплементзалежну цитотоксичність (CDC) антитіла. Для досягнення цього можна інтродукувати одну або декількох амінокислотних замін в Fc-ділянку антитіла. В альтернативному або додатковому варіанті залишок(ки) цистеїну можна інтродукувати в Fc-ділянку, що приводить до утворення в цій ділянці дисульфідного зв'язку між ланцюгами. Одержане в такий спосіб гомодимерне антитіло може мати поліпшену здатність до інтерналізації і/або підвищену комплементзалежну цитотоксичність й антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність (ADCC) (див. Caron та ін., J. Exp. Med., 176, 1992, сс. 1191-1195 і Shopes, J. Immunol., 148, 1992, сс. 2918-2922). Гомодимерні антитіла з підвищеної протипухлинною активністю можна одержувати також з використанням гетеробіфункціональних крос-лінкерів, відповідно до методики, описаної в Wolff та ін., Cancer Research, 53, 1993, сс. 2560-2565. В іншому варіанті можна конструювати антитіло, яке має подвоєну кількість Fc-ділянок, що внаслідок цього може мати підвищену здатність до комплементзалежного лізису та ADCC (див. Stevenson та ін., Anti-Cancer Drug Design, 3, 1989, сс. 219-230). Для збільшення часу напівжиття антитіла в сироватці в антитіло можна включати епітоп-«рятувальник», що зв'язується з рецептором, (насамперед у фрагмент антитіла), наприклад, відповідно до методу, що описаний в U.S. 5739277. У контексті даного опису поняття «епітоп-«рятувальник», що зв'язується з рецептором», стосується епітопу Fc-ділянки молекули IgG (наприклад, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> або IgG<sub>4</sub>), що відповідає за збільшення часу напівжиття в сироватці *in vivo* молекули IgG.

#### 9. Імунокон'югати

Винахід стосується також імунокон'югатів, які містять антитіло, кон'юговане із цитотоксичним агентом, таким як хіміотерапевтичний агент, агент, що інгібує ріст, токсин (наприклад, токсин, що має ферментативну активність бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження або їх фрагменти) або радіоактивний ізотоп (тобто радіокон'югат).

Хіміотерапевтичні агенти, які можна застосовувати для одержання таких імунокон'югатів, описані вище. Токсини і їх фрагменти, що мають ферментативну активність, які можна застосовувати, включають ланцюг А дифтерійного токсину, активні фрагменти дифтерійного токсину, що не зв'язуються, ланцюг А екзотоксину (з *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А рицину, ланцюг А абрину, ланцюг А модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантину, білки *Phytolaca americana*



(PAPI, PAPII та PAP-S), інгібітор з *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор з *Saponaia officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трикотецени. Різні радіоактивні ізотопи можна застосовувати для одержання радіокон'югатів антитіл. Їх приклади включають  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  і  $^{186}\text{Re}$ . Кон'югати, що включають антитіло та цитотоксичний агент, можна створювати з використанням цілого ряду біфункціональних зв'язуючих білки агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилітол)пропіонат (SPDP), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоєфірів (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-діазонібензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) та біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, імунотоксин рицину можна одержати за методом, описаним у Vitetta та ін., Science, 238, 1987, с. 1098). Мічена за допомогою  $\text{C}^{14}$  1-ізоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) є прикладом хелатуючого агента для кон'югації радіонуклеотиду з антитілом (див. WO 94/11026).

Під обсяг винаходу підпадають також кон'югати антитіла та одного або декількох низькомолекулярних токсинів, таких як каліхеаміцин, майтансиноїди, трихотен і CC1065 та похідних цих токсинів, які мають активність токсинів.

#### Майтансин і майтансиноїди

В одному із кращих варіантів здійснення винаходу антитіло до TAT (повнорозмірне або фрагменти), пропоноване у винаході, кон'югують з однією або декількома молекулами майтансиноїду.

Майтансиноїди являють собою інгібітори мітозу, які проявляють дію за допомогою інгібування полімеризації тубуліну. Майтансин уперше був виділений зі східно-африканського чагарнику *Maytenus serrata* (U.S. 3896111). Далі було встановлено, що певні мікроорганізми також продукують майтансиноїди, такі як майтансинол і складні C-3-ефіри майтансинолу (U.S. 4151042). Синтетичний майтансинол і його похідні та аналоги описані, наприклад в U.S. 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; і 4371533, зміст яких включено в даний опис як посилання.

#### Кон'югати майтансиноїд-антитіло

З метою підвищення терапевтичного індексу майтансин і майтансиноїди кон'югували з антитілами, що специфічно зв'язуються з антигенами пухлинної клітини. Імунокон'югати, що містять майтансиноїди, та їх терапевтичне застосування описані, наприклад, у U.S. 5208020, 5416064 та EP 0425235B1, зміст яких спеціально включений в даний опис як посилання. В Liu та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1996, сс. 8618-8623 описані імунокон'югати, які містять майтансиноїд, позначений DM1, зв'язаний з моноклональним антитілом

C242 до людського колоректального раку. Встановлено, що кон'югат має високу цитотоксичність щодо клітин раку ободової кишки в культурі та протипухлинною активністю *in vivo* при аналізі росту пухлини. Chari та ін., Cancer Research 52, 1992, сс. 127-131, описали імунокон'югати, у яких майтансиноїд кон'югований через дисульфідний місток з мишачим антитілом A7, що зв'язується з антигеном, який знаходиться на клітинах людської лінії раку ободової кишки, або з іншим мишачим моноклональним антитілом TA.1, що зв'язується з онкогеном HER.-2/neu. Цитотоксичність кон'югату TA.1-майтансоноїд тестували *in vitro* з використанням людської лінії клітин раку молочної залози SK-BR-3, у якій відбувається експресія  $3 \times 10$  поверхневого антигену HER-2 на клітину. У кон'югату з лікарським засобом була досягнута цитотоксичність, аналогічна токсичності лікарського засобу, що містить вільний майдансонід, яку можна підвищувати, збільшуючи кількість молекул майдансоноїду на молекулу антитіла. Встановлено, що кон'югат A7-майтансиноїд має знижену системну цитотоксичність щодо мишей.

Кін'югати: антитіло до поліпептиду TAT-майтансиноїд (імунокон'югати)

Кон'югати антитіло до TAT-майтансиноїд одержують шляхом хімічного зшивання антитіла до TAT з молекулою майдансоноїду без помітного зниження біологічної активності або антитіла, або молекули майдансоноїду. Встановлено, що кон'югування у середньому 3-4 молекул майдансоноїду з молекулою антитіла дозволяє ефективно підвищувати цитотоксичність щодо клітин-мішеней без негативного впливу на функцію або розчинність антитіла, хоча, як очікується, застосування навіть однієї молекули токсину/молекулу антитіла повинне приводити до підвищення цитотоксичності у порівнянні з використанням «оголеного» антитіла. Майдансиноїди добре відомі в даній галузі, і їх можна синтезувати за допомогою відомих методів або виділяти із природних джерел. Придатні майдансиноїди описані, наприклад, в U.S. 5208020 і в інших патентах і публікаціях, що не стосуються патентів, зазначених вище. Кращими майдансиноїдами є майдансинол і аналоги майдансинолу, модифіковані в ароматичному кільці або в інших положеннях молекули майдансинолу, наприклад, різні складні ефіри майдансинолу.

У даній галузі відомо багато лінкерних груп, призначених для створення кон'югатів антитіло-майтансиноїд, у тому числі, наприклад, групи, описані в U.S. 5208020 або EP 0425235B1 і в Chari та ін., Cancer Research 52, 1992, сс. 127-131 і в заявці на патент США № 10/960602, що подана 8 жовтня 2004 р., опис яких спеціально включений в даний опис як посилання. Кон'югати антитіло-майтансиноїд, які містять як лінкер SMCC (N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат) можна одержувати відповідно до методу, що описаний у заявці на патент США № 10/960602, яка подана 8 жовтня 2004 р. Лінкерні групи являють собою дисульфідні групи, тіоефірні групи, нестійкі в кислому середовищі групи, фотолабільні групи, чутливі до дії пептидаз групи або чутливі до дії естераз групи, які описані у перера-

хованих вище патентах, кращими є дисульфідні та тіоефірні групи. Інші лінкерні групи представлені та наведені як приклади в даному описі.

Кон'югати антитіла та майтансиноїду можна створювати за допомогою різноманітних біфункціональних агентів, що зшивають білки, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат, імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоефірів (такі як диметиладипімідат-HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаровий альдегід, бісазидопохідні (такі як біс(пара-азидобензоїл)гександіамін), похідні бісдіазонію (такі як біс(пара-діазонійбензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціант), та активні бісполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Особливо кращими зшивальними агентами, які приймають участь в утворенні дисульфідного мостика, є N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP) (Carlsson та ін., *Biochem. J.* 173, 1978, сс.723-737) та N-сукцинімідил-4-(2-піридилтіо)пентаноат (SPP).

Лінкер можна приєднувати до молекули майтансиноїду в різних положеннях залежно від типу зв'язку. Наприклад, складноєфірний зв'язок можна утворювати взаємодією з гідроксильною групою з використанням загальноприйнятих методів сполучення. Реакція може мати місце в положенні C-3, що несе гідроксильну групу, у положенні C-14, що модифіковане гідроксиметилом, у положенні C-15, що модифіковане гідроксильною групою, і в положенні C-20, що несе гідроксильну групу. У кращому варіанті здійснення винаходу зв'язок утворюють у положенні C-3 майтансинолу або аналога майтансинолу.

#### Ауристатини та долостатини

У деяких варіантах здійснення винаходу імунокон'югат містять антитіло, пропонуване у винаході, кон'юговане з долостатинами або пептидними аналогами та похідними долостатину, ауристатинами (U.S. 5635483; 5780588). Встановлено, що долостатини та ауристатини впливають на динаміку мікротрубок, гідроліз ГТФ і розподіл ядер і клітин (Woyke та ін. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12), 2001, сс. 3580-3584) і мають протиракову (U.S. 5663149) і фунгіцидну активність (Pettit та ін. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1998, сс. 2961-2965). Фрагмент лікарських субстанцій долостатину або ауристатину можна приєднувати до антитіла через N-(аміно)-кінець або C-(карбоксильний)-кінець пептидного фрагмента лікарської субстанції (WO 02/088172).

Прикладами ауристатину є зв'язані через N-кінець монометилауристатинові фрагменти лікарської субстанції DE і DF (тобто, MMAE (монометилауристатин E) і MMAF (монометилауристатин F)), описані в: «Senter та ін., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*», т. 45, номер реферату 623, від 28 березня 2004 р., що спеціально включений у даний опис як посилання.

Як правило, пептидні фрагменти лікарської субстанції можна одержувати шляхом утворення пептидного зв'язку між двома або більшою кількістю амінокислот і/або пептидних фрагментів. Такі

пептидні зв'язки можна одержувати, наприклад, відповідно до методу синтезу в рідкій фазі (див. E. Schröder і K. Lübke, «*The Peptides*», вид-во Academic Press, т. 1, 1965, сс. 76-136), що добре відомий в галузі хімії пептидів. Фрагменти лікарських субстанцій ауристатину/долостатину можна одержувати за допомогою методів, описаних в: U.S. 5635483; U.S. 5780588; в Pettit та ін. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 1989, сс. 5463-5465; Pettit та ін. *Anti-Cancer Drug Design* 13, 1998, сс. 243-277; Pettit, G.R. та ін. *Synthesis*, 1996, сс. 719-725; Pettit та ін. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 15, 1996, сс. 859-863; та Doronina *Nat Biotechnol* 21(7), 2003, сс. 778-784.

#### Каліхеаміцин

Інший імунокон'югат, що являє інтерес, містить антитіло до TAT, кон'юговане з однією або декількома молекулами каліхеаміцину. Представники сімейства каліхеаміцинових антибіотиків у субікомольярних концентраціях мають здатність викликати розриви дволанцюгових ДНК. Одержання кон'югатів каліхеаміцину описане в U.S. 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (усі на ім'я фірми American Cyanamid Company). Структурні аналоги каліхеаміцину, які можна застосовувати, включають (але, не обмежуючись ними)  $\gamma_1^1$ ,  $\alpha_2^1$ ,  $\alpha_3^1$ , N-ацетил-  $\gamma_1^1$ , PSAG і  $\theta_1^1$  (Hinman та ін., *Cancer Research* 53, 1993, сс. 3336-3342; Lode та ін., *Cancer Research* 58, 1998, сс. 2925-2928 і перераховані вище патенти США на ім'я фірми American Cyanamid). Іншим протипухлинним лікарським засобом, який можна включати до кон'югату з антитілом, є QFA, що являє собою антифолат. Як каліхеаміцин, так і QFA мають внутрішньоклітинні місця дії та погано проникають через плазматичну мембрану. Таким чином, проникнення в клітину цих агентів у результаті опосередкованої антитілом інтерналізації значно підвищує їх цитотоксичну дію.

#### Інші цитотоксичні агенти

Інші протипухлинні агенти, які можна кон'югувати із антитілами до TAT, пропонувані у винаході, являють собою BCNU, стрептозоїцин, вінкристин і 5-фторурацил, сімейство агентів, відомих під загальною назвою LL-E33288-комплекс, які описані в U.S. 5053394, 5770710, а також як еспераміцини (U.S. 5877296).

Токсини, що мають ферментативну активність, і їх фрагменти, які можна застосовувати, включають ланцюг А дифтерійного токсину, активні фрагменти дифтерійного токсину, що не зв'язуються, ланцюг А екзотоксину (з *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А рицину, ланцюг А абрину, ланцюг А модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантину, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор з *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор з *Sapaonaria officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трикотечени (див., наприклад, WO 93/21232, опубліковану 28 жовтня 1993 р.).

Даний винахід також стосується імунокон'югату, що включає антитіло та сполуку, яка має нуклеолітичну активність (наприклад, рибонуклеазу або ДНК-ендонуклеазу, таку як дезоксирибонуклеаза; ДНКазу).

Для вибіркового руйнування пухлини антитіло може містити атом з високим рівнем радіоактивності. Для створення радіокон'югованих антитіл до ТАТ можна застосовувати широку розмаїтість радіоактивних ізотопів. Їх прикладами є  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  та радіоактивні ізотопи Lu. Якщо кон'югат застосовують для діагностики, він може містити радіоактивний атом, застосовуваний для скінтиграфічних досліджень, наприклад,  $Tc^{99m}$  або  $I^{123}$ , або спінову мітку для візуалізації з використанням ядерного магнітного резонансу (ЯМР) (який називають також ЯМР-томографія), таку як знову йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

Радіоактивні або інші мітки можна включати до кон'югату з використанням відомих методів. Наприклад, пептид можна одержувати шляхом біосинтезу або синтезувати за допомогою хімічного амінокислотного синтезу з використанням прийнятних амінокислотних попередників, які, наприклад, містять фтор-19 у положенні водню. Такі мітки, як  $Tc^{99m}$  або  $I^{123}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$  та  $In^{111}$ , можна приєднувати до пептиду через залишок цистеїну. Ітрій-90 можна приєднувати через залишок лізину. Для включення йоду-123 можна застосовувати IODOGEN-метод (Fraker та ін., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 1978, сс. 49-57). У посібнику «Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy» (Chatal, вид-во CRC Press, 1989) докладно описані інші методи.

Кон'югати, що містять антитіло та цитотоксичний агент, можна створювати за допомогою різних біфункціональних речовин, які зв'язують білки, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат, імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоєфірів (такі як диметиладипімідат-HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаровий альдегід, бісазидопохідні (такі як біс(пара-азидобензоїл)гександіамін), похідні бісдіазонію (такі як біс(пара-діазонійбензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціант), та активні бісполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, імунотоксин рицин можна одержувати відповідно до методу, що описаний у Vitetta та ін., Science 238, 1987, с. 1098). Мічена за допомогою C-14 1-ізоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінопентаоцтова кислота (MX-DTPA) є прикладом хелатуючого агента, котрий можна застосовувати для кон'югації радіоактивного нуклеотиду з антитілом (див. WO 94/11026). Лінкер може являти собою «розщеплюваний лінкер», який полегшує вивільнення цитотоксичного лікарського засобу в клітині. Наприклад, можна використовувати нестійкий у кислому середовищі лінкер, чутливий до дії пептидаз лінкер, фотолабільний лінкер, диметильний лінкер или лінкер, що містить дисульфідний зв'язок (Chari та ін., Cancer Research, 52, 1992, сс. 127-131; U.S. 5208020).

До сполук, пропонованих у винаході, насамперед належать (але, не обмежуючись ними) ADC,

одержані за допомогою наступних крос-лінкерів: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPI, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC і сульфо-SMPB та SVSB (сукцинімідил(4-вінілсульфон)бензоат), які є у продажу (наприклад, постачаються фірмою Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, шт. Іллінойс, США) (див. Довідник з застосування та каталог (Applications Handbook and Catalog) 2003-2004 р., сс. 467-498).

В іншому варіанті злитий білок, що містить антитіло до ТАТ і цитотоксичний агент, можна одержувати, наприклад, методами рекомбінантної ДНК або пептидного синтезу. У ДНК можуть бути присутніми відповідні ділянки, які кодують дві частини кон'югату, або по сусідству одна з одною, або розділені ділянкою, яка кодує лінкерний пептид, що не порушує необхідні властивості кон'югату.

В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло можна кон'югувати із «рецептором» (таким як стрептавідин) для використання в попередньому напрямленому перенесенні в пухлину, коли кон'югат антитіло-рецептор вводять пацієнту з наступним видаленням незв'язаного кон'югату із кровотоку за допомогою агента для кліренсу та потім вводять «ліганд» (наприклад, авідин), кон'югований із цитотоксичним агентом (наприклад, радіонуклеотидом).

#### 10. Імуноліпосоми

На основі антитіла до ТАТ, пропонованих у даному винаході, можна приготувати форми типу імуноліпосом. «Ліпосома» являє собою невеликий пухирець, що складається з різних типів ліпідів, фосфоліпідів і/або поверхнево-активних речовин, який можна застосовувати для введення лікарського засобу ссавцю. Компоненти ліпосом, як правило, мають двошарову будову, що нагадує організацію ліпідів у біологічних мембранах. Ліпосоми, що містять антитіло, одержують за допомогою добре відомих у даній галузі методів, наприклад, описаних в Epstein та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 82, 1995, с. 3688; Hwang та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 77, 1980, с. 4030; US 4485045 і 4544545; і в WO 97/38731, що опублікована 23 жовтня 1997 р. Ліпосоми з подовженням часом життя в кровотоці описані в U.S. 5013556.

Особливо кращі ліпосоми можна одержувати методом випарювання з оберненою фазою з використанням ліпідної композиції, яка включає фосфатидилхолін, холестерин і дериватизований за допомогою ПЕГ фосфатидилетаноламін (ПЕГ-ФЕ). Ліпосоми екструдують через фільтри з певним розміром пор, одержуючи ліпосоми необхідного діаметра. Fab'-фрагменти антитіла, пропонованого в даному винаході, можна включати до ліпосом відповідно до методу, описаному в Martin та ін., J. Biol. Chem., 257, 1982, сс. 286-288, за допомогою реакції утворення дисульфідного зв'язку. У ліпосоми не обов'язково можна включати хіміотерапевтичний агент (див. Gabizon та ін., J. National Cancer Inst, 81(19), 1989, с. 1484).

#### Б. ТАТ-зв'язуючі олігопептиди

ТАТ-зв'язуючі олігопептиди, пропоновані в даному винаході, являють собою олігопептиди, які

зв'язуються, переважно специфічно, з ТАТ-поліпептидом, представленому в даному описі. ТАТ-зв'язуючі олігопептиди можна одержувати шляхом хімічного синтезу за допомогою відомих методів синтезу олігопептидів або їх можна одержувати та очищувати за допомогою методу рекомбінантної ДНК. ТАТ-зв'язуючі олігопептиди, як правило, складаються принаймні приблизно з 5 амінокислот, в іншому варіанті принаймні приблизно з 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100 амінокислот або більше, при цьому олігопептиди мають здатність до зв'язування, переважно специфічно, з ТАТ-поліпептидом, представленому в даному описі. ТАТ-зв'язуючі олігопептиди можна ідентифікувати без зайвих експериментів з використанням добре відомих методів. У цьому зв'язку слід зазначити, що методи скринінгу бібліотек олігопептидів, які можуть специфічно зв'язуватися з поліпептидом-мішенню, добре відомі в даній галузі (див., наприклад, U.S. 5556762, 5750373, 4708871, 4833092, 5223409, 5403484, 5571689, 5663143; публікації PCT WO 84/03506 та WO 84/03564; Geysen та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, 1984, сс. 3998-4002; Geysen та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 1985, сс. 178-182; Geysen та ін., *Synthetic Peptides as Antigens*, 1986, сс. 130-149; Geysen та ін., *J. Immunol. Meth.*, 102, 1987, сс. 259-274; Schoofs та ін., *J. Immunol.*, 140, 1988, сс. 611-616, Cwirla S.E. та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, с. 6378; Lowman H.B. та ін., *Biochemistry*, 30, 1991, с. 10832; Clackson T. та ін., *Nature*, 352, 1991, с. 624; Marks J.D. та ін., *J. Mol. Biol.*, 222, 1991, с. 581; Kang A.S. та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, с. 8363 і Smith G.P., *Current Opin. Biotechnol.*, 2, 1991, с. 668).

Презентація для цієї мети бактеріофагом (фагом) являє собою добре відомий метод, який дозволяє здійснювати скринінг великих бібліотек олігопептидів для ідентифікації представника(ів) цих бібліотек, який(які) має(мають) здатність до специфічного зв'язування з поліпептидом-мішенню. Презентація фагом являє собою метод, при використанні якого варіанти поліпептидів презентуються у вигляді білків, злитих з оболонковим білком на поверхні частинок бактеріофага (Scott J.K. і Smith G. P. *Science* 249, 1990, с. 386). Можливість застосування фагової презентації обумовлена тим, що вона дозволяє швидко та ефективно сортувати великі бібліотеки вибірково рандомізованих варіантів білка (або випадковим чином клонованих кДНК) відносно тих послідовностей, які зв'язуються з молекулою-мішенню з високою афінністю. Презентацію пептидних (Cwirla S.E. та ін. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, с. 6378) або білкових (Lowman H.B. та ін. *Biochemistry*, 30, 1991, с. 10832; Clackson T. та ін. *Nature*, 352, 1991, с. 624; Marks J.D. та ін. *J. Mol. Biol.*, 222, 1991, с. 581; Kang A.S. та ін. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, с. 8363) фагових бібліотек використовували для

скринінгу мільйонів поліпептидів або олігопептидів щодо їх здатності до специфічного зв'язування (Smith G. P., *Current Opin. Biotechnol.*, 2, 1991, с. 668). Для сортування фагових бібліотек випадкових мутантів необхідна стратегія конструювання та розмноження великої кількості варіантів, процедура очищення на основі афінності за допомогою рецептора-мішені та методи оцінки результату за збільшенням здатності до зв'язування (U.S. 5223409, 5403484, 5571689 і 5663143).

Хоча в більшості методів, заснованих на застосуванні фагової презентації, використовують нитчастий фаг, відомі також системи презентації на основі фага-лямбда (WO 95/34683; U.S. 5627024), на основі фага T4 (Ren та ін., *Gene*, 215, 1998, сс. 439; Zhu та ін., *Cancer Research*, 58(15), 1998, сс. 3209-3214; Jiang та ін., *Infection & Immunity*, 65(11), 1997, сс. 4770-4777; Ren та ін., *Gene*, 195(2), 1997, сс. 303-311; Ren, *Protein Sci.*, 5, 1996, с. 1833; Efimov та ін., *Virus Genes*, 10, 1995, с. 173) і фага T7 (Smith і Scott, *Methods in Enzymology*, 217, 1993, сс. 228-257; U.S. 5766905).

До нашого часу розроблені численні інші вдосконалення та варіації основної концепції фагової презентації. Ці вдосконалення підвищують можливість застосування систем презентації для скринінгу пептидних бібліотек щодо зв'язування з вибраними молекулами-мішенями та презентації функціональних білків зі збільшенням потенціалу скринінгу цих білків щодо необхідних властивостей. Розроблено пристрої для здійснення комбіаторної реакції, застосовувані при фаговій презентації (WO 98/14277), і фагові дисплейні бібліотеки використовували для аналізу та контролю біомолекулярних взаємодій (WO 98/20169; WO 98/20159) і властивостей примусово спіралеподібних пептидів (WO 98/20036). В WO 97/35196 описаний метод виділення ліганду, що має афінність, який полягає у тому, що фагову дисплейну бібліотеку приводять у контакт із одним розчином, у якому ліганд повинен зв'язуватися з молекулою-мішенню, і другим розчином, у якому ліганд, що має афінність, не повинен зв'язуватися з молекулою-мішенню, для вибіркового виділення лігандів, що зв'язуються. В WO 97/46251 описаний метод біопенінгу випадкової фагової дисплейної бібліотеки за допомогою очищення на основі афінності антитіла та виділення після цього фага, що зв'язується, з наступним мікропенінгом з використанням лунок мікропланшета для виділення фага, що має високу афінність до зв'язування. Відоме застосування білка A *Staphylococcus aureus* як мітки афінності (Li та ін., *Mol. Biotech.*, 9, 1998, с. 187). В WO 97/47314 описане застосування бібліотеки з кількістю субстрату, що знижується, для виявлення специфічності до ферменту за допомогою комбіаторної бібліотеки, яку можна застосовувати як фагову дисплейну бібліотеку. Метод відбору ферментів, який можна застосовувати для презентації фага в детергентах, описаний в WO 97/09446. Інші методи відбору білків, що специфічно зв'язуються, описані в U.S. 5498538, 5432018 та WO 98/15833.

Методи створення пептидних бібліотек і скринінгу цих бібліотек описані також в U.S. 5723286,

5432018, 5580717, 5427908, 5498530, 5770434, 5734018, 5698426, 5763192 та 5723323.

В. ТАТ-зв'язуючі органічні молекули

ТАТ-зв'язуючі органічні молекули являють собою органічні молекули, відмінні від олігопептидів або антитіл, представлених у даному описі, які зв'язуються, переважно специфічно, з ТАТ-поліпептидами, представленими в даному описі. ТАТ-зв'язуючі органічні молекули можна ідентифікувати та хімічно синтезувати за допомогою відомих методів (див., наприклад, публікації РСТ WO 00/00823 та WO 00/39585). ТАТ-зв'язуючі органічні молекули, як правило, мають молекулярну масу менш ніж приблизно 2000 Да, в іншому варіанті менш ніж приблизно 1500, 750, 500, 250 або 200 Да, при цьому органічні молекули, які мають здатність до зв'язування, переважно специфічно, з ТАТ-поліпептидом, представленим в даному описі, можна ідентифікувати без зайвих експериментів з використанням добре відомих методів. У цьому зв'язку слід зазначити, що методи скринінгу бібліотек органічних молекул відносно молекул, які мають здатність до зв'язування з поліпептидом-мішенню, добре відомі в даній галузі (див., наприклад, публікації РСТ WO 00/00823 і WO 00/39585). ТАТ-зв'язуючі органічні молекули можуть являти собою, наприклад, альдегіди, кетони, оксими, гідразони, полукарбазони, карбазиди, первинні аміни, вторинні аміни, третинні аміни, N-заміщені гідразини, гідразиди, спирти, прості ефіри, тіоли, прості тіоефіри, дисульфіді, карбонові кислоти, складні ефіри, аміді, сечовини, карбамати, карбонати, кеталі, тіокеталі, ацеталі, тіоацеталі, арилгалогеніди, арилсульфонати, алкілгалогеніди, алкілсульфонати, ароматичні сполуки, гетероциклічні сполуки, аніліни, алкени, алкіни, діоли, аміноспирти, оксазолідини, оксазоліни, тіазолідини, тіазоліни, енаміни, сульфонаміди, епоксиди, азіридини, ізоціани, сульфонілхлориди, діазопохідні, хлорангідриди або т.п.

Г. Скринінг антитіл до ТАТ, ТАТ-зв'язуючих олігопептидів і ТАТ-зв'язуючих органічних молекул з необхідними властивостями

Методи одержання антитіл, олігопептидів і органічних молекул, які зв'язуються з ТАТ-поліпептидами, описані вище. Можна також при необхідності відбирати антитіла, олігопептиди або інші органічні молекули з певними біологічними характеристиками.

Рістінгуючу активність антитіла до ТАТ, олігопептиду або іншої органічної молекули, пропонованих у винаході, можна оцінювати за допомогою методів, відомих у даній галузі, наприклад, за допомогою клітин, які експресують ТАТ-поліпептид або ендogenous, або після трансфекції геном ТАТ. Наприклад, відповідні лінії пухлинних клітин і трансфектовані ТАТ клітини можна обробляти моноклональним антитілом до ТАТ, олігопептидом або іншою органічною молекулою, пропонованими у винаході, з використанням різних концентрацій протягом декількох днів (наприклад, 2-7) і забарвлювати кристалічним фіолетовим або МТТ (бромід 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію) або аналізувати за допомогою якого-небудь іншого колориметричного аналізу. Інший метод оцінки

проліферації можна здійснювати шляхом порівняння поглинання  $^3\text{H}$ -тимідину обробленими клітинами в присутності антитіла до ТАТ, олігопептиду або іншої органічної молекули, пропонованої у винаході, або без них. Після обробки антитілом клітини збирають і оцінюють кількість радіоактивної мітки, включеної в ДНК, за допомогою сцинтиляційного лічильника. Як прийнятний позитивний контроль використовують обробку відібраної клітинної лінії рістінгуючим антитілом, для якого відомо, що воно інгібує ріст цієї клітинної лінії. Інгібування росту пухлинних клітин *in vivo* можна визначати за допомогою різних методів, відомих у даній галузі. Переважно, пухлинна клітина являє собою клітину, яка надекспресує ТАТ-поліпептид. Переважно в одному з варіантів здійснення винаходу антитіло до ТАТ, ТАТ-зв'язуючий олігопептид або ТАТ-зв'язуюча органічна молекула повинні інгібувати проліферацію експресуючої ТАТ-пухлинної клітини *in vitro* або *in vivo* приблизно на 25-100% у порівнянні з необробленою пухлинною клітиною, більш переважно приблизно на 30-100% і ще більш переважно приблизно на 50-100% або 70-100%, при концентрації антитіла приблизно від 0,5 до 30мкг/мл. Інгібування росту можна оцінювати при концентрації антитіла приблизно від 0,5 до 30мкг/мл або приблизно від 0,5 до 200нМ у клітинній культурі, у якій інгібування росту визначають через 1-10 днів після обробки пухлинної клітини антитілом. Вважається, що антитіло має рістінгуючу активність *in vivo*, якщо введення антитіла до ТАТ з розрахунку від приблизно 1мкг/кг до приблизно 100мг/кг маси тіла приводить до зменшення розміру пухлини або зниженню проліферації пухлинних клітин протягом приблизно від 5 днів до 3 місяців після першого введення антитіла, переважно протягом приблизно 5-30 днів.

Для відбору антитіла до ТАТ, олігопептиду або іншої органічної молекули, які індукують загибель клітин, можна здійснювати оцінку втрати цілісності мембрани, наприклад за поглинанням йодиду пропідію (PI), трипанового синього або 7AAD у порівнянні з контролем. Аналіз поглинання PI можна здійснювати за відсутності комплементу та імунокомпетентних ефекторних клітин. Пухлинні клітини, які експресують ТАТ-поліпептид, інкубують або в середовищі без антитіла до ТАТ, олігопептиду або іншої органічної молекули, або в середовищі, що містить відповідні субстанції, наприклад, у концентрації приблизно 10мкг/мл. Клітини інкубують протягом 3 днів. Після кожної обробки клітини промивають і аліквоти вносять в 35-міліметрові пробірки розміром 12×75, закриті фільтром (1мл на пробірку, по 3 пробірки на кожну оброблювану групу), для видалення скупчень клітин. Потім у пробірки вносять PI (10мкг/мл). Зразки можна аналізувати за допомогою проточного цитометра типу FACSCAN™ і програмного забезпечення FACSCONVERT™ CellQuest (фірма Becton Dickinson). Як антитіла до ТАТ, олігопептидів або інших органічних молекул, які індукують загибель клітин, відбирають антитіла до ТАТ, олігопептиди або інші органічні молекули, які індукують статистично значимі рівні загибелі клітин при оцінці за ступенем поглинання PI.

Для відбору антитіл, олігопептидів або інших органічних молекул, що зв'язуються з епітопом на ТАТ-поліпептиді, що зчеплений з антитілом, що являє інтерес, можна здійснювати загальноприйнятий аналіз перехресного блокування, наприклад описаний в *Antibodies, A Laboratory Manual*, під ред. Harlow і David Lane, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Цей аналіз можна використовувати для визначення, чи зв'язується досліджуване антитіло, олігопептид або інша органічна молекула з тим же сайтом або епітопом, що й відоме антитіло до ТАТ. В альтернативному або додатковому варіанті можна здійснювати картирування епітопу з використанням методів, добре відомих у даній галузі. Наприклад, послідовність антитіла можна змінювати за допомогою мутагенезу, наприклад скануванням аланіну, для ідентифікації залишків, що примикають. Мутантне антитіло спочатку тестують щодо зв'язування з поліклональним антитілом для того, щоб гарантувати правильне укладання. Відповідно до іншого методу пептиди, що відповідають різним ділянкам ТАТ-поліпептиду, можна застосовувати для конкурентних аналізів з досліджуваними антитілами або з досліджуваним антитілом і антитілом з охарактеризованим або відомим епітопом.

Д. Антитілозалежна опосередковувана ферментом терапія з використанням проліків (ADEPT)

Антитіла, пропоновані в даному винаході, можна застосовувати також в ADEPT шляхом кон'югації антитіла із ферментом, що активує проліки - перетворює проліки (наприклад, пептидильний хіміотерапевтичний агент, див. WO 81/01145) на активний протираковий лікарський засіб (див., наприклад, WO 88/07378 і U.S. 4975278).

Компонент імунокон'югату, що являє собою фермент, який можна застосовувати в ADEPT, може включати будь-який фермент, що має здатність здійснювати такий вплив на проліки, у результаті якого вони перетворюються на більш активну цитотоксичну форму.

Ферменти, які можна застосовувати в способі, пропонованому в даному винаході, включають (але, не обмежуючись ними) лужну фосфатазу, яка може перетворювати проліки, що містять фосфат, на вільні лікарські субстанції; арилсульфатазу, яка може перетворювати проліки, що містять сульфат, на вільні лікарські субстанції; цитозиндеаміназу, що може перетворювати нетоксичний 5-фторцитозин на протиракову лікарську субстанцію 5-фторурацил; протеази, такі як протеїназа *Serratia marcescens*, термолізін, субтилізін, карбоксипептидази та катепсини (такі як катепсини В і L), які можна застосовувати для перетворення проліків, що містять пептид, на вільні лікарські субстанції; D-аланілкарбоксипептидази, які можуть перетворювати проліки, що містять D-амінокислотні замісники; ферменти, що розщеплюють вуглеводи, такі як  $\beta$ -галактозидаза та нейрамінідаза, які можна застосовувати для перетворення глікозилюваних проліків на вільні лікарські субстанції;  $\beta$ -лактамазу, яку можна застосовувати для перетворення проліків, дериватизованих  $\beta$ -лактамами, на вільні лікарські субстанції; і амідази пеніциліну, такі як амідаза пеніциліну V або аміда-

за пеніциліну G, які можна застосовувати для перетворення лікарських субстанцій, дериватизованих за азотами аміну феноксиацетилюючою або фенілацетилюючою групами відповідно, на вільні лікарські субстанції. В іншому варіанті можна застосовувати антитіла з ферментативною активністю, відомі в даній галузі також під назвою «абзими», для перетворення проліків, пропонованих у винаході, на вільні активні лікарські субстанції (див., наприклад, Massey, *Nature* 328, 1987, сс. 457-458). Кон'югати антитіло-абзим можна одержувати за допомогою пропонованого в даному винаході способу для введення абзиму в популяцію пухлинних клітин.

Ферменти, пропоновані в даному винаході, можна ковалентно зв'язувати з антитілом до ТАТ за допомогою методів, добре відомих у даній галузі, наприклад, заснованих на використанні гетеробіфункціональних крос-лінкерів, описаних вище. В іншому варіанті злиті білки, пропоновані у винаході, які містять принаймні антигензв'язуючий центр антитіла, зчеплений принаймні з функціональною ділянкою ферменту, пропонованого у винаході, можна конструювати з використанням методу рекомбінантної ДНК, добре відомого в даній галузі (див., наприклад, Neuberger та ін., *Nature* 312, 1984, сс. 604-608).

Е. Повнорозмірні ТАТ-поліпептиди

Даний винахід стосується також до вперше ідентифікованих і виділених нуклеотидних послідовностей, що кодують поліпептиди, які позначені в даному описі як ТАТ-поліпептиди. Зокрема, були ідентифіковані та виділені кДНК (укорочені або повнорозмірні), які кодують ТАТ-поліпептиди, як буде більш докладно описано нижче у прикладах.

Як описано нижче в прикладах, різні клони кДНК були депоновані в АТСС. Фактичні нуклеотидні послідовності цих клонів можуть легко визначити спеціалісти у даній галузі шляхом секвенування депонованих клонів за допомогою загальноприйнятих відомих у даній галузі методів. Передбачену амінокислотну послідовність легко можна визначити на основі нуклеотидної послідовності. При створенні винаходу в деяких випадках були ідентифіковані ТАТ-поліпептиди та нуклеїнові кислоти, які їх кодують, представлені в даному описі, рамки зчитування яких, ймовірно, найбільш легко ідентифікувати на основі доступної до даного часу інформації про послідовності.

Є. Варіанти антитіла до ТАТ і ТАТ-поліпептиду

Крім антитіл до ТАТ і повнорозмірних нативних послідовностей ТАТ-поліпептидів, представлених у даному описі, очевидно, що можна одержувати варіанти антитіла до ТАТ і ТАТ-поліпептиду. Варіанти антитіла до ТАТ і ТАТ-поліпептиду можна одержувати шляхом інтродукції відповідних нуклеотидних замін у кодуючій ДНК і/або шляхом синтезу необхідного антитіла або поліпептиду. Спеціалістам у даній галузі повинно бути очевидно, що амінокислотні заміни можуть змінювати посттрансляційні процеси антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду, такі як зміна кількості або положення сайтів глікозилювання або зміна характеристик спорідненості до мембрани.

Варіанти антитіл до ТАТ і ТАТ-поліпептидів, представлені в даному описі, можна одержувати, наприклад, за допомогою будь-якого методу та керівництв з консервативних і неконсервативних мутацій, викладених, наприклад, в U.S. 5364934. Варіації можуть являти собою заміну, делецію або інсерцію одного або декількох кодонів, що кодують антитіло або поліпептид, що приводить до заміни в амінокислотній послідовності в порівнянні з нативною послідовністю антитіла або поліпептиду. Необов'язково варіація являє собою заміну принаймні однієї амінокислоти на будь-яку іншу амінокислоту в одному або декількох доменах антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду. Для виявлення амінокислотного залишку, який можна вбудовувати, замінити або вилучати без негативного впливу на необхідну активність, можна керуватися порівнянням послідовності антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду з гомологічними відомими молекулами білків і мінімізувати кількість замін в амінокислотній послідовності в ділянках з високою гомологією. Амінокислотні заміни можуть приводити до заміни однієї амінокислоти іншою амінокислотою, що має аналогічні структурні і/або хімічні характеристики, такі як заміну лейцину на серин, тобто консервативні амінокислотні заміни. Вставки або делеції необов'язково можуть зачіпати приблизно від 1 до 5 амінокислот. Можливі варіації можна визначати шляхом систематичного створення інсерцій, делецій або замін амінокислот у послідовності та тестування активності варіантів, що утворилися, щодо активності повнорозмірної або зрілої нативної послідовності.

У даному описі представлені фрагменти антитіл до ТАТ і ТАТ-поліпептидів. Такі фрагменти можуть бути вкорочені на N-кінці або C-кінці або в них можуть бути відсутні внутрішні залишки, на-

приклад, при порівнянні з повнорозмірним нативним антитілом або білком. У деяких фрагментах відсутні амінокислотні залишки, які не мають вирішального значення для необхідної біологічної активності антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду.

Фрагменти антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду можна одержувати будь-яким з численних загальноприйнятих методів. Необхідні пептидні фрагменти можна синтезувати хімічно. Альтернативний підхід заснований на створенні фрагментів антитіла або поліпептидів шляхом ферментативного розщеплення, наприклад, шляхом обробки ферментом, для якого відомо, що він здатний розщеплювати білки в сайтах, обумовлених конкретними амінокислотними залишками, або шляхом розщеплення ДНК придатними рестриктазами та виділення необхідного фрагмента. Ще один прийнятний метод включає виділення й ампліфікацію ДНК-фрагмента, що кодує необхідний фрагмент антитіла або поліпептиду, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Олігонуклеотиди, що визначають необхідні кінці ДНК-фрагмента, застосовують як 5'- і 3'-праймери у ПЛР. Переважно фрагменти антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду мають принаймні один вид біологічної і/або імунологічної активності, характерної для нативного антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду, представлених у даному описі.

У конкретних варіантах здійснення винаходу консервативні заміни, що являють інтерес, представлені нижче в таблиці 6 за назвою «кращі заміни». Якщо такі заміни приводять до зміни біологічної активності, то можна робити більш істотні заміни, позначені як «Приклади замін» у таблиці 6, або інші заміни, описані нижче при посиланні на клас амінокислот, і потім продукти можна піддавати скринінгу.

Таблиця 6

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

Для досягнення істотних модифікацій функції або імунологічної ідентичності антитіла до ТАТ або

ТАТ-поліпептиду здійснюють вибір замін, які в значній мірі розрізняються за їх впливом на підтримку

(а) структури каркаса поліпептиду в ділянці заміни, наприклад, складчастої або спіральної конформації, (б) заряду або гідрофобності молекули в сайті-мішені або (в) розміру бічного ланцюга. Залишки, які зустрічаються в природних умовах, підрозділяють на групи на основі загальних властивостей бічних ланцюгів:

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

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

(3) кислоти: Asp, Glu;

(4) основні: Asn, Gin, His, Lys, Arg;

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

(6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміни передбачають заміну представника одного із цих класів на представника іншого класу. Такі застосовувані для заміни залишки можна інтродукувати у консервативні сайти заміні або більш переважно в сайти, що залишилися (не консервативні).

Для одержання варіацій можна використовувати відомі в даній галузі методи, такі як мутагенез із використанням олігонуклеотидів (сайтнаправлений), сканування аланіном і ПЦР-мутагенез. Сайтнаправлений мутагенез (Carter та ін., Nucl. Acids Res., 13, 1986, с. 4331; Zoller та ін., Nucl. Acids Res., 10, 1987, с. 6487), касетний мутагенез (Wells та ін., Gene, 34, 1985, с. 315), мутагенез шляхом рестрикційного відбору (Wells та ін., Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B, 317, 1986, с. 415) або мутагенез із використанням інших відомих методів, можна здійснювати на клоніваній ДНК із одержанням варіанта ДНК антитіла до TAT або TAT-поліпептиду.

Скануючий амінокислотний аналіз можна застосовувати для ідентифікації однієї або декількох амінокислот, розташованих по сусідству в послідовності. Кращими для сканування амінокислотами є відносно невеликі нейтральні амінокислоти. До таких амінокислот належать аланін, гліцин, серин і цистеїн. Із цієї групи, як правило, як амінокислоту для сканування використовують аланін, оскільки в ньому відсутні бічні ланцюги, розташовані за бета-вуглецем, і він з меншою ймовірністю змінює конформацію основного ланцюга варіанта (Cunningham та Wells, Science, 244, 1989, сс. 1081-1085). Аланін також є, як правило, кращим, оскільки він являє собою найпоширенішу амінокислоту. Крім того, він часто знаходиться як у занурених, так і виставлених назовні положеннях (Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150, 1976, с. 1). Якщо заміна на аланін не дозволяє одержувати адекватні кількості варіанта, то можна застосовувати ізотеричну амінокислоту.

Будь-який з залишків цистеїну, що не приймає участі у підтримці відповідної конформації антитіла до TAT або TAT-поліпептиду, можна замінити так само, як правило, на серин, з метою підвищення стійкості молекули до окиснення та попередження аномального перехресного зшивання. І навпаки, цистеїновий(і) зв'язок(и) можна вводити в антитіло до TAT або TAT-поліпептиду для підвищення його стабільності (особливо якщо антитіло

являє собою фрагмент антитіла, такий як Fv-фрагмент).

Особливо кращий тип варіантів на основі заміни являє собою заміну одного або декількох залишків гіперваріабельної ділянки батьківського антитіла (наприклад, гуманізованого або людського антитіла). Як правило, одержаний(і) у результаті варіант(и), відібраний(і) для подальшого вдосконалення, повинен(ні) мати поліпшені біологічні властивості щодо батьківського антитіла, з якого він(вони) одержаний(і). Прийнятний шлях одержання таких варіантів на основі заміни включає «дозрівання афінності» з використанням фагової презентації. У цілому, метод полягає у наступному: декілька сайтів гіперваріабельної ділянки (наприклад, 6-7 сайтів) піддають мутації, одержуючи всі можливі амінокислотні заміни в кожному сайті. Одержані в такий спосіб варіанти антитіла презентуються в одновалентній формі на поверхні частинок нитчастого фага у вигляді злиттів із продуктом гена III фага M13, що є присутнім у кожній частинці. Варіанти, які презентуються фагом, потім піддають скринінгу щодо їх біологічної активності (наприклад, афінності до зв'язування) відповідно до методик, наведених у даному описі. Для того, щоб виявляти перспективні з погляду модифікації сайти гіперваріабельної ділянки, можна здійснювати мутагенез на основі сканування аланіном з метою ідентифікації залишків гіперваріабельної ділянки, які найбільш важливі для зв'язування антигена. В альтернативному або додатковому варіанті може виявитися доцільним ідентифікувати кристалічну структуру комплексу антиген-антитіло з метою виявлення точок дотику між антитілом і людським TAT-поліпептидом. Такі залишки в точках дотику та сусідні залишки є кандидатами для заміни за допомогою способів, розроблених при створенні даного винаходу. Після одержання таких варіантів панель варіантів піддають скринінгу відповідно до представленого в даному описі способу, і антитіла з поліпшеними властивостями за даними одного або декількох відповідних аналізів відбирають для подальшої розробки.

Молекули нуклеїнових кислот, що кодують варіанти амінокислотної послідовності антитіла до TAT, одержують різними відомими в даній галузі методами. Ці методи включають (але, не обмежуючись ними) виділення із природного джерела (у випадку варіантів, що зустрічаються в природних умовах, амінокислотних послідовностей) або одержання за допомогою сайтнаправленого мутагенезу з використанням олігонуклеотидів (або сайтнаправленого мутагенезу), ПЦР-мутагенез і касетний мутагенез раніше одержаного варіанта або не включеної в зазначені варіанти версії антитіла до TAT.

Ж. Модифікації антитіл до TAT і TAT-поліпептидів

Ковалентні модифікації антитіл до TAT і TAT-поліпептидів підпадають під обсяг даного винаходу. Одним з типів ковалентної модифікації є взаємодія цільових амінокислотних залишків антитіла до TAT або TAT-поліпептиду з органічним дериватизувальним агентом, що має здатність взаємодіяти з вибраними бічними ланцюгами або з N-або C-



кінцевими залишками антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду. Дериватизацію за допомогою біфункціональних агентів застосовують, наприклад, для перехресного зшивання антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду з водонерозчинною підтримуючою матрицею або поверхнею для використання в методі очищення антитіл до ТАТ і навпаки. Загальноприйняті крос-лінкери являють собою, наприклад, 1,1-біс(діазаацетил)-2-фенілетан, глутаровий альдегід, складні N-гідроксисукцинімідні ефіри, наприклад, ефіри 4-азидосаліцилової кислоти, гомобіфункціональні складні імідоефіри, включаючи дисукцинімідолові ефіри, такі як 3,3'-дитіобіс(сукцинімідилпропіонат), біфункціональні малеїміди, такі як біс-N-малеїмідо-1,8-октан, і такі агенти, як метия-3-[(пара-азидофеніл)дитіо]пропіоїмідат.

Інші модифікації включають деамінування глутамінільних і аспарагінільних залишків з утворенням відповідних глутамільних і аспартильних залишків відповідно, гідроксилювання проліну та лізину, фосфорилування гідроксильних груп серильних або треонільних залишків, метилювання  $\alpha$ -аміногруп бічних ланцюгів лізину, аргініну та гістидину (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, вид-во W.H. Freeman & Co., San Francisco, сс. 79-86, 1983), ацетилювання N-кінцевого аміну та амідування будь-якої C-кінцевої карбоксильної групи.

Іншим типом ковалентної модифікації антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду, який підпадає під обсяг даного винаходу, є зміна нативної схеми глікозилювання антитіла або поліпептиду. У контексті даного опису під «змінюю нативної схеми глікозилювання» розуміють делецію одного або декількох вуглеводних фрагментів, що є присутніми у нативній послідовності антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду (або шляхом видалення низлежащого сайту глікозилювання, або шляхом делеції сайту глікозилювання хімічними і/або ферментативними шляхами), і/або додавання одного або декількох сайтів глікозилювання, які не присутні в нативній послідовності антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду. Крім того, під це поняття підпадають якісні заміни глікозилювання нативних білків, у тому числі зміна природи та пропорцій різних присутніх вуглеводних фрагментів.

Глікозилювання антитіл і інших поліпептидів звичайно відбувається за допомогою або N-зв'язування, або O-зв'язування. N-зв'язування передбачає приєднання вуглеводного фрагмента до бічного ланцюга залишку аспарагіну. Трипептидні послідовності аспарагін-X-серин і аспарагін-X-треонін, де X означає будь-яку амінокислоту крім проліну, являють собою розпізнавані послідовності, призначені для ферментативного приєднання вуглеводного фрагмента до бічного ланцюга залишку аспарагіну. Так, присутність будь-якої із цих трипептидних послідовностей у поліпептиді створює потенційний сайт глікозилювання. O-зв'язане глікозилювання передбачає приєднання одного із цукрів, таких як N-ацетилгалактозамін, галактоза або ксилоза, до гідроксіамінокислоти, найбільш часто до серину або треоніну, хоча можна засто-

совувати також 5-гідроксипролін або 5-гідроксилізін.

Введення додаткових сайтів глікозилювання в антитіло до ТАТ або ТАТ-поліпептид зручно здійснювати шляхом такої зміни амінокислотної послідовності, аби вона містила одну або декілька описаних вище трипептидних послідовностей (для сайту N-глікозилювання). Зміна може також являти собою додавання або заміну одного або декількох залишків серину або треоніну в послідовності вихідного антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду (для сайтів O-глікозилювання). Амінокислотну послідовність антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду необов'язково можна замінити шляхом зміни рівня ДНК, насамперед шляхом мутації ДНК, що кодує антитіло до ТАТ або ТАТ-поліпептид на попередньо вибраних основах, у результаті чого одержують кодони, після трансляції, яких повинні бути одержані необхідні амінокислоти.

Іншим шляхом збільшення кількості вуглеводних фрагментів на антитілі до ТАТ або ТАТ-поліпептиді є хімічне або ферментативне сполучення глікозидів з поліпептидом. Такі методи відомі в даній галузі, вони описані, наприклад, в WO 87/05330, опублікованій 11 вересня 1987 р., і в Aplin і Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1981, сс. 259-306.

Видалення вуглеводневих фрагментів, що є присутніми в антитілі до ТАТ або ТАТ-поліпептиді, можна здійснювати хімічно або ферментативно або шляхом заміни в результаті мутації кодонів, які кодують амінокислотні залишки, що служать як мішені для глікозилювання. Методи хімічного деглікозилювання відомі в даній галузі та описані, наприклад, в Hakimuddin, та ін., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259, 1987, с. 52 і в Edge та ін., *Anal. Biochem.*, 118, 1981, с. 131. Ферментативні відщеплення вуглеводневих фрагментів на поліпептидах можна здійснювати за допомогою ендо- і екзо-глікозидаз відповідно до методу, що описаний в Thotakura та ін., *Meth. Enzymol.*, 138, 1987, с. 350.

Інший тип ковалентної модифікації антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду включає зв'язування антитіла або поліпептиду з одним із численних небілкових полімерів, таких, наприклад, як поліетиленгліколь (ПЕГ), поліпропіленгліколь або поліоксіалкільни, за допомогою методів, описаних в U.S. 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 або 4179337. Антитіло або поліпептид можна також включати до мікрокапсули, наприклад, з використанням методів коацервації або міжфазової полімеризації (наприклад, у гідроксипропілметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули та полі(метилметакрилатні) мікрокапсули відповідно), у колоїдні системи введення лікарського засобу (наприклад, у ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки та нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методи описані в Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16-е вид, під ред. A. Osol, 1980.

Антитіло до ТАТ або ТАТ-поліпептид, пропоновані в даному винаході, можна модифікувати також з одержанням химерних молекул, які містять антитіло до ТАТ або ТАТ-поліпептид, злиті з іншою

гетерологічною поліпептидною або амінокислотою послідовністю.

В одному з варіантів здійснення винаходу така химерна молекула містить злиття антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду з поліпептидом-міткою, що несе епітоп, з яким антитіло до мітки може вибірково зв'язуватися. Епітоп-мітку, як правило, поміщають на аміно- або карбоксильний кінець антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду. Присутність таких форм із міченим епітопом антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду можна виявляти за допомогою антитіла до поліпептиду-мітки. Крім того, присутність епітопу-мітки дозволяє легко очищувати антитіло до ТАТ або ТАТ-поліпептид за допомогою афінної хроматографії з використанням антитіла до мітки або іншого типу афінної матриці, що зв'язується з епітопом-міткою. У даній галузі добре відомі різні поліпептиди-мітки та відповідні їм антитіла. Їх прикладами є полігістидинові (полі-his) або полігістидинові-гліцинові (полі-his-gly) мітки; поліпептид-мітка flu HA і його антитіло 12CA5 (Field та ін., *Mol. Cell. Biol.*, 8, 1988, сс. 2159-2165); с-тус-мітка та антитіло до неї 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 та 9E10 (Evan та ін., *Molecular and Cellular Biology*, 5, 1985, сс. 3610-3616); і глікопротеїн D (gD) вірусу простого герпесу та його антитіло (Paborsky та ін., *Protein Engineering*, 3(6), 1990, сс. 547-553). Інші поліпептиди-мітки являють собою Flag-пептид (Hopp та ін., *BioTechnology*, 6, 1988, сс. 1204-1210); пептидний епітоп KT3 (Martin та ін., *Science*, 255, 1992, сс. 192-194); пептидний епітоп  $\alpha$ -тубуліну (Skinner та ін., *J. Biol. Chem.*, 266, 1991, сс. 15163-15166); пептидна мітка на основі білка, що кодується геном 10 фара T7 (Lutz-Freyermuth та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, сс. 6393-6397).

В альтернативному варіанті здійснення винаходу химерна молекула може містити злиття антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду з імуноглобуліном або конкретно ділянкою імуноглобуліну. Для бівалентної форми химерної молекули (позначеної також як «імуноадгезин»), таке злиття може бути здійснене з Fc-ділянкою молекули IgG. Ig-злиття переважно включають заміну на розчинну (несучу делецію або інактивованій трансмембранний домен) форму антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду принаймні однієї варіабельної ділянки в молекулі Ig. У конкретному кращому варіанті здійснення винаходу злиття з імуноглобуліном включає шарніру ділянку, CH<sub>2</sub> і CH<sub>3</sub>, або шарнірну ділянку, CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> і CH<sub>3</sub>-ділянки молекули IgG1. Одержання злиттів з імуноглобуліном описані також в U.S. 5428130, що виданий 27 червня 1995 р.

3. Одержання антитіл до ТАТ та ТАТ-поліпептидів

Нижче описані основні шляхи одержання антитіл до ТАТ і ТАТ-поліпептидів шляхом культивування клітин, трансформованих або трансфектованих вектором, який містить нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло до ТАТ і ТАТ-поліпептид. Природно, для одержання антитіл до ТАТ і ТАТ-поліпептидів можна застосовувати інші методи, які добре відомі в даній галузі. Наприклад, відповідну амінокислотну послідовність або її фрагмент можна одержувати шляхом прямого пептидного синте-

зу за допомогою методів твердофазового синтезу (див., наприклад, Stewart, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 1963, сс. 2149-2154). Синтез білків *in vitro* можна здійснювати вручну або за допомогою автоматизованих методів. Автоматизований синтез можна здійснювати, наприклад, за допомогою синтезатора пептидів фірми Applied Biosystems (Фостер Сіті, шт. Каліфорнія), використовуючи інструкції виробника. Різні фрагменти антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду можна хімічно синтезувати окремо та поєднувати за допомогою хімічних або ферментативних методів з одержанням необхідного антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду.

1. Виділення ДНК, що кодує антитіло до ТАТ або ТАТ-поліпептид

ДНК, що кодує антитіло до ТАТ або ТАТ-поліпептид, можна одержувати з бібліотеки кДНК, створеної із тканин, які, як передбачається, несуть мРНК антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду, і в які рівень її експресії є таким, що виявляється. Таким чином, ДНК людського антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду зручно одержувати з бібліотеки кДНК, створеної з людської тканини. Ген, що кодує антитіло до ТАТ або ТАТ-поліпептид можна одержувати також з геномної бібліотеки або за допомогою відомих процесів синтезу (наприклад, за допомогою автоматизованого синтезу нуклеїнових кислот).

Бібліотеки можна піддавати скринінгу з використанням зондів (таких як олігонуклеотиди, що складаються принаймні приблизно з 20-80 основ), сконструйованих для ідентифікації гена, що являє інтерес, або білка, що ним кодується. Скринінг кДНК або геномної бібліотеки вибраним зондом можна здійснювати з використанням стандартних процедур, описаних в Sambrook та ін., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989. Альтернативні шляхи виділення гена, що кодує антитіло до ТАТ або ТАТ-поліпептид, засновані на застосуванні методу ПЛР (Sambrook та ін., вище; Dieffenbach та ін., *PCR Primer: A Laboratory Manual*, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995).

Методи скринінгу бібліотеки кДНК добре відомі в даній галузі. Олігонуклеотидні послідовності, вибрані як зонди, повинні бути достатньо довжини та у достатньому ступені однозначними, щоб мінімізувати помилкові положення. Олігонуклеотид переважно мітять так, щоб його можна було виявляти при гібридизації із ДНК у бібліотеці, що піддається скринінгу. Методи мічення добре відомі в даній галузі та передбачають застосування радіоактивних міток типу міченої за допомогою <sup>32</sup>P АТФ, біотинілювання або ферментативне мічення. Умови гібридизації, включаючи умови середньої строгості та строгі умови, описані в Sambrook та ін., вище.

Послідовності, ідентифіковані за допомогою таких методів скринінгу бібліотек, можна порівнювати та здійснювати їх порівняльний аналіз первинної структури з іншими відомими послідовностями, бази даних яких депоновані та доступні

громадськості, наприклад, депонованих в GenBank або інших приватних базах даних послідовностей. Ідентичність послідовностей (або на амінокислотному, або на нуклеотидному рівні) у визначених ділянках молекули або уздовж повнорозмірної послідовності можна визначати за допомогою методів, відомих у даній галузі та представлених у даному описі.

Нуклеїнову кислоту, що несе кодуєчу послідовність білка, можна одержувати шляхом скринінгу вибраних бібліотек кДНК або геномних бібліотек за допомогою виведеної амінокислотної послідовності, уперше описаної при створенні даного винаходу, і при необхідності за допомогою загальноприйнятих процедур праймерного подовження, описаних в Sambrook та ін., вище, для виявлення попередників і проміжних продуктів мРНК, які не можуть назад транскрибуватися в кДНК.

## 2. Селекція та трансформація клітин-хазяїнів

Клітини-хазяїни трансфектують або трансформують експресійними або клонуючими векторами, представленими в даному описі, з метою виробництва антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду та культивують у загальноприйнятих живильних середовищах модифікованих відповідним чином для індукції промоторів, відбору трансформантів або ампліфікації генів, що кодуєть необхідні послідовності. Умови культивування, такі як середовище, температура, рН і т.п., спеціаліст у даній галузі може вибирати без зайвих експериментів. У цілому, принципи, протоколи та практичні методи максимально можливого підвищення продуктивності клітинних культур описані в: *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, під ред. M. Butler, вид-во IRL Press, 1991 і в Sambrook та ін., вище.

Методи трансфекції еукаріотичних клітин і трансформації прокаріотичних клітин звичайно відомі спеціалісту в даній галузі, вони включають, наприклад, методи, засновані на застосуванні  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaPO}_4$ , опосередковувани ліпосомами методи та електропорацію. Залежно від застосовуваної клітини-хазяїна трансформацію здійснюють за допомогою стандартного методу, придатного для зазначених клітин. Для прокаріотичних клітин, як правило, застосовують обробку хлоридом кальцію, описану в Sambrook та ін., вище, або електропорацію. Зараження за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* застосовують для трансформації визначених рослинних клітин, відповідно до методу, описаного в Shaw та ін., *Gene*, 23, 1983, с. 315 і в WO 89/05859, що опублікована 29 червня 1989 р. Для клітин ссавців, у яких немає таких клітинних оболонок, можна застосовувати метод, заснований на осадженні фосфатом кальцію, описаний в Graham і van der Eb, *Virology*, 52, 1978, сс. 456-457. Загальні аспекти системи трансфекції клітин-хазяїнів з організму ссавців описані в U.S. 4399216. Трансформації дріжджів, як правило, здійснюють за допомогою методу Van Solingen та ін., *J. Bact.*, 130, 1977, с. 946 і Hsiao та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76, 1979, с. 3829. Однак можна застосовувати також інші методи інтродукції ДНК у клітину, такі як мікроін'єкції в ядро, електропорація, злиття бактеріального протопласту з інта-

ктною клітиною або застосування полікатіонів, наприклад, полібрени, поліорнітину. Різні методики трансформації клітин ссавців описані в Keown та ін., *Methods in Enzymology*, 185, 1990, сс. 527-537 і Mansour та ін., *Nature*, 336, 1988, сс. 348-352.

Відповідно до даного опису прийнятними клітинами-хазяїнами для клонування або експресії ДНК у векторах, є клітини прокаріот, дріжджів або вищих еукаріот. Прийнятними прокаріотами є (але, не обмежуючись ними) еукаріотичні бактерії (еубактерії), такі як грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад, род. *Enterobacteriaceae*, такі як *E. coli*. Наукової громадськості доступні різні штами *E. coli*, такі як штам *E. coli* K12 mM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); штам *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) і штам k5 772 (ATCC 53,635). Іншими прийнятними прокаріотичними клітинами-хазяїнами є клітини представників род. *Enterobacteriaceae*, такі як *Escherichia*, наприклад, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, наприклад, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, наприклад, *Serratia marcescans*, і *Shigella*, а також *Bacilli*, такі як *B. subtilis* і *B. licheniformis* (наприклад, штам *B. licheniformis* 41P, описаний в DD 266710, що опублікована 12 квітня 1989 р.), *Pseudomonas*, такі як *P. aeruginosa*, і *Streptomyces*. Ці приклади наведені як ілюстрація та не обмежують обсяг винаходу. Штам W3110 є одним з найбільш кращих як хазяїн або батько хазяїна, оскільки являє собою загальноприйнятий штам-хазяїн для ферментації рекомбінантних продуктів ДНК. Переважно клітина-хазяїн секретує мінімальні кількості протеолітичних ферментів. Наприклад, штам W3110 можна модифікувати, здійснюючи генетичну мутацію генів, що кодуєть ендегенні білки хазяїна, прикладами таких хазяїнів є штам *E. coli* W3110 1A2, що несе повний генотип *tonA*; штам *E. coli* W3110 9E4, що несе повний генотип *tonA ptr3*; штам *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55,244), що несе повний генотип *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan<sup>r</sup>*; штам *E. coli* W3110 37D6, що несе повний генотип *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan<sup>r</sup>*; штам *E. coli* W3110 40B4, що являє собою штам 37D6, з делеційною мутацією *degP*, не зумовлюючи стійкості до канаміцину; і штам *E. coli*, що несе мутантну периплазматичну протеїназу, що описаний в U.S. 4946783, що виданий 7 серпня 1990 р. В іншому варіанті можна застосовувати методи клонування *in vitro*, наприклад, з використанням ПЛР або інших полімеразних реакцій нуклеїнових кислот.

Повнорозмірне антитіло, фрагменти антитіла та злитих білків, які містять антитіло, можна одержувати в бактеріях, насамперед, коли наявність глікозилування та ефекторної функції, пов'язаної з Fc-ділянкою, не є обов'язковим, наприклад, коли антитіло, що має терапевтичну активність, кон'югують із цитотоксичним агентом (наприклад, токсином), і сам імунокон'югат має ефективність щодо деструкції пухлинної клітини. Повнорозмірне антитіло має більш тривалий час напівжиття в кровотоці. Одержання в *E. coli* є більш швидким і більш вигідним з погляду вартості. Методи експресії фрагментів антитіл і поліпептидів у бактеріях представлені, наприклад, в U.S. 5648237 (на ім'я

Carter та ін.), U.S. 5789199 (на ім'я Joly та ін.) і U.S. 5840523 (на ім'я Simmons та ін.), у яких описані ділянка ініціації трансляції (TIR) і сигнальні послідовності для оптимізації експресії та секреції, зазначені патенти включені в даний опис як посилання. Після експресії антитіло виділяють із клітинної маси *E. coli* у вигляді пасти в розчинній фракції, і її можна очищати, наприклад, на завантаженій протеїном А або G колонці залежно від ізотипу. Остаточне очищення можна здійснювати аналогічно процесу, пропонуваному для очищення антитіл, що експресуються, наприклад в СНО-клітинах.

Крім прокаріотичних організмів як хазяїнів для клонування або експресії векторів, які кодують антитіло до ТАТ або ТАТ-поліпептид, можна використовувати еукаріотичні мікроорганізми, такі як нитчасті гриби або дріжджі. Найбільш часто застосовуваним нижчим еукаріотичним мікроорганізмом-хазяїном є *Saccharomyces cerevisiae*. Інші види включають *Schizosaccharomyces pombe* (Beach і Nurse, Nature, 290, 1981, с. 140]; EP 139383, опублікований 2 травня 1985 р.); хазяїнів із роду *Kluyveromyces* (U.S. 4943529; Fleer та ін., Bio/Technology, 9, 1991, сс. 968-975), таких, наприклад, як *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt та ін., J. Bacteriol., 154(2), 1983, сс. 737-742), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906; Van den Berg та ін., Bio/Technology, 8, 1990, с. 135), *K. thermotolerans* і *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070; Sreekrishna та ін., J. Basic Microbiol., 28, 1988, сс. 265-278); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244234); *Neurospora crassa* (Case та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1979, сс. 5259-5263); *Schwanniomyces*, таких як *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394538, опублікований 31 жовтня 1990 р.); і нитчасті гриби, такі, наприклад, як *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357, опублікована 10 січня 1991 р.), і хазяїнів р. *Aspergillus*, таких як *A. nidulans* (Ballance та ін., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112, 1983, сс. 284-289; Tilburn та ін., Gene, 26, 1983, сс. 205-221; Yelton та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1984, сс. 1470-1474) і *A. niger* (Kelly і Hynes, EMBO J., 4, 1985, сс. 475-479). Можна застосовувати також метилотропні дріжджі, і вони включають (але, не обмежуючись ними) дріжджі, які можуть рости в присутності метанолу, вибрані з роду, що включає *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* і *Rhodotorula*. Перелік конкретних видів, що є прикладами представників цього класу дріжджів, представлений в С. Anthony, The Biochemistry of Methylophilic, 269, 1982).

Клітини-хазяїни, які можна використовувати для експресії глікозилізованого антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду, одержують із багатоклітинних організмів. Прикладами клітин безхребетних є клітини комах, такі як *Drosophila* S2 і *Spodoptera* Sf9, а також клітини рослин, такі як культури клітин бавовнику, кукурудзи, картоплі, сої, петунії, томатів і тютюну. Були виявлені численні бакуловірусні штами та їх варіанти та відповідні придатні для

них як хазяїни клітини комах, таких як *Spodoptera frugiperda* (гусениця), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодова муха) і *Bombyx mori* (шовковичний хробак). Широко відомі різноманітні штами вірусів, які можна використовувати для трансфекції, наприклад варіант L-1 *Autographa californica* NPV і штам *Bombyx mori* Bm-5 NPV, і такі віруси можна застосовувати відповідно до даного винаходу як віруси, насамперед для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*.

Однак найбільший інтерес являють клітини хребетних і в даний час розмноження клітин хребетних у культурі (культура тканини) стало стандартною процедурою. Прикладами придатних як хазяїни ліній клітин ссавців є лінія клітин нирки мавпи CV1, трансформована за допомогою OB40 (вакуолізуючий мавпячий вірус) (COS-7, ATCC CRL 1651); лінія клітин нирки ембріону людини (293 або клітини лінії 293, субклоновані з метою вирощування в суспензійній культурі, Graham та ін., J. Gen. Virol., 36, 1977, с. 59); клітини нирки дитинчати хом'ячка (BHK, ATCC CCL 10); клітини яєчника китайського хом'ячка/DHFR (CHO, Urlaub та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, с. 4216); клітини Сертолі миші (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23, 1980, сс. 243-251); клітини нирки мавпи (CV1, ATCC CCL 70); клітини нирки африканської зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1587); клітини карциноми шийки матки людини (HELA, ATCC CCL 2); клітини нирки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки бичачого щура (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клітини легень людини (W138, ATCC CCL 75); клітини печінки людини (Hep G2, HB 8065); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562, ATCC CCL51); клітини TRI (Mather та ін., Ann als N.Y. Acad. Sci., 383, 1982, сс. 44-68); клітини MRC 5; клітини FS4 і лінія клітин гепатоми людини (Hep G2).

Клітини-хазяїни трансформують за допомогою описаних вище експресійних або клонуючих векторів з метою виробництва антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду та культивують у придатних живильних середовищах відповідним чином модифікованих для індукції промоторів, відбору трансформантів або ампліфікації генів, які кодують необхідні послідовності.

3. Вибір і застосування здатного до реплікації вектора

Нуклеїнову кислоту (наприклад, кДНК або геномну ДНК), яка кодує антитіло до ТАТ або ТАТ-поліпептид, можна вбудовувати в здатний до реплікації вектор для клонування (ампліфікація ДНК) або для експресії. Науковій громадськості відомі численні вектори. Вектор може мати, наприклад, форму плазміди, косміди, вірусної частинки або фага. Відповідну нуклеотидну послідовність можна вбудовувати у вектор за допомогою різних процедур. В цілому, ДНК вбудовують у відповідний сайт(и), розпізнаваний(и) рестриктазами, за допомогою методів, відомих у даній галузі. Вектори звичайно містять (але, не обмежуючись ними) один або декілька з наступних компонентів: сигнальну послідовність, сайт ініціації реплікації, один або декілька маркерних генів, енхансер, промотор і термінатор транскрипції. Для конструювання при-

йнятих векторів, які містять один або декілька зазначених компонентів, застосовують стандартні методи вбудовування шляхом лігування, які добре відомі спеціалістам у даній галузі.

TAT можна одержувати за допомогою рекомбінації не тільки індивідуально, але також у вигляді поліпептиду, злитого з гетерологічним поліпептидом, який переважно являє собою сигнальну послідовність або інший поліпептид, який несе специфічний сайт розщеплення на N-кінці зрілого білка або поліпептиду. В цілому, сигнальна послідовність може являти собою компонент вектора або може являти собою ДНК-фрагмент, який кодує антитіло до TAT або TAT-поліпептид, який вбудований у вектор. Сигнальна послідовність може являти собою сигнальну послідовність прокариотичного організму, вибрану, наприклад, із групи, яка включає лідерні послідовності лужної фосфатази, пеніцилінази, Ipp або термостабільного ентеротоксину II. Для секреції із дріжджів сигнальна послідовність може являти собою, наприклад, лідерну послідовність інвертази дріжджів, лідерну послідовність  $\alpha$ -фактора (включаючи лідерні послідовності  $\alpha$ -фактора *Saccharomyces* і *Kluveromyces*, останній описаний в U.S. 5010182), або лідерну послідовність лужної фосфатази, лідерну послідовність глюкоамілази *C. albicans* (EP 362179, опублікована 4 квітня 1990 р.) або сигнальну послідовність, описану в WO 90/13646, що опублікована 15 листопада 1990 р. Для експресії в клітинах ссавців можна застосовувати сигнальні послідовності ссавців для безпосередньої секреції білка, такі як сигнальні послідовності секретуючих поліпептидів цього ж виду або споріднених видів, а також вірусні секреторні лідерні послідовності.

Як експресійні, так і клонуючі вектори містять нуклеотидну послідовність, яка дозволяє вектору реплікуватися в одній або декількох вибраних клітинах-хазяїнах. Такі послідовності добре відомі для різних бактерій, дріжджів і вірусів. Сайт ініціації реплікації із плазмиди pBR322 придатний для більшості грамнегативних бактерій, сайт ініціації плазмиди 2 $\mu$  придатний для дріжджів, а різні вірусні сайти ініціації (OB40, вірусу поліоми, аденовірусу, VSV (вірус везикулярного стоматиту) або BPV (вірус папіломи великої рогатої худоби)) придатні для клонуючих векторів у клітинах ссавців.

Експресійні та клонуючі вектори, як правило, можуть містити селекуючий ген, також позначуваний як селектуємий маркер. Як правило, селекуючі гени кодують білки, які (а) обумовлюють стійкість до антибіотиків або інших токсинів, таким як ампіцилін, неоміцин, метотрексат або тетрациклін, (б) доповнюють дефіцит аутокотрофності або (в) поповнюють живильні речовини що мають вирішальне значення, які не надходять із комплексних середовищ, наприклад ген, що кодує D-аланінрацемазу для *Bacilli*.

Прикладами інших прийнятних селектуємих маркерів для клітин ссавців є маркери, які дозволяють ідентифікувати клітини, що мають здатність поглинати нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло до TAT або TAT-поліпептид, такі як DHFR (дигідрофолатредуктаза) або тимідинкіназа. Принятною клітиною-хазяїном при застосуванні DHFR

дикого типу є лінія CHO-клітин з дефіцитом активності DHFR, одержання та розмноження якої описано в Urlaub та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, с. 4216. Прийнятний для застосування в дріжджах селекуючий ген являє собою ген *trp1*, що є присутнім в одержаній із дріжджів плазмиді YRp7 (Stinchcomb та ін., Nature, 282, 1979, с. 39; Kingsman та ін., Gene, 7, 1979, с. 141; Tschemper та ін., Gene, 10, 1980, с.157). Ген *trp1* є селекуючим маркером для мутантного штаму дріжджів, позбавленого здатності рости в середовищі з додаванням триптофану, наприклад штаму ATCC 44076 або PEP4-1 (Jones, Genetics, 85, 1977, с. 12).

Експресійні та клонуючі вектори, як правило, містять промотор, що функціонально зв'язаний з нуклеїновою кислотою, яка кодує антитіло до TAT і TAT-поліпептид, для безпосереднього синтезу мРНК. Промотори, розпізнавані різними потенційними клітинами-хазяїнами, добре відомі. Промотори, які придатні для застосування в прокариотичних клітинах-хазяїнах, являють собою промоторні системи  $\beta$ -лактамази та лактози (Chang та ін., Nature, 275, 1978, с. 615; Goeddel та ін., Nature, 281, 1979, с. 544), промоторні системи лужної фосфатази, триптофану (*trp*) (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8, 1980, с. 4057); EP 36776), і гібридні промотори, такі як промотор *tac* (deBoer та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1983, сс. 21-25). Промотори, призначені для застосування в бактеріальних системах, містять також послідовність Шайна-Дальгарно (S.D.), функціонально зв'язану із ДНК, що кодує антитіло до TAT або TAT-поліпептид.

Приклади промоторних послідовностей, які можна застосовувати в дріжджових клітинах-хазяїнах, включають промотори 3-фосфогліцераткінази (Hitzeman та ін., J. Biol. Chem., 255, 1980, с. 2073) або інших гліколітичних ферментів (Hess та ін., J. Adv. Enzyme Reg., 7, 1968, с. 149; Holland, Biochemistry, 17, 1978, с. 4900), таких як ендолаза, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, гексокіназа, піруватдекарбоксилаза, фосфофруктокіназа, глюкозо-6-фосфатізомераза, 3-фосфогліцератмутаза, піруваткіназа, триозофосфатізомераза, фосфоглюкозоізомераза та глюкостілаза.

Інші промотори дріжджів, які являють собою індукційні промотори, що мають додаткову перевагу, пов'язану із транскрипцією, що контролюється умовами росту, є промоторні ділянки алкогольдегідрогенази 2, ізоцитохрому C, кислоти фосфатази, розщеплюючих ферментів, пов'язаних з метаболізмом азоту, металтіонеїну, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази та ферментів, відповідальних за утилізацію мальтози та галактози. Крім того, прийнятні вектори та промотори, які можна застосовувати при експресії в дріжджах, описані в EP 73657.

Транскрипцію антитіла до TAT або TAT-поліпептиду з векторів у клітинах ссавців-хазяїнах контролюють, наприклад за допомогою промоторів, одержаних з геномів вірусів, таких як вірус поліоми, вірус віспи птахів (UK 2211504, опублікований 5 липня 1989 р.), аденовірус (такий як аденовірус 2), вірус папіломи великої рогатої худоби,

вірус саркоми птахів, цитомегаловірус, ретровірус, вірус гепатиту В та найбільш краще, мавпячий вірус 40 (ОВ40), з гетерологічних промоторів ссавців, наприклад промотору актину або промотору імуноглобуліну, і із промоторів теплового шоку за умови, що такі промотори сумісні із системами клітини-хазяїна.

Транскрипцію ДНК, що кодує антитіло до ТАТ або ТАТ-поліпептид, у вищих еукаріотичних організмах часто підвищують шляхом вбудовування у вектор енхансерної послідовності. Енхансери, являють собою діючі в цис-напрямку елементи ДНК, які, як правило, що складаються приблизно з 10-300 пар основ, які впливають на промотор, підсилюючи його транскрипцію.

Відомі численні енхансерні послідовності генів ссавців (генів глобіну, еластази, альбуміну,  $\alpha$ -фетопротеїну та інсуліну). Однак, як правило, застосовують енхансер вірусу еукаріотичної клітини. Прикладами є енхансер ОВ40, розташований на віддаленому боці сайту ініціації реплікації (пари основ 100-270), енхансер раннього промотору цитомегаловірусу, енхансер поліоми, розташований на віддаленому боці сайту ініціації реплікації, і енхансери аденовірусів. Енхансер можна вбудовувати шляхом сплайсингу у вектор в 5'- або 3'-положення відносно кодуєчої послідовності антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду, але переважно його поміщають у сайт, розташований у 5'-напрямку відносно промотору.

Експресійні вектори, використовувані в еукаріотичних клітинах-хазяїнах (клітини дріжджів, грибів, комах, рослин, тварин, людей або клітини інших багатоклітинних організмів, що містять ядро), повинні містити також послідовності, необхідні для термінації транскрипції та стабілізації мРНК. Такі послідовності звичайно одержують із 5'- та іноді з 3'-нетрансльованих ділянок еукаріотичних або вірусних ДНК або кДНК. Ці ділянки містять нуклеотидні сегменти, транскрибовані у вигляді поліаденильованих фрагментів у нетрансльованій ділянці мРНК, що кодує антитіло до ТАТ або ТАТ-поліпептид.

Інші методи, вектори та клітини-хазяїни, які можна адаптувати для синтезу антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду в рекомбінантній культурі клітин хребетних, описані в Gething та ін., *Nature*, 293, 1981, сс. 620-625; Mantei та ін., *Nature*, 281, 1979, сс. 40-46; EP 117060; та EP 117058.

#### 4. Культивування клітин-хазяїнів

Клітини-хазяїни, використовувані для одержання антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду, пропонуваного в даному винаході, можна культивувати в різних середовищах. Для культивування клітин-хазяїнів можна використовувати наявні у продажу середовища, такі як середовище Хама F10 (фірма Sigma), мінімальне підтримуюче середовище (MEM, фірма Sigma), RPMI-1640 (фірма Sigma) і модифіковане способом Дульбекко середовище Ігла (DMEM, фірма Sigma). Крім того, як середовище для культивування клітин-хазяїнів можна використовувати будь-які із середовищ, які описані в Ham та ін., *Meth. Enz.*, 58, 1979, с. 44; Barnes та ін., *Anal. Biochem.*, 102, 1980, с. 255; в U.S. 4767704, 4657866, 4927762, 4560655 або

5122468; в WO 90/03430, WO 87/00195; або в U.S. Re. 30985. Кожне із цих середовищ при необхідності можна доповнювати гормонами і/або іншими факторами росту (такими як інсулін, трансферин або епідермальний фактор росту), солями (такими як хлорид і фосфат натрію, кальцію, магнію), буферами (такими як HEPES), нуклеотидами (такими як аденозин і тимідин), антибіотиками (такими як лікарський засіб гентаміцин (GENTAMYCIN<sup>TM</sup>)), мікроелементами (тобто неорганічними сполуками, які звичайно присутні в концентратах, що знаходяться у мікромолярному діапазоні) і глюкозою або еквівалентним джерелом енергії. Спеціалісту в даній галузі повинне бути очевидно, що можна включати також будь-які інші необхідні добавки у відповідних концентраціях. Умови культивування, такі як температура, значення pH і т.п., являють собою умови, які використалися раніше для клітин-хазяїнів, відібраних для експресії, і вони повинні бути очевидні спеціалісту в даній галузі.

#### 5. Виявлення ампліфікації/експресії гену

Ампліфікацію і/або експресію гена можна оцінювати безпосередньо у зразку, наприклад, за допомогою загальноприйнятих методів Саузерн-блотингу, Нозерн-блотингу для кількісної оцінки транскрипції мРНК (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1980, сс. 5201-5205), дот-блотингу (аналіз ДНК), або гібридизації *in situ* з використанням відповідного міченого зонда, на основі наведених у даному описі даних про послідовності. В інших варіантах можна застосовувати антитіла, які можуть розпізнавати специфічні дуплекси, включаючи ДНК-дуплекси, РНК-дуплекси та дуплекси гібридів ДНК-РНК або дуплекси ДНК-білок. Антитіла, у свою чергу, можна мітити та можна здійснювати аналіз, у якому дуплекс зв'язаний з поверхнею, при цьому після утворення дуплекса з поверхнею можна виявляти присутність антитіла, зв'язаного з дуплексом.

В іншому варіанті експресію гена можна оцінювати імунологічними методами, такими як імуногістохімічне забарвлення клітин або зрізів тканин, і аналіз клітинної культури або загальної води організму для безпосередньої кількісної оцінки експресії генного продукту. Антитіла, які можна застосовувати для імуногістохімічного забарвлення і/або аналізу зразка рідин, можуть являти собою моноклональні або поліклональні антитіла і їх можна одержувати в організмі будь-якого ссавця. Зручно також одержувати антитіла до нативної послідовності ТАТ-поліпептиду або до синтетичного пептиду, заснованому на представлених у даному описі даних про послідовності ДНК, або до екзогенної послідовності, що злита із ДНК ТАТ, та кодує специфічний епітоп антитіла.

#### 6. Очищення антитіла до ТАТ і ТАТ-поліпептиду

З культурального середовища або з лізатів клітини-хазяїна можна виділяти різні форми антитіл до ТАТ і ТАТ-поліпептидів. Якщо вони є зв'язаними з мембраною, то їх можна виділяти з мембрани за допомогою розчину прийнятого детергенту (наприклад, Тритон-Х 100), або шляхом ферментативного розщеплення. Клітини, застосовувані для експресії антитіла до ТАТ і ТАТ-

поліпептиду, можна руйнувати різними фізичними або хімічними методами, такими як цикли заморожування-відтавання, опромінення ультразвуком, механічне руйнування або застосування агентів, які лізують клітину.

Може виявитися необхідним очищувати антитіло до ТАТ і ТАТ-поліпептид від рекомбінантних клітинних білків або поліпептидів. Прикладами придатних методів очищення можуть бути наступні процедури: фракціонування на іонообмінній колонці; осадження етанолом; ВЕРХ з оберненою фазою; хроматографія на силікагелі або на катіонообмінній смолі, такий як ДЕАЕ ((діетиламіно)етилцелюлоза); хроматофокусування; ДСН-ПААГ; осадження сульфатом амонію; гель-фільтрація з використанням, наприклад, Sephadex G-75; використання протеїн А-сефарозних колонок для видалення таких забруднювачів, як IgG; і метал-хелатуючих колонок для зв'язування форм антитіла до ТАТ і ТАТ-поліпептиду з міченими епітопами. Можна застосовувати різні методи очищення білків, і такі методи відомі в даній галузі й описані, наприклад, в Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182, 1990; Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York, 1982. Вибрана(и) стадія(ї) очищення повинна(и), наприклад, залежати від природи застосовуваного процесу одержання та конкретного одержуваного антитіла до ТАТ або ТАТ-поліпептиду.

При використанні методів рекомбінації антитіло може продукуватися усередині клітини, у периплазматичному просторі або безпосередньо виділятися в середовище. Якщо антитіло продукується усередині клітини, то на першій стадії видаляють, наприклад, за допомогою центрифугування або ультрафільтрації дебрис, що складається з окремих частинок, або із клітин-хазяїнів, або з лізованих фрагментів. У Carter та ін., *Bio/Technology*, 10, 1992, сс. 163-167 описаний метод виділення антитіла, які секретуються у периплазматичний простір *E. coli*. У цілому, метод полягає у наступному: клітинну масу у вигляді пасти піддають відтаванню приблизно протягом 30 хв. у присутності ацетату натрію (рН 3,5), ЕДТК і фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ). Клітинний дебрис можна видаляти центрифугуванням. Якщо антитіло секретується в середовище, супернатанти таких експресійних систем, як правило, спочатку концентрують за допомогою наявного у продажу фільтра для концентрування білків, наприклад пристрою для ультрафільтрації типу Amicon або Millipore Pellicon. На кожній з попередніх стадій для інгібування протеолізу можна додавати інгібітор протеази, такий як ФМСФ, а для попередження збільшення небажаних домішок можна додавати антибіотики.

Композицію антитіла, одержану із клітин, можна очищати, наприклад, хроматографією на гідроксилапатиті, гель-електрофорезом, діалізом і афінною хроматографією, при цьому кращим методом очищення є афінна хроматографія. Можливість застосування протеїну А як афінного ліганду залежить від виду та ізотипу будь-якої Fc-ділянки імуноглобуліну, що присутня в антитілі. Протеїн А можна використовувати для очищення антитіла,

основою яких є людські важкі  $\gamma 1$ -,  $\gamma 2$ - або  $\gamma 4$ -ланцюги (Lindmark та ін., *J. Immunol. Meth.*, 62, 1983, сс. 1-13). Протеїн G рекомендується для застосування для всіх мишачих ізотипів і для людського  $\gamma 3$ -ланцюга (Guss та ін., *EMBO J.*, 5, 1986, сс. 1567-1575). Як матрицю, з якої зв'язується афінний ліганд, найбільш часто застосовують агарозу, однак можна використовувати й інші матриці. Стійкі до механічних впливів матриці, такі як скло або полі(стиролдивініл)бензол з визначеним розміром пор, дозволяють досягати більш високих швидкостей потоку та більш короткого часу процесу в порівнянні з характеристиками, що досягають при використанні агарози. Якщо антитіло містить C<sub>H</sub>3-домен, то для очищення можна використовувати смолу типу Bakerbond ABX™ (фірма J.T. Baker, Філіпсбург, шт. Нью-Джерсі). Залежно від антитіла, що підлягає виділенню, можна застосовувати також інші методи очищення білка, такі як фракціонування на іонообмінній колонці, осадження етанолом, ВЕРХ з оберненою фазою, хроматографія на силікагелі, хроматографія на гепарині-SEPHAROSE™, хроматографії на аніоно- або катіонообмінній смолі (наприклад на колонці з поліаспартамовою кислотою), хроматофокусування, ДСН-ПААГ і осадження сульфатом амонію.

Після кожної з попередніх стадій очищення суміш, що містить антитіло, яке являє інтерес, і домішки, можна піддавати хроматографії, заснованій на гідрофобній взаємодії, при низькому значенні рН із використанням буфера для елюції, що має значення рН приблизно від 2,5 до 4,5, хроматографію переважно здійснюють при низьких концентраціях солей (наприклад, з використанням приблизно 0-0,25M солей).

#### И. Фармацевтичні композиції

Терапевтичні композиції антитіл до ТАТ, ТАТ-зв'язуючих олігопептидів, ТАТ-зв'язуючих органічних молекул і/або ТАТ-поліпептидів, пропонувані у даному винаході, приготують із метою їх зберігання шляхом змішання антитіла, поліпептиду, олігопептиду або органічної молекули, які мають необхідний ступінь чистоти, з необов'язковими загальноприйнятими фармацевтично прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами (Remington's *Pharmaceutical Sciences*, під ред. А. Osol, 1980) у формі ліофілізованих композицій або водних розчинів. Прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори повинні бути нетоксичними для реципієнтів у використовуваних дозах і концентраціях, вони включають буфери, такі як ацетатний, Трис-, фосфатний, цитратний буфери, а також буфери на основі інших органічних кислот; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту та метіонін; консерванти (такі як хлорид октадецилдиметил бензил амонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію; хлорид бензетонію; фенол; бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол і метил-крезол); поліпептиди з низькою молекулярною масою (що містять менше приблизно 10 залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспара-

гін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, такі як ЕДТК; агенти, що змінюють тоничність, такі як трегалоза та хлорид натрію, цукри, такі як цукороза, маніт, трегалоза або сорбіт; поверхнево-активну речовину, таку як полісорбат; солеутворюючі протіони, такі як натрій; комплекси, що містять метал (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі як T WEEN®, PLURONICS® або поліетиленгліколь (ПЕГ). Антитіло переважно входить до складу композиції в концентрації 5-200мг/мл, переважно 10-100мг/мл.

Композиції, пропонувані у винаході, можуть містити також більше однієї діючої речовини, якщо це необхідно для конкретного підлягаючого лікуванню показання, переважно речовини з додатковими видами активності, які негативно не впливають одна на одну. Наприклад, крім антитіла до ТАТ, ТАТ-зв'язуючого олігопептиду або ТАТ-зв'язуючої органічної молекули, може виявитися бажаним включати до однієї композиції додаткове антитіло, наприклад, друге антитіло до ТАТ, що зв'язується з іншим епітопом на ТАТ-поліпептиді, або антитіло до якої-небудь іншої мішені, такої як фактор росту, що впливає на конкретну форму раку. В іншому або додатковому варіанті композиція може містити також хіміотерапевтичний агент, цитотоксичний агент, цитокін, агент, що інгібує ріст, протигормональний агент і/або кардіозахисний агент. Такі молекули повинні бути присутніми у комбінації в кількостях, ефективних для вирішення поставленої задачі.

Діючі речовини можна включати також у мікрокапсули, наприклад, за допомогою методів коацервації або міжфазової полімеризації, наприклад у гідроксипропілметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули та полі(метилметакрилатні) мікрокапсули відповідно, у колоїдні системи введення лікарського засобу (наприклад у ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемulsії, наночастинки та нанокapсули) або в макроемulsії. Такі методи описані в Remington's Pharmaceutical Sciences, під ред. А. Osol, 1980.

Можна приготувати композиції із пролонгованим вивільненням. Прийнятні приклади композицій із пролонгованим вивільненням, які можна застосовувати відповідно до винаходу, включають напівпроникні матриці із твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло, при цьому матриці можуть являти собою продукт, що має певну форму, наприклад, плівки або мікрокапсули. Приклади матриць, які можна використовувати для пролонгованого вивільнення, включають поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксietилметакрилат) або полівініловий спирт), полілактиди (U.S. 3773919), співполімери L-глутамінової кислоти та γ-етил-L-глутамату, співполімери етилену та вінілацетату, що нерозкладаються, співполімери молочної кислоти та гліколевої кислоти, що розкладаються, такі як LUPRON DEPOT® (призначені для ін'єкції мікросфери, що складаються із співполімеру молочної кислоти та гліколевої кислоти та ацетату леупроліду), і полі-D(-)-3-гідроксимасляну кислоту.

Композиції, призначені для застосування *in vivo*, повинні бути стерильними. Це легко може бути досягнуто шляхом фільтрації через стерильні фільтруючі мембрани.

I. Діагностика та лікування з використанням антитіл до ТАТ, ТАТ-зв'язуючих олігопептидів і ТАТ-зв'язуючих органічних молекул

Для визначення рівня експресії ТАТ у раковій пухлині можна використовувати різні діагностичні аналізи. В одному з варіантів здійснення винаходу надекспресію ТАТ-поліпептиду можна аналізувати імуногістохімічно (ІГХ). Залиті в парафін зрізи тканини, одержані в результаті біопсії пухлини, можна піддавати ІГХ і оцінювати інтенсивність забарвлення білка ТАТ відповідно до наступної шкали:

бал 0 - забарвлення не виявлене або виявлене забарвлення мембрани в менш ніж 10% пухлинних клітин;

бал 1+ - слабке/злегка помітне забарвлення мембран виявлене більш ніж в 10% пухлинних клітин. У клітинах забарвлена тільки частина мембран;

бал 2+ - повне забарвлення мембран від слабкої до середнього ступеня виявлено більш ніж в 10% пухлинних клітин;

бал 3+ - повне забарвлення мембран від середньої до сильного ступеня виявлено більш ніж в 10% пухлинних клітин.

Вважається, що якщо бал, що характеризує експресію ТАТ-поліпептиду в пухлині, становить 0 або 1+, то пухлина не надекспресує ТАТ, а якщо бал становить 2+ або 3+, то пухлина можна віднести до пухлин, що надекспресують ТАТ.

В іншому або додатковому варіанті можна здійснювати FISH-аналізи, наприклад, за допомогою INFORM® (набір, що постачається фірмою Ventana, шт. Арізона) або PATHVISION® (фірми Vysis, шт. Іллінойс) з використанням фіксованих у формаліні залитих у парафін пухлинних тканин для визначення ступеня (якщо він наявний) надекспресії ТАТ у пухлині.

Надекспресію або ампліфікацію ТАТ можна оцінювати за допомогою діагностики *in vivo*, наприклад, шляхом введення молекули (такої як антитіло, олігопептид або органічна молекула), яка зв'язується з молекулою, яку можна виявляти, і за допомогою введення мітки, що виявляється (наприклад, радіоактивного ізотопу або флуоресцентної мітки) і зовнішнього сканування пацієнта з метою виявлення локалізації мітки.

Як зазначено вище, антитіла до ТАТ, олігопептиди та органічні молекули, пропонувані у винаході, мають різне не терапевтичне застосування. Антитіла до ТАТ, олігопептиди та органічні молекули, пропонувані в даному винаході, можна застосовувати для діагностики та визначення стадії раку, що характеризується експресією ТАТ-поліпептиду (наприклад, за допомогою рентгенографії). Антитіла, олігопептиди та органічні молекули можна застосовувати також для очищення або імунопреципітації ТАТ-поліпептиду із клітин, для виявлення та кількісної оцінки ТАТ-поліпептиду *in vitro*, наприклад, за допомогою ELISA або Вестерн-блотингу, для знищення й елімінації ТАТ-



експресуючих клітин з популяції змішаних клітин як стадія очищення інших клітин.

У наш час залежно від стадії раку лікування раку включає один з наступних шляхів лікування або їх комбінацію: хірургічне втручання для видалення ракової тканини, променева терапія та хіміотерапія. Терапія з використанням антитіла до ТАТ, олігопептиду або органічної молекули може виявитися найбільш бажаною для старих пацієнтів, які не можуть добре переносити токсичність і побічні дії хіміотерапії, і при метастатичному захворюванні, коли променева терапія має обмежену ефективність. Призначені для напрямленого переносу в пухлину антитіла до ТАТ, олігопептиди та органічні молекули, пропонувані у винаході, можна застосовувати для полегшення раку, що характеризується експресією ТАТ, при первинному діагнозі захворювання або на стадії рецидиву. Для терапевтичного застосування антитіла до ТАТ, олігопептид або органічну молекулу можна застосовувати індивідуально або в сполученні, наприклад, з гормонами, антиангіогенними або радіоактивно міченими сполуками, у сполученні з хірургічним втручанням, кріотерапією і/або променевою терапією. Лікування з використанням антитіла до ТАТ, олігопептиду або органічної молекули можна застосовувати в сполученні з іншими формами загальноприйнятої терапії, або одночасно, або до або після загальноприйнятої терапії. Для лікування раку застосовують такі хіміотерапевтичні лікарські засоби як TAXOTERE® (доцетаксел), TAXOL® (паклітаксел), естрамустин і мітоксантрон, зокрема з невисоким ризиком для пацієнтів. Відповідно до пропонованого у винаході способу лікування або полегшення раку страждаючому на рак пацієнту можна вводити антитіло до ТАТ, олігопептид або органічну молекулу в сполученні з лікуванням з використанням одного або декількох наведених вище хіміотерапевтичних агентів. Зокрема, описана комбінована терапія паклітакселом і модифікованими похідними (див., наприклад, EP 0600517). Антитіло до ТАТ, олігопептид або органічну молекулу можна вводити в сполученні з хіміотерапевтичним агентом, узятим у терапевтичній ефективній дозі. В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло до ТАТ, олігопептид або органічну молекулу застосовують у сполученні з хіміотерапією для підвищення активності й ефективності хіміотерапевтичного агента, наприклад, паклітакселу. У настільному довіднику лікаря (PDR) наведені дози агентів, які можна застосовувати для лікування різних видів раку. Схема прийому та дози вищевказаних хіміотерапевтичних лікарських засобів, які є терапевтично ефективними, повинні залежати від конкретного підлягаючого лікуванню раку, стадії захворювання й інших факторів, відомих лікарю, і їх може визначити практикуючий спеціаліст у даній галузі.

В одному з варіантів здійснення винаходу пацієнту вводять кон'югат, що містить антитіло до ТАТ, олігопептид або органічну молекулу, кон'юговану із цитотоксичним агентом. Переважно імункон'югат, зв'язаний з білком ТАТ, інтерналізується клітиною, яка приводить до підвищення терапевтичної ефективності імункон'югату відносно зни-

щення ракової клітини, з якою він зв'язується. У кращому варіанті здійснення винаходу мішенню цитотоксичного агента є нуклеїнова кислота у раковій клітині, або він взаємодіє з нею. Прикладами таких цитотоксичних агентів є описані вище сполуки, і вони включають майтансиноїди, каліхеаміцини, рибонуклеази та ДНК-ендонуклеази.

Кон'югати антитіла до ТАТ, олігопептидів, органічних молекул або токсинів вводять хворій людині за допомогою відомих методів, наприклад, таких як внутрішньовенне введення, наприклад, у вигляді болюса або шляхом безперервної інфузії протягом визначеного періоду часу, внутрішньом'язово, внутрішньочеревно, підшкірно, внутрішньосуставно, у синовіальну рідину (внутрішньосуставно), перорально, місцево, шляхом інгаляції. Кращим є внутрішньовенне або підшкірне введення антитіла, олігопептиду або органічної молекули.

Із введенням антитіла до ТАТ, олігопептиду або органічної молекули можна сполучити інші терапевтичні режими. Спільне введення включає одночасне введення з використанням різних форм або однієї фармацевтичної форми та послідовне введення один за одним у будь-якому порядку, переважно протягом періоду часу, при якому обидва (або всі) діючі речовини одночасно проявляють свою біологічну активність. Переважно така спільна терапія приводить до синергетичної терапевтичної дії.

Може виявитися бажаним спільне введення антитіла або антитіла до ТАТ, олігопептидів або органічних молекул, у сполученні із введенням антитіла до іншого пухлинного антигену, асоційованого з конкретним видом раку.

В іншому варіанті здійснення винаходу способи терапевтичного лікування, пропоновані в даному винаході, включають спільне введення антитіла (або антитіл) до ТАТ, олігопептидів або органічних молекул і одного або декількох хіміотерапевтичних агентів або інгібуючих ріст агентів, включаючи одночасне введення суміші різних хіміотерапевтичних агентів. Хіміотерапевтичні агенти являють собою естрамустину фосфат, преднімустин, цисплатин, 5-фторурацил, мелфалан, циклофосфамід, гідроксисечовину та гідроксиретаксани (такі як паклітаксел і доцетаксел) і/або антрациклінові антибіотики. Можна використовувати препаративні форми та схеми введення таких хіміотерапевтичних агентів відповідно до інструкцій виробників або їх може визначати емпірично лікар. Препаративні форми та схеми введення таких хіміотерапевтичних агентів описані в: Chemotherapy Service, під. ред. M.C. Perry, вид-во Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992.

Антитіло, олігопептид або органічну молекулу можна поєднувати з антигормональною сполукою; наприклад, антиестрогеном, таким як тамоксифен; антипрогестероном, таким як онапристон (див. EP 61612), або антиадрогеном, таким як флутамід, використовуючи відомі дози цих молекул. Якщо рак, що підлягає лікуванню, являє собою залежний від андрогену рак, то перед введенням пацієнту антитіла до ТАТ, олігопептиду або органічної молекули (і необов'язково інших пропонованих у даному описі агентів) пацієнта можна піддавати ан-

тиандрогенній терапії, після чого рак стає незалежним від андрогена.

Іноді доцільно спільно вводити пацієнту також кардіозахисний агент (для попередження або зниження дисфункції міокарда, пов'язаної з терапією) або один або декілька цитокінів. Крім вищевказаних терапевтичних режимів, пацієнта можна піддавати хірургічному видаленню ракових клітин і/або променевої терапії до, одночасно або після лікування антитілом, олігопептидом або органічною молекулою. Прийнятні дози будь-якого із агентів, що спільно вводяться, являють собою дози, які застосовують у цей час, і вони можуть бути знижені через спільну дію (синергізму) агента та антитіла до ТАТ, олігопептиду або органічної молекули.

Для попередження або лікування захворювання дозу та шлях введення повинен вибирати лікар відповідно до відомих критеріїв. Відповідна доза антитіла, олігопептиду або органічної молекули повинна залежати від типу захворювання, що підлягає лікуванню, як визначено вище, важкості та перебігу хвороби, від того, чи вводять антитіло, олігопептид або органічну молекулу в превентивних або терапевтичних цілях, від попередньої терапії, історії хвороби пацієнта та відповіді на антитіло, олігопептид або органічну молекулу та приписання лікаря. Антитіло, олігопептид або органічну молекулу можна вводити пацієнту один раз або у вигляді серій обробок. Переважно антитіло, олігопептид або органічну молекулу вводять шляхом внутрішньовенної інфузії або підшкірних ін'єкцій. Залежно від типу та важкості захворювання від приблизно 1мкг/кг до приблизно 50мг/кг маси тіла (наприклад, приблизно 0,1-15мг/кг/дозу) антитіла можна спочатку вводити пацієнту у вигляді передбачуваної дози, шляхом, наприклад, одного або декілька введень або шляхом безперервної інфузії. Схема введення доз може включати введення первинної ударної дози приблизно 4мг/кг із наступним щотижневим введенням підтримуючої дози антитіла до ТАТ, що становить приблизно 2мг/кг. Однак можна застосовувати інші схеми введення доз. Як правило, добова доза повинна становити від приблизно 1мкг/кг до 100мг/кг або більше залежно від зазначених вище факторів. Для повторних введень протягом декількох днів або більше, залежно від стану, лікування продовжують до необхідного пригнічення симптомів захворювання. Успіх зазначеної терапії легко оцінювати загальноприйнятими методами та аналізами й на основі критеріїв, відомих лікарю або іншому спеціалісту в даній галузі.

Крім введення білка антитіла пацієнту даний винахід стосується також введення антитіла шляхом генної терапії. Таке введення нуклеїнової кислоти, яка кодує антитіло, означають як «введення антитіла в терапевтично ефективній кількості» (див., наприклад, WO 96/07321, опубліковану 14 березня 1996 р., відносно застосування генної терапії для створення внутрішньоклітинних антитіл).

Відомо два підходи до введення нуклеїнової кислоти (необов'язково у векторі) у клітини пацієнта; *in vivo* і *ex vivo*. Для введення *in vivo* нуклеїнову

кислоту ін'єктують безпосередньо в організм пацієнта, як правило, в ділянку, у якій потрібне застосування антитіла. Для лікування *ex vivo* клітини виділяють із організму пацієнта, вбудовують у ці виділені клітини нуклеїнову кислоту та модифіковані клітини вводять пацієнту або безпосередньо, або, наприклад, у формі, коли вони інкапсульовані в пористі мембрани, які імплантують пацієнту (див., наприклад, U.S. 4892538 і 5283187). Існують різні методи, які можна використовувати для введення нуклеїнових кислот у живі клітини. Методи можуть варіюватися залежно від того, переносять нуклеїнову кислоту *in vitro* у клітини, що культивуються, або вносять *in vivo* у клітини хазяїна, що підлягає лікуванню. Методи, які можна застосовувати для переносу нуклеїнової кислоти в клітини ссавця *in vitro*, включають використання ліпосом, електропорацію, мікроін'єкцію, злиття клітин, використання ДЕАЕ-декстрану, метод осадження за допомогою фосфату кальцію та т.д. Як правило, вектор, використовуваний для введення гена *ex vivo*, являє собою ретровірусний вектор.

Кращі в цей час методи переносу нуклеїнової кислоти *in vivo* включають трансфекцію вірусними векторами (такими як аденовірус, вірус І герпеса простого або аденоасоційований вірус) і системи на основі ліпідів (прикладами ліпідів, які можна застосовувати для опосередкованого ліпідами переносу гена, є DOTMA, DOPE DC-choi). Огляд відомих у цей час методів маркування генів і протоколів генної терапії наведений в Anderson та ін., Science, 256, 1992, сс. 808-813 (див. також WO 93/25673 і процитовані там посилання).

Антитіло до ТАТ, пропонуване у винаході, може знаходитися в різних формах, які підпадають під визначення «антитіло» у контексті даного опису. Так, антитіла являють собою повнорозмірне або інтактне антитіло, фрагменти антитіла, нативні амінокислотні послідовності антитіла або її варіанти, гуманізовані, химерні або злиті антитіла, імунокон'югати і їх функціональні фрагменти. У злитих антитілах послідовність антитіла зливають із гетерологічною поліпептидною послідовністю. Антитіла можна модифікувати в Fc-ділянки для одержання необхідних ефекторних функцій. Як більш докладно описано в розділах даного опису при наявності відповідних Fc-ділянок «оголене» антитіло, зв'язане із клітинною поверхнею, може індукувати цитотоксичність, наприклад, антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність (ADCC), або комплементзалежну цитотоксичність шляхом рекрутменту комплементу або за допомогою деяких інших механізмів. В іншому варіанті, коли потрібно елімінувати або понизити ефекторну функцію для мінімізації побічних дій або терапевтичних ускладнень, можна застосовувати деякі інші Fc-ділянки.

В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло конкурує за зв'язування або зв'язується практично з тим же епітопом, що й антитіла, пропонувані у винаході. Під обсяг винаходу підпадають також антитіла, які мають біологічні характеристики антитіл до ТАТ, пропонуваних у даному винаході, насамперед, мають здатність до прямого переносу в пухлину *in vivo* і інгібування

проліферації клітин або цитотоксичні характеристики.

Методи одержання антитіл описані вище.

Антитіла до ТАТ, олігопептиди й органічні молекули, пропонувані в даному винаході, можна застосовувати для лікування раку, при якому відбувається експресія ТАТ, або полегшення одного або декількох симптомів зазначеного типу раку в ссавця. Такий рак включає рак передміхурової залози, рак сечового шляху, рак легенів, рак молочної залози, рак ободової кишки та рак яєчника, більш конкретно аденокарциному передміхурової залози, нирково-клітинний рак, колоректальну карциному, аденокарциному легенів, дрібноклітинний рак легенів та плевральну мезотеліому. Під поняття рак підпадають метастатичні форми кожного із зазначених вище видів раку.

Антитіло, олігопептид або органічна молекула мають здатність зв'язуватися принаймні з тією популяцією ракових клітин ссавців, яка експресує ТАТ-поліпептид. У кращому варіанті здійснення винаходу антитіло, олігопептид або органічна молекула мають здатність ефективно руйнувати або знищувати експресуючі ТАТ пухлинні клітини або інгібувати ріст таких клітин *in vitro* або *in vivo* за допомогою зв'язування з ТАТ-поліпептидом на цій клітині. Таке антитіло являє собою «оголене» антитіло до ТАТ (не кон'юговане з яким-небудь агентом). «Оголені» антитіла, які мають цитотоксичність або здатність інгібувати ріст клітин, можна додатково навантажувати цитотоксичним агентом для надання їм ще більш високої ефективності відносно руйнування пухлинних клітин. Цитотоксичні властивості можна надавати антитілу до ТАТ, наприклад, шляхом кон'югування антитіла із цитотоксичним агентом з одержанням представленого в даному описі імунокон'югату. Цитотоксичний агент або агент, що інгібує ріст, переважно являє собою невелику молекулу. Кращими є токсини, такі як каліхеаміцин або майтансиноїд і їх аналоги або похідні.

Винахід стосується композиції, яка містить антитіло до ТАТ, олігопептид або органічну молекулу, пропонувані у винаході, і носій. Для лікування раку пацієнту, що потребує такого лікування, можна вводити композиції, де композиція може містити одне або декілька антитіл до ТАТ, які присутні у вигляді імунокон'югату або «оголеного» антитіла. В іншому варіанті здійснення винаходу композиції можуть містити ці антитіла, олігопептиди або органічні молекули в сполученні з іншими терапевтичними агентами, такими як цитотоксичні або інгібуючі ріст агенти, включаючи хімотерапевтичні агенти. Винахід стосується також препаративних форм, які містять антитіло до ТАТ, олігопептид або органічну молекулу, пропонувані у винаході, і носій. В одному з варіантів здійснення винаходу препаративна форма являє собою терапевтичну препаративну форму, яка містить фармацевтично прийнятний носій.

Іншим об'єктом винаходу є виділені нуклеїнові кислоти, які кодують антитіла до ТАТ. Під обсяг винаходу підпадають нуклеїнові кислоти, які кодують як Н-, так і L-ланцюги, а також насамперед залишки гіперваріабельних ділянок, ланцюги, які

кодують нативну послідовність антитіла, а також варіанти, модифікації та гуманізовані версії антитіла.

Винахід стосується також способів, які можна застосовувати для лікування раку, при якому відбувається експресія ТАТ, або полегшення одного або декількох симптомів зазначеного типу раку у ссавця, що полягає у тому, що ссавцю вводять у терапевтично ефективній кількості антитіло до ТАТ, олігопептид або органічну молекулу. Терапевтичні композиції, які містять антитіло, олігопептид або органічну молекулу, можна вводити протягом короткого проміжку часу (гостра дія) або постійно або із проміжками залежно від приписання лікаря. Запропоновані також способи інгібування росту та знищення клітини, експресуючої ТАТ-поліпептид.

Винахід стосується також наборів і виробів, які містять принаймні одне антитіло до ТАТ, олігопептид або органічну молекулу. Набори, які містять антитіло до ТАТ, олігопептиди або органічні молекули, знаходять застосування, наприклад, при здійсненні аналізів з оцінки здатності ТАТ знищувати клітини, для очищення або імунопреципітації ТАТ-поліпептиду із клітин. Наприклад, для виділення й очищення ТАТ набір може містити антитіло до ТАТ, олігопептид або органічну молекулу, що зшиті із гранулами (наприклад, сефарозними гранулами). Можна створювати набори, які містять антитіла, олігопептиди або органічні молекули, для виявлення та кількісної оцінки ТАТ *in vitro*, наприклад, при здійсненні ELISA або Вестерн-блотингу. Такі антитіла, олігопептиди або органічну молекулу, застосовувані для виявлення, можна оснащати міткою, такою як флуоресцентна або радіоактивна мітка.

#### І. Вироби та набори

Наступним варіантом здійснення винаходу є виріб, що містить продукти, застосовувані для лікування раку, що експресує ТАТ. Виріб являє собою контейнер і етикетку або листівку-вкладиш в упаковку, які розміщені на контейнері або вкладені в нього. Прийнятними контейнерами є, наприклад банки, пухирці, шприци й т.д. Контейнери можна виготовляти з різних матеріалів, таких як скло або пластмаса. Контейнер містить композицію, ефективну для лікування визначеного зв'язаного з раком стану, і може мати стерильний вхідний канал (наприклад, контейнер може являти собою пакет для внутрішньовенного розчину або ємність, обладнану пробкою, яку можна проколювати за допомогою голки для підшкірних ін'єкцій). Принаймні одна діюча речовина в композиції являє собою антитіло до ТАТ, олігопептид або органічну молекулу, пропонувані у винаході. На етикетці або листівці-вкладиші в упаковці зазначено, що композицію застосовують для лікування раку. Етикетка або листівка-вкладиш в упаковці додатково повинні містити інструкції із введення композиції, що містить молекулу антитіла, олігопептид або органічну молекулу пацієнту, що страждає на рак. Крім того, виріб може додатково містити другий контейнер з фармацевтично прийнятним буфером, таким як бактеріостатична вода для ін'єкцій (БСВІ), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера та розчин декстрази. Крім того, він може

включати інші продукти, необхідні з комерційної точки зору та з погляду споживача, зокрема, інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки та шприци.

Винахід стосується також наборів, які можна застосовувати для різних цілей, наприклад, при здійсненні аналізів для оцінки здатності ТАТ знищувати клітини, для очищення або імунопреципітації ТАТ із клітин. Наприклад, для виділення й очищення ТАТ-поліпептиду набір може містити антитіло до ТАТ, олігопептид або органічну молекулу, що зшита із гранулами (наприклад, сефарозними гранулами). Можна створювати набори, які містять антитіла, олігопептиди або органічні молекули, для виявлення та кількісної оцінки ТАТ *in vitro*, наприклад, при здійсненні ELISA або Вестерн-блотингу. Також як і у випадку виробу, набір містить контейнер і етикетку або листівку-вкладиш в упаковці, розташовані на поверхні або усередині контейнера. Контейнер містить композицію, що включає принаймні одне антитіло до ТАТ, олігопептид або органічну молекулу, пропонувані у винаході. Додаткові контейнери можуть містити, наприклад розріджувачі та буфери, контрольні антитіла. Етикетка або листівка-вкладиш в упаковці можуть містити опис композиції, а також інструкції з їх застосування *in vitro* або для цілей діагностики.

Й. Застосування ТАТ-поліпептидів і нуклеїнових кислот, які кодують ТАТ-поліпептиди

Нуклеотидні послідовності (або їх комплекти), що кодують ТАТ-поліпептиди, знайшли різне застосування в галузі молекулярної біології, включаючи застосування як зонди для гібридизації, в картируванні хромосом і генів і при створенні антисмислових РКН- і ДНК-зондів. Нуклеїнову кислоту, яка кодує ТАТ, можна застосовувати також для одержання ТАТ-поліпептидів за допомогою представлених у даному описі методів рекомбінантної ДНК, у яких ТАТ-поліпептиди можуть знайти застосування, наприклад, для одержання антитіл до ТАТ, як зазначено в даному описі.

Повнорозмірну нативну послідовність гена ТАТ або її фрагмент можна застосовувати як зонди для гібридизації при використанні бібліотек кДНК для виділення повнорозмірної кДНК ТАТ або для виділення інших кДНК (що, наприклад, кодують варіанти, які зустрічаються в природних умовах, ТАТ або ТАТ з інших видів), які мають необхідну ідентичність послідовності із представленою в даному описі нативною послідовністю ТАТ. Необов'язково довжина зондів повинна становити від приблизно 20 до приблизно 50 основ. Зонди для гібридизації можна одержувати принаймні частково з нових ділянок (пропонуваніх у даному винаході) повнорозмірної нативної нуклеотидної послідовності, при цьому ці ділянки можна визначати без зайвих експериментів або одержувати з геномних послідовностей, які включають промотори, енхансерні елементи та інтрони нативної послідовності ТАТ. Наприклад, метод скринінгу може полягати у тому, що виділяють кодуючу ділянку гена ТАТ з використанням відомої послідовності для синтезу вибраного зонда, що складається приблизно з 40 основ. Зонди для гібридизації можна мітити будь-якими мітками, включаючи радіонуклеотиди, такі як  $^{32}\text{P}$  або  $^{35}\text{S}$ , або ферментативні мітки,

такі як лужна фосфатаза зшита із зондом через системи, що зв'язуються, авідину/біотину. Мічені зони, що мають послідовність, комплементарну послідовності гена ТАТ, пропонуваного в даному винаході, можна застосовувати для скринінгу бібліотек людської кДНК, геномної ДНК або мРНК для виявлення представників таких бібліотек, з яким зонд гібридизується. Методи гібридизації описані більш докладно нижче в прикладах. Будь-які EST-послідовності (послідовності мітки, що експресуються), одержані при створенні даного винаходу, представлені в даному описі, можна застосовувати також як зонди за допомогою методів, представлених у даному описі.

Інші застосовувані фрагменти кодуючих ТАТ нуклеїнових кислот являють собою антисмислові або смислові олігонуклеотиди, які містять одноланцюгову нуклеотидну послідовність (або РНК, або ДНК), яка має здатність до зв'язування з послідовностями ТАТ-мРНК-мішені (смислова) або із ДНК ТАТ (антисмислова). Антисмислові або смислові олігонуклеотиди, пропонувані в даному винаході, містять фрагмент кодуючої ділянки ДНК ТАТ. Такий фрагмент, як правило, містить принаймні приблизно 14 нуклеотидів, переважно приблизно від 14 до 30 нуклеотидів. Відомо, що можна виводити антисмисловий або значеннєвий олігонуклеотид на основі послідовності кДНК, що кодує даний білок, наприклад, як описано в Stein і Cohen, Cancer Res. 48, 1988, с. 2659 і в van der Krol та ін., BioTechniques 6, 1988, с. 958.

Зв'язування антисмислових або смислових олігонуклеотидів з нуклеотидними послідовностями-мішенями приводить до утворення дуплексів, які блокують транскрипцію або трансляцію послідовності-мішені різними шляхами, включаючи підвищення розщеплення дуплексів, передчасне припинення транскрипції або трансляції або інші методи. Такі методи підпадають під обсяг даного винаходу. Таким чином, антисмислові олігонуклеотиди можна застосовувати для блокади експресії білків ТАТ, де зазначені білки ТАТ можуть відігравати роль в індукції раку в ссавців. Антисмислові або смислові олігонуклеотиди містять також олігонуклеотиди, що мають модифіковані цукорфосфодіефірні каркаси (або інші цукрові зв'язки, наприклад, описані в WO 91/06629), і ці цукрові зв'язки стійкі до дії ендогенних нуклеаз. Такі олігонуклеотиди зі стійкими цукровими зв'язками стабільні *in vivo* (тобто, мають стійкість до ферментативного розщеплення), але зберігають специфічність послідовності щодо зв'язування з нуклеотидними послідовностями-мішенями.

Кращі інтрагенні сайти для антисмислового зв'язування включають ділянку, яка містить сайт ініціації трансляції/стартовий кодон (5'-AUG/5'-ATG) або термінуючий /стоп-кодон (5'-UAA, 5'-UAG та 5'-UGA/5'-TAA, 5'-TAG та 5'-TGA) відкритої рамки зчитування (BP3) гена. Ці ділянки належать до фрагмента мРНК або гена, що включає від приблизно 25 до приблизно 50 суміжних нуклеотидів, розташованих у будь-якому напрямку (тобто, у 5'- або 3'-напрямку) від сайту ініціації трансляції або термінуючого кодону. Інші кращі ділянки для антисмислового зв'язування включають: інтрони; екзо-

ни; інтрон-екзонні стики; відкриту рамку читування (ВРЗ) або «кодуючу ділянку», що являє собою ділянку між кодоном ініціації трансляції та кодоном термінації трансляції; 5'-кеп мРНК, що містить N7-метильований залишок гуанозину, зчеплений з найбільш наближеним до 5'-кінця залишком мРНК через 5'-5'-трифосфатний зв'язок і включає саму структуру 5'-кепу, а також перші 50 нуклеотидів, що примикають до кепу; 5'-нетрансльовану ділянку (5'UTR), частину мРНК в 5'-напрямку відносно кодону ініціації трансляції, і, таким чином, включає нуклеотиди між сайтом 5'-кепу та кодоном ініціації трансляції мРНК або відповідними нуклеотидами гену; і 3'-нетрансльовану ділянку (3'UTR), частину мРНК в 3'-напрямку від сайту термінації трансляції, і, таким чином, включає нуклеотиди між кодоном термінації трансляції та 3'-кінцем мРНК або відповідними нуклеотидами гена. Конкретними прикладами кращих антисмислових сполук, які можна застосовувати для інгібування експресії білків ТАТ, є олігонуклеотиди, що містять модифіковані каркаси або внутрішньонуклеозидні зв'язки, які не зустрічаються в природних умовах. До олігонуклеотидів, що мають модифіковані каркаси, належать олігонуклеотиди, які зберігають атом фосфору в каркасі, і олігонуклеотиди, у каркасі яких відсутній атом фосфору. У контексті даного опису та у деяких посиланнях, що стосуються модифікованих олігонуклеотидів, вважається, що олігонуклеотид, у внутрішньонуклеозидному каркасі якого відсутній атом фосфору, може також бути віднесений до олігонуклеозидів. Кращі модифіковані олігонуклеотидні каркаси включають, наприклад, фосфоротіоати, хіральні фосфоротіоати, фосфородітіоати, складні трифосфорні ефіри, складні аміноалкілтрифосфорні ефіри, метил- і інші алкільні фосфонати, включаючи 3'-алкіленфосфонати, 5'-алкіленфосфонати та хіральні фосфонати, фосфінати, фосфорамідати, включаючи 3'-амінофосфорамідат і аміноалкілфосфорамідати, тіонофосфорамідати, тіоноалкілфосфонати, складні тіоотриалкілфосфорні ефіри, селенофосфати та боранофосфати, які мають нормальні 3'-5'-зв'язки, їх аналоги з 2'-5'-зв'язками та сполуки з інвертованою полярністю, якщо один або декілька внутрішньонуклеотидних зв'язків являють собою 3'-3'-, 5'-5'- або 2'-2'-зв'язок. Кращі олігонуклеотиди з інвертованою полярністю містять один 3'-3'-зв'язок на найближчому до 3'-кінця внутрішньонуклеотидному зв'язку, тобто один інвертований нуклеозидний залишок, що може бути неосновним (нуклеотидна основа відсутня або замість неї присутня гідроксильна група). До них належать також різні солі, суміші та вільні кислотні форми. Репрезентативні патенти США, у яких описане одержання фосфоровмісних зв'язків, включають (але, не обмежуючись ними) U.S. 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177196; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541306; 5550111; 563253; 5571799; 5587361; 5194599; 5565555; 5527899; 5721218; 5672697 і 5625050, кожний з яких включений у даний опис як посилання.

Кращі модифіковані олігонуклеотидні каркаси, у яких відсутній атом фосфору, мають каркаси, утворені коротколанцюговими алкільними або циклоалкільними внутрішньонуклеотидними зв'язками, змішаними, такими що включають гетероатом, і алкільними або циклоалкільними внутрішньоглікозидними зв'язками, або однією або декількома коротколанцюговими гетероатомними або гетероциклічними внутрішньонуклеотидними зв'язками. Вони можуть мати морфолінові зв'язки (утворені частково із цукрового фрагмента нуклеозиду); силосанові каркаси; сульфідні, сульфоксидні та сульфонові каркаси; формацетильні та тіоформацетильні каркаси; метилформацетильні та тіоформацетильні каркаси; рибоацетильні каркаси; каркаси, що містять алкен; сульфаматні каркаси; метиленімінові та метиленгідразинові каркаси; сульфонатні та сульфонамідні каркаси; амідні каркаси; і інші каркаси, які мають змішані частини, що містять N-, O-, S- та CH<sub>2</sub>-компоненти. Репрезентативні патенти США, у яких описане одержання таких олігонуклеотидів, включають (але, не обмежуючись ними) U.S.: 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 5264562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5610289; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437; 5792608; 5646269 і 5677439, кожний з яких включений у даний опис як посилання.

В інших кращих антисмислових олігонуклеотидах як цукровий, так і внутрішньоглікозидний зв'язок, тобто каркас нуклеотидних ланок, замінені новими групами. Основні ланки зберігають для гібридизації з відповідною нуклеїновою кислотою мішенню. Така олігомерна сполука, олігонуклеотидний міметик, який, як встановлено, має підвищену здатність до гібридизації, позначений як пептидна нуклеїнова кислота (ПНК). У ПНК цукровий каркас олігонуклеотиду замінений каркасом, який містить амід, зокрема аміноетилгліциновим каркасом. Нуклеотиди зберігаються та зв'язуються безпосередньо або опосередковано з атомами азоту азагрупи амідної частини каркаса. Репрезентативні патенти США, у яких описане одержання сполук у вигляді ПНК, включають (але не обмежуючись ними) U.S. 5539082; 5714331 та 5719262, кожний з яких включений у даний опис як посилання. Додаткові дані про сполуки у вигляді ПНК представлені в Nielsen та ін., Science, 254, 1991, сс. 1497-1500.

Кращі антисмислові олігонуклеотиди включають фосфоротіоатні каркаси і/або каркаси, що містять гетероатом, і насамперед -CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>- [відомий як метиленовий (метиленіміновий) або MMI-каркас], -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>- та -O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- [у якому нативний фосфодіефірний каркас представлений групою -O-P-O-CH<sub>2</sub>-], які описані в процитованому вище U.S. 5489677, і амідні каркаси, які описані в процитованому вище U.S. 5602240. Кращими є також антисмислові олігонуклеотиди, які мають морфолінові каркасні структури, описані в процитованому вище U.S. 5034506.

Модифіковані олігонуклеотиди можуть містити також один або декілька заміщених цукрових фра-

ментів. Кращі олігонуклеотиди містять в 2'-положенні одну з наступних груп: OH; F; O-алкіл, S-алкіл або N-алкіл; O-алкеніл, S-алкеніл або N-алкеніл; O-алкініл, S-алкініл або N-алкініл; або O-алкіл-O-алкіл, де алкіл, алкеніл і алкініл можуть бути незаміщеними або можуть бути заміщені C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>алкілом або C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>алкенілом і -алкінілом. Найбільш кращими є O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub> та O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, у яких n і m мають значення від 1 до приблизно 10. Інші кращі антисмислові олігонуклеотиди містять в 2'-положенні одну з наступних груп: C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>(низч.)алкіл, заміщений (низч.)алкіл, алкеніл, алкініл, алкаріл, аралкіл, O-алкаріл або O-аралкіл, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, гетероциклоалкіл, гетероциклоалкаріл, аміноалкіламіногрупа, поліалкіламіногрупа, заміщений силіл, відщеплювана група РНК, репортерна група, інтеркалятор, група, яка поліпшує фармакокінетичні властивості олігонуклеотиду, або поліпшує фармакодинамічні властивості олігонуклеотиду, і інші замісники, що мають аналогічні властивості. Краща модифікація включає 2'-метоксіетоксигрупу (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, яку позначають також як 2'-O-(2-метоксіетил) або 2'-MOE) (Martin та ін., *Helv. Chim. Acta*, 78, 1995, сс. 486-504) тобто, алкоксіалкоксигрупу. Інша краща модифікація включає 2'-диметиламінооксіетоксигрупу, тобто, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-групу, що означають також як 2'-DMAOE нижче в прикладах, і 2'-диметиламіноетоксіетоксигрупу (яку в даній галузі позначають також як 2'-O-диметиламіноетоксіетил або 2'-DMAEOE), тобто, 2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

Інша краща модифікація включає замкнуті нуклеїнові кислоти (ЗНК), у яких 2'-гідроксильна група зчеплена з атомом вуглецю у 3'- або 4'-положенні цукрового кільця, формуючи тим самим біциклічний цукровий фрагмент. Зв'язок переважно являє собою (-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-групу, яка утворює місток між атомом кисню в 2'-положенні та атомом вуглецю в 4'-положенні, де n означає 1 або 2. ЗНК і їх одержання описані в WO 98/39352 та WO 99/14226.

Інші кращі модифікації включають 2'-метокси (2'-O-CH<sub>3</sub>), 2'-амінопропокси (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2'-аліл (2'-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 2'-O-аліл (2'-O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>) і 2'-фтор (2'-F). 2'-модифікація може бути розташована в арабіно- (проти ходу) або рибо- (за ходом) положенні. Кращою модифікацією в 2'-арабіноположенні є 2'-F. Аналогічні модифікації можна створювати в інших положеннях олігонуклеотиду, зокрема в 3'-положенні цукру на 3'-кінцевому нуклеотиді або в 2'-5'-зчеплених олігонуклеотидах і в 5'-положенні 5'-кінцевого нуклеотиду. Олігонуклеотиди можуть нести також міметики цукру, такі як циклобутильні групи замість пентофуранозильної групи цукру. Репрезентативні патенти США, у яких описане одержання таких модифікованих структур цукрів включають (але не обмежуючись ними): U.S. 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265;

5658873; 5670633; 5792747 і 5700920, кожний з яких включений у даний опис як посилання.

Олігонуклеотиди можуть включати також модифікації або заміни нуклеотидної основи (яку часто в даній галузі називають просто «основою»). У контексті даного опису «немодифіковані» або «такі, що зустрічаються у природних умовах» нуклеотидні основи являють собою пуринові основи аденін (A) і гуанін (G) і піримідинові основи тимідин (T), цитозин (C) і урацил (U). Модифіковані нуклеотидні основи включають інші синтетичні основи або основи, що зустрічаються в природних умовах, такі як 5 метилцитозин (5-me-C), 5-гідроксиметилцитозин, ксантин, гіпоксантин, 2-аміноаденін, 6-метильні та інші алкільні похідні аденіну та гуаніну, 2-пропільні й інші алкільні похідні аденіну та гуаніну, 2-тіоурацил, 2-тіотимідин та 2-тіоцитозин, 5-галоурацил та -цитозин, 5 пропініл-(-C=C-CH<sub>3</sub> або -CH<sub>2</sub>-C=CH) урацил і -цитозин і інші алкільні похідні піримідинових основ, 6-азоурацил, -цитозин та -тимін, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тіораціл, 8-гало-, 8-аміно-, 8-тіол-, 8-тіоалкіл-, 8-гідроксил- або інші 8-заміщені аденіни та гуаніни, 5-гало-, насамперед 5-бром-, 5-трифторметил- і інші 5-заміщені урацили та цитозини, 7-метилгуанін і 7-метиладенін, 2-F-аденін, 2-аміноаденін, 8-азагуанін і 8-азааденін, 7-деазагуанін і 7-деазааденін і 3-деазагуанін і 3-деазааденін. Інші модифіковані нуклеотидні основи включають трициклічні піримідини, такі як феноксазинцитидин (1H-піримідо[5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3H)-он), фенотіазинцитидин (1H-піримідо[5,4-b][1,4]бензотіазин-2(3H)-он), G-групи, такі як заміщений феноксазинцитидин (наприклад, 9-(2-аміноетокси)-H-піримідо[5,4-b][1,4]бензоксазин-2(3H)-он), карбазолцитидин (2H-піримідо[4,5-b]індол-2-он), піридоіндолцитидин (H-піридо[3',2':4,5]піроло[2,3-d]піримідин-2-он).

Модифіковані нуклеотидні основи можуть включати основи, у яких пуринова або піримідинова основа замінена іншими гетероциклами, наприклад, 7-деазааденін, 7-деазагуанозин, 2-амінопіридин і 2-піридон. Інші нуклеотидні основи включають основи, описані в U.S. 3687808, описані в: *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, під ред. Kroschwitz J. I., вид-во John Wiley & Sons, 1990, сс. 858-859, і основи, описані в *Englisch* та ін., *Angewandte Chemie, International Edition*, 30, 1991, с. 613. Деякі із цих нуклеотидних основ особливо ефективні щодо підвищення афінності до зв'язування олігомерних сполук, пропонувані у винаході. До них належать 5-заміщені піримідини, 6-азапіримідини та N-2-, N-6- та O-6-заміщені пурини, включаючи 2-амінопропіладенін, 5-пропінілурацил і 5-пропінілцитозин. Встановлено, що замісники у вигляді 5-метилцитозину підвищують стабільність дуплекса нуклеїнової кислоти на 0,6-1,2°C (Sanghvi і ін., *Antisense Research and Applications*, вид-во CRC Press, Boca Raton, 1993, сс. 276-278) і є кращими замісниками основ, ще більш переважно у сполученні з 2'-O-метоксіетильними модифікаціями цукру. Репрезентативні патенти США, у яких описане одержання модифікованих нуклеотидних основ включають (але не обмежуючись ними) U.S. 3687808, а також

U.S. 4845205; 5130302; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121; 5596091; 5614617; 5645985; 5830653; 5763588; 6005096; 5681941 та 5750692, кожний з яких включений у даний опис як посилання.

Друга модифікація антисмислових олігонуклеотидів включає хімічне зв'язування з олігонуклеотидом одного або декількох фрагментів або кон'югатів, які підвищують активність, розподіл у клітині або поглинання клітиною олігонуклеотидів. Сполуки, пропонувані у винаході, можуть включати фрагменти кон'югату, ковалентно зв'язані з функціональними групами, такими як первинні або вторинні гідроксильні групи. Фрагменти кон'югатів, пропонувані у винаході, включають інтеркалятори, репортерні молекули, поліаміни, поліаміди, поліетиленгліколи, прості ефірні групи, фрагменти, які поліпшують фармакодинамічні властивості олігомерів, і фрагменти, які поліпшують фармакокінетичні властивості олігомерів. Типовими фрагментами є холестерини, ліпіди, катіонні ліпіди, фосfolіпіди, катіонні фосfolіпіди, біотин, феназин, фолат, фенантридин, антрахінон, акридин, флуоресцеїни, родаміни, кумарини та барвники. Фрагментами, що призначені для підвищення фармакодинамічних властивостей, у контексті даного опису є фрагменти, які поліпшують поглинання олігомерів, підвищують стійкість олігомерів до розщеплення і/або підсилюють специфічну гібридизацію із РНК. Фрагментами, що призначені для підвищення фармакокінетичних властивостей, у контексті даного опису є фрагменти, які поліпшують поглинання олігомерів, їх розподіл, метаболізм або екскрецію. Фрагменти кон'югатів включають (але не обмежуючись ними) ліпідні фрагменти, такі як фрагмент холестерину (Letsinger та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1989, сс. 6553-6556), холеву кислоту (Manoharan та ін., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4, 1994, сс. 1053-1060), простий тіоефір, наприклад, гексил-S-третилтіол (Manoharan та ін., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660, 1992, сс. 306-309; Manoharan та ін., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3, 1993, сс. 2765-2770), тіохолестерин (Oberhauser та ін., *Nucl. Acids Res.*, 20, 1992, сс. 533-538), аліфатичний ланцюг, наприклад, залишки додекандіолу або ундецилу (Saison-Behmoaras та ін., *EMBO J.*, 10, 1991, сс. 1111-1118; Kabanov та ін., *FEBS Lett.*, 259, 1990, сс. 327-330; Svinarchuk та ін., *Biochimie*, 75, 1993, сс. 49-54), фосfolіпід, наприклад, дигексадецил-гас-гліцерин або 1,2-ди-О-гексадецил-гас-гліцеро-3-Н-фосфонат триетиламонію (Manoharan та ін., *Tetrahedron Lett.*, 36, 1995, сс. 3651-3654; Shea та ін., *Nucl. Acids Res.*, 18, 1990, сс. 3777-3783), ланцюг поліаміну або поліетиленгліколю (Manoharan та ін., *Nucleosides & Nucleotides*, 14, 1995, сс. 969-973) або адамантанову кислоту (Manoharan та ін., *Tetrahedron Lett.*, 36, 1995, сс. 3651-3654), пальмітильний фрагмент (Mishra та ін., *Biochim. Biophys. Acta*, 1264, 1995, сс. 229-237) або залишок октадециламіну або гексиламінокарбонілоксихолестерину. Олігонуклеотиди, пропонувані у винаході, можна кон'югувати також з активними лікарськими субстанціями, такими, наприклад, як аспірин, варфарин, фенілбутазон,

ібупрофен, супрофен, фенбуфен, кетопрофен, (S)-(+)-пранопрофен, карпрофен, дансилсаркозин, 2,3,5-трийодбензойна кислота, флуфенамова кислота, фолінова кислота, бензотіадіазид, хлоротіазид, діазепін, індометинин, барбітурат, цефалоспорин, лікарський засіб, що містить сульфатгрупу, протидіабетичні, антибактеріальні засоби або антибіотики. Кон'югати олігонуклеотид-лікарський засіб і їх одержання описане в заявці на патент США, сер. № 09/334130 (поданої 15 червня 1999 р.) і в патентах США: 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717; 5580731; 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241; 5391723; 5416203; 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928 і 5688941, кожний з яких включений у даний опис як посилання.

Не є необхідним, щоб усі положення в даній сполуці були однорідно модифіковані, і фактично в одну сполуку або навіть в один нуклеозид в олігонуклеотиді можна включати більше однієї з вищевказаних модифікацій. Під обсяг даного винаходу підпадають також антисмислові сполуки, що являють собою химерні сполуки. Поняття «химерні» антисмислові сполуки або «химерні» у контексті даного опису стосується антисмислових сполук, насамперед олігонуклеотидів, які містять дві або більшу кількість хімічно різних ділянок, кожна з яких складається принаймні з однієї мономерної ланки, тобто нуклеотиду у випадку олігонуклеотидної сполуки. Такі олігонуклеотиди, як правило, містять принаймні одну ділянку, у якій олігонуклеотид модифікований, так, щоб надавати олігонуклеотиду підвищеної стійкості до розщеплення нуклеазами, підвищену здатність проникати в клітину і/або підвищену афінність до зв'язування з нуклеїновою кислотою-мішенню. Додаткова ділянка олігонуклеотиду може являти субстрат для ферментів, які мають здатність розщеплювати гібриди РНК:ДНК або РНК:РНК. Наприклад, РНКазу Н являє собою клітинну ендонуклеазу, що відщеплює ланцюг РНК від дуплекса РНК:ДНК. Таким чином, активація РНКазу Н приводить до розщеплення РНК-мішені, що в значній мірі підвищує ефективність інгібування олігонуклеотидом експресії гена. Отже, при застосуванні химерних олігонуклеотидів можна одержувати порівнянні результати при використанні більш коротких олігонуклеотидів у порівнянні з фосфоротіоатними дезоксіолігонуклеотидами, що гібридизуються з цією ж ділянкою-мішенню. Химерні антисмислові сполуки, пропонувані у винаході, можна одержувати у вигляді складних структур, що складаються із двох або більшої кількості олігонуклеотидів, модифікованих олігонуклеотидів, олігонуклеозидів і/або міметиків олігонуклеотидів, описаних вище. Кращі химерні антисмислові олігонуклеотиди включають принаймні один 2'-модифікований цукор (переважно 2'-О-

(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>) на 3'-кінці для надання стійкості до нуклеаз і ділянку принаймні з 4 послідовно розташованими 2'-Н-цукрами для надання активності РНКазі Н. Такі сполуки також називають у даній галузі гібридами або гепмерами. Кращі гепмери несуть ділянку 2'-модифікованих цукрів (переважно 2'-О-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>) на 3'-кінці й на 5'-кінці, розділену принаймні однією ділянкою, що має принаймні 4 послідовно розташованих 2'-Н-цукри та переважно включає фосфоротіоатні каркасні зв'язки. Репрезентативні патенти США, у яких описане одержання таких гібридів включають (але не обмежуючись ними) U.S. 5013830; 5149797; 5220007; 5256775; 5366878; 5403711; 5491133; 5565350; 5623065; 5652355; 5652356 і 5700922, кожний з яких повністю включений у даний опис як посилання.

Антисмислові сполуки, пропонувані в даному винаході, зручно та прийнято одержувати за допомогою добре відомого методу твердофазового синтезу. Устаткування для такого синтезу надходить у продаж від декількох постачальників, наприклад, від фірми Applied Biosystems (Фостер Сіті, шт. Каліфорнія.). В іншому або альтернативному варіанті можна застосовувати будь-які інші методики такого синтезу. Добре відоме застосування аналогічних методів для одержання олігонуклеотидів, таких як фосфоротіоатні та алкіловані похідні. Сполуки, пропонувані у винаході, можна також змішувати, капсулювати, кон'югувати або іншим способом асоціювати з іншими молекулами, молекулярними структурами або сумішами сполук, наприклад, ліпосомами, молекулами, що здійснюють спрямований переніс до рецептора, пероральними, ректальними, місцевими або іншими препаративними формами, які сприяють поглинанню, розподіленню і/або абсорбції. Репрезентативні патенти США, у яких описане одержання таких препаративних форм, які сприяють поглинанню, розподіленню і/або абсорбції включають (але не обмежуючись ними) U.S. 5108921; 5354844; 5416016; 5459127; 5521291; 5543158; 5547932; 5583020; 5591721; 4426330; 4534899; 5013556; 5108921; 5213804; 5227170; 5264221; 5356633; 5395619; 5416016; 5417978; 5462854; 5469854; 5512295; 5527528; 5534259; 5543152; 5556948; 5580575 і 5595756, кожний з яких включений у даний опис як посилання.

Іншими прикладами смислових або антисмислових олігонуклеотидів є олігонуклеотиди, ковалентно зв'язані з органічними залишками, описані в WO 90/10048, і іншими залишками, які підвищують афінність олігонуклеотиду до нуклеотидної послідовності-мішені, такі як полі-(L-лізин). Крім того, інтеркалюючі агенти, такі як еліптицин, і алкілвальні агенти або комплекси з металами можна приєднувати до смислових або антисмислових олігонуклеотидів для модифікації специфічності до зв'язування антисмислового або смислового олігонуклеотиду з нуклеотидною послідовністю-мішенню.

Антисмислові або смислові олігонуклеотиди можна інтродукувати у клітину, що містить нуклеотидну послідовність-мішень, за допомогою будь-якого методу переносу гена, включаючи, напри-

клад СаР<sub>4</sub>-опосередковувану трансфекцію ДНК, електропорацію або застосування векторів для переносу генів, таких як вірус Епштейна-Барра. Відповідно до кращого методу антисмисловий або смисловий олігонуклеотид вбудовують у придатний ретровірусний вектор. Клітину, що містить нуклеотидну послідовність-мішень, приводять у контакт із рекомбінантним ретровірусним вектором або *in vivo*, або *ex vivo*. Прийнятними ретровірусними векторами є (але не обмежуючись ними) вектори, одержані з мишачого ретровірусу M-MuLV, N2 (ретровірус, виведений з M-MuLV) або вектори, які складаються із двох копій, позначені як DCT5A, DCT5B та DCT5C (див. WO 90/13641).

Смисловий або антисмисловий олігонуклеотиди можна також інтродукувати у клітину, що містить нуклеотидну послідовність-мішень, шляхом утворення кон'югату з зв'язуючою молекулою ліганду, наприклад, відповідно до методу, описаному в WO 91/04753. Прийнятними зв'язуючими молекулами ліганду, є (але не обмежуючись ними) рецептори клітинної поверхні, фактори росту, інші цитокіни або інші ліганди, які зв'язуються з рецепторами клітинної поверхні. Переважно кон'югація зв'язуючої молекули ліганду помітно не впливає на здатність зв'язуючої молекули ліганду зв'язуватися з відповідною молекулою або рецептором або блокувати проникнення смислового або антисмислового олігонуклеотиду або його кон'югованої версії в клітину.

В іншому варіанті смисловий або антисмисловий олігонуклеотид можна інтродукувати у клітину, що містить нуклеотидну послідовність-мішень, шляхом утворення комплексу олігонуклеотид-ліпід, описаного в WO 90/10448. Комплекс смисловий або антисмисловий олігонуклеотид-ліпід переважно дисоціюється усередині клітини за допомогою ендогенної ліпази.

Антисмислові або смислові молекули РНК або ДНК, як правило, складаються принаймні приблизно з 5 нуклеотидів, в іншому варіанті принаймні приблизно з 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 або 1000 нуклеотидів, у цьому контексті поняття «приблизно» означає, що довжина зазначеної нуклеотидної послідовності знаходиться в межах  $\pm 10\%$  від зазначеної довжини.

Можна застосовувати також зонди в методі ПЛР для створення пулів послідовностей з метою ідентифікації близькоспоріднених кодуючих послідовностей ТАТ.

Нуклеотидні послідовності, які кодують ТАТ, можна застосовувати також для конструювання зондів, що гібридизуються, для картирування гена,



що кодує ТАТ, і для генетичного аналізу індивідуумів з генетичними порушеннями. Нуклеотидні послідовності, пропоновані в даному винаході, можна картирувати на хромосомі та специфічних ділянках хромосоми за допомогою відомих методів, таких як гібридизація *in situ*, аналіз зв'язування в присутності відомих хромосомних маркерів і гібридизаційний скринінг бібліотек.

Коли, кодуючі послідовності ТАТ кодують білок, що зв'язується з іншим білком (наприклад, коли ТАТ являє собою рецептор), то ТАТ можна застосовувати для аналізу ідентичності інших білків або молекул, що приймають участь у взаємодії за типом зв'язування. За допомогою таких методів можна виявляти інгібітори рецептора/ліганду, що приймають участь у взаємодії за типом зв'язування. Білки, що приймають участь у таких взаємодіях за типом зв'язування, можна застосовувати також для скринінгу пептидних або низькомолекулярних інгібіторів або агоністів взаємодії за типом зв'язування. Крім того, рецептор ТАТ можна застосовувати для виділення корелюючого(их) ліганду(ів). Скринінгові аналізи можна проводити з метою пошуку основних молекул, які імітують біологічну активність нативного ТАТ або рецептора ТАТ. Такі скринінгові аналізи повинні включати масштабний скринінг хімічних бібліотек, що робить їх особливо придатними для ідентифікації перспективних низькомолекулярних лікарських засобів. До низькомолекулярних молекул належать синтетичні органічні або неорганічні сполуки. Аналізи слід виконувати в різних форматах, включаючи аналізи зв'язування типу білок-білок, біохімічні скринінгові аналізи, імунологічні аналізи та клітинні аналізи, які добре охарактеризовані в даній галузі.

Нуклеїнові кислоти, які кодують ТАТ або його модифіковані форми, можна застосовувати також для створення або «трансгенних» тварин, або тварин з «виключеним» геном (тобто з дефіцитом гену), які, у свою чергу, можна застосовувати для створення та скринінгу терапевтичних агентів. Трансгенна тварина (наприклад, миша або щур) являє собою тварину, яка має клітини, що містять трансген, де трансген інтродукований у тварину або предка тварини на пренатальній, наприклад, ембріональній стадії. Трансген являє собою ДНК, інтегровану в геном клітини, з якої розвивається трансгенна тварина. В одному з варіантів здійснення винаходу кДНК, що кодує ТАТ, можна застосовувати для клонування геномної ДНК, що кодує ТАТ, відповідно до загальноприйнятих методів, і геномних послідовностей, застосовуваних для створення трансгенних тварин, які містять клітини, експресуючі ДНК, які кодують ТАТ. Методи створення трансгенних тварин, насамперед таких тварин як миші або щури, стали загальноприйнятими в даній галузі, і вони описані, наприклад, в U.S. 4736866 і 4870009. Як правило, для інтродукції в конкретні клітини-мішені трансгена ТАТ використовують тканеспецифічні енхансери. Трансгенних тварин, які несуть копію трансгена, що кодує ТАТ, інтродуковану в зародкову лінію тварини на ембріональній стадії, можна використовувати для оцінки впливу збільшеного рівня експресії ДНК, що кодує ТАТ. Таких тварин можна застосовувати як тва-

рин-тестери (тварин, призначених для контрольних досліджень) реагентів для розробки захисту, наприклад, від патологічних станів, пов'язаних з над експресією. Відповідно до цього варіанта здійснення винаходу тварини обробляють реагентом і зниження випадків патологічного стану в порівнянні з необробленими тваринами, що несуть трансген, може свідчити про можливе терапевтичне втручання у патологічний стан.

В іншому варіанті можна використовувати гомологи ТАТ з організмів крім людини для створення тварини з дефіцитом ТАТ, що має дефектний або змінений ген, який кодує ТАТ, у результаті гомологічної рекомбінації між ендogenous геном, який кодує ТАТ, і зміненою геномною ДНК, що кодує ТАТ, яка інтродукована в ембріональну стовбурну клітину тварини. Наприклад, кДНК, що кодує ТАТ, можна застосовувати для клонування геномної ДНК, що кодує ТАТ, за допомогою загальноприйнятих методів. Фрагмент геномної ДНК, що кодує ТАТ, можна вилучати шляхом делеції або заміняти іншим геном, наприклад, геном, що кодує селективний маркер, який можна застосовувати для моніторингу інтеграції. Як правило, декілька тисяч нуклеотидів незміненої фланкуючої ДНК (і на 5'-, і на 3'-кінцях) включають у вектор (див., наприклад, в Thomas і Capecchi, Cell, 51, 1987, с. 503 опис гомологічних рекомбінантних векторів). Вектор інтродукують у лінію ембріональних стовбурних клітин (наприклад, шляхом електропорації) і клітини, у які інтродукована ДНК, і відбирають клітини, у яких відбулася гомологічна рекомбінація з ендogenous ДНК (див., наприклад, Li та ін., Cell, 69, 1992, с. 915). Відібрані клітини потім ін'єктують у бластоцист тварини (наприклад, миші або щура) з одержанням агрегаційних химер (див., наприклад, Bradley, в: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, під ред. E. J. Robertson, з IRL, Oxford, 1987, сс. 113-152). Химерний ембріон можна потім імплантувати у придатну псевдовагітну самку, що утримується в лабораторії, і одержувати ембріон для створення тварини з «дефіцитом» гена. Потомство, що несе гомологічно рекомбіновану ДНК у зародкових клітинах, можна ідентифікувати за допомогою стандартних методів і використовувати для розведення тварин, у яких всі клітини містять одержану в результаті гомологічної рекомбінації ДНК. Тварини з «дефіцитом» гена можна характеризувати, наприклад, за їх здатністю захищатися від певних патологічних станів і за їх розвитком в патологічних умовах через відсутність ТАТ-поліпептиду.

Нуклеїнову кислоту, що кодує ТАТ-поліпептиди, можна застосовувати також у генній терапії. При застосуванні в генній терапії гени інтродукують у клітини для досягнення синтезу *in vivo* терапевтично ефективного генного продукту, наприклад, для заміни дефектного гена. «Генна терапія» включає як загальноприйняті методи генної терапії, при яких досягають пролонгованої дії шляхом однієї обробки, так і введення агентів для генної терапії, що включає однократне або повторне введення ДНК, що має терапевтичну дію, або мРНК. Антисмислові РНК і ДНК можна застосовувати як терапевтичні агенти для блокади експресії

певних генів *in vivo*. Відомі дані про те, що короткі антисмислові олігонуклеотиди можна застосовувати для імпорту в клітину, де вони проявляють інгібуючу дію, незважаючи на їх низькі внутрішньоклітинні концентрації, пов'язані з обмеженою здатністю проникати через клітинну мембрану (Zamecnik та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1986, сс. 4143-4146). Олігонуклеотиди можна модифікувати з метою підвищення їх проникаючої здатності, наприклад, шляхом заміни їх негативно заряджених фосфодіефірних груп на незаряджені групи.

Відомі різні методи інтродукції нуклеїнових кислот у життєздатні клітини. Методи залежать від того, чи здійснюють трансфекцію нуклеїнової кислотою клітин, що культивують, *in vitro*, або клітин необхідного хазяїна *in vivo*. Методи, придатні для переносу нуклеїнової кислоти в клітини ссавців *in vitro*, включають застосування ліпосом, електропорації, мікроін'єкції, клітинного злиття, ДЕАЕ-декстрану та осадження фосфатом кальцію й т.д. Кращий у цей час метод переносу генів *in vivo* включає трансфекцію вірусними (як правило, ретровірусними) векторами та опосередковану ліпосомою трансфекцію вірусним оболонковим білком (Dzau та ін., *Trends in Biotechnology* 11, 1993, сс. 205-210). У деяких ситуаціях потрібне створення джерела нуклеїнових кислот з використанням агента, що здійснює напрямлений переніс у клітини-мішені, такого як антитіло, що специфічне для білка мембрани клітинної поверхні або для клітини-мішені, ліганду для рецептора на клітині-мішені й т.д. Коли застосовують ліпосоми, білки, які зв'язуються з мембранним білком клітинної поверхні, асоційовані з ендоцитозом, можна застосовувати для напрямленого переносу і/або полегшення проникнення, наприклад, капсидні білки або їх фрагменти, які мають тропізм відносно конкретного типу клітин, антитіла до білків, які піддаються інтерналізації в круговороті, білки, які мають внутрішньоклітинну локалізацію та подовжують час напівжиття в клітині. Метод опосередкованого рецептором ендоцитозу описаний, наприклад, Wu та ін., *J. Biol. Chem.* 262, 1987, сс. 4429-4432; і Wagner та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1990, сс. 3410-3414. Огляд методів генного маркування та протоколів генної терапії наведений в Anderson та ін., *Science* 256, 1992, сс. 808-813.

Молекули нуклеїнових кислот, що кодують ТАТ-поліпептиди або їх фрагменти, представлені в даному описі, можна застосовувати для хромосомної ідентифікації. У цьому плані продовжує зберігатися необхідність в ідентифікації нових хромосомних маркерів, оскільки в цей час доступно відносно небагато нових реагентів для маркування хромосом, заснованих на фактичних даних про послідовності. Кожну кодуючу ТАТ молекулу нуклеїнової кислоти, пропоновану в даному винаході, можна використовувати як хромосомний маркер.

ТАТ-поліпептиди та молекули нуклеїнових кислот, пропоновані в даному винаході, можна застосовувати також при діагностики для типування тканин, оскільки експресія ТАТ-поліпептидів, пропонованих у даному винаході, може відбуватися по різному в різних тканинах, переважно по різно-

му в уражених захворюванням тканинах і здоровій тканині такого ж типу. Молекули нуклеїнових кислот ТАТ можуть знайти застосування при створенні зондів для ПЛР, Нозерн-блотингу, Саузерн-блотингу та Вестерн-блотингу.

Під обсяг даного винаходу підпадають способи скринінгу сполук для ідентифікації сполук, які є міметиками ТАТ-поліпептиду (агоністи) або які перешкоджають дії ТАТ-поліпептиду (антагоністи). Розроблені скринінгові аналізи перспективних лікарських засобів-антагоністів для ідентифікації сполук, які зв'язуються або утворюють комплекс із ТАТ-поліпептидами, що кодуються генами, ідентифікованими при створенні даного винаходу, або яким-небудь іншим способом впливають на взаємодію поліпептидів, що кодуються, з іншими клітинними білками, включаючи, наприклад, інгібування експресії ТАТ-поліпептиду в клітинах. Такі скринінгові аналізи повинні включати аналізи на основі масштабного скринінгу хімічних бібліотек, особливого придатних для ідентифікації низькомолекулярних перспективних лікарських засобів.

Аналізи слід виконувати в різних форматах, включаючи аналізи зв'язування типу білок-білок, біохімічні скринінгові аналізи, імунологічні аналізи та клітинні аналізи, які добре охарактеризовані в даній галузі.

Всі аналізи антагоністів є однаковими у тому плані, що в них здійснюють контакт перспективного лікарського засобу з ТАТ-поліпептидом, що кодується нуклеїновою кислотою, представленою в даному описі, в умовах і протягом часу, достатніх для того, щоб дозволити відбутися взаємодії між цими двома компонентами.

При аналізах зв'язування взаємодія являє собою зв'язування, і комплекс, що утворився, можна виділяти з реакційної суміші або виявляти в ній. У конкретному варіанті здійснення винаходу ТАТ-поліпептид, що кодується геном, представленим у даному описі, або перспективний лікарський засіб іммобілізують на твердій фазі, наприклад, титраційному мікропланшеті, шляхом ковалентного або нековалентного зв'язування. Нековалентне зв'язування, як правило, здійснюють шляхом нанесення покриття на тверду поверхню, використовуючи для цієї мети розчин ТАТ-поліпептиду, і сушіння. В іншому варіанті можна використовувати іммобілізоване антитіло, наприклад, моноклональне антитіло, специфічне для ТАТ-поліпептиду, яке підлягає іммобілізації, як якор для прикріплення до твердої поверхні. Аналіз здійснюють, додаючи неіммобілізований компонент, який можна мітити міткою, що виявляється, до іммобілізованого компонента, наприклад, сенсibilізованої поверхні, що містить прикріплений («заякорений») компонент. Після завершення реакції компоненти, що не прореагували, видаляють, наприклад, відмиванням, і виявляють комплекси, прикріплені до твердої поверхні. Коли у спочатку неіммобілізованого компонента з'являється мітка, що виявляється, іммобілізована на поверхні, це свідчить про те, що відбулося утворення комплексу. Коли у спочатку неіммобілізованого компонента не з'являється мітка, що виявляється, утворення комплексу можна виявляти, наприклад, за допомогою міченого антитіла, що

специфічно зв'язується з імобілізованим комплексом.

Якщо перспективна сполука взаємодіє, але не зв'язується з конкретним ТАТ-поліпептидом, що кодується геном, представленим у даному описі, то цю взаємодію з поліпептидом можна оцінювати за допомогою добре відомих методів виявлення взаємодій типу білок-білок. Такі аналізи засновані на традиційних підходах, таких, наприклад, як, перехресне зшивання, спільна імунопреципітація та спільне очищення в градієнтах на хроматографічних колонках. Крім того, взаємодії типу білок-білок можна оцінювати за допомогою заснованої на застосуванні дріжджів генетичної системи, описаної в Fields зі співавторами (Fields і Song, *Nature* (London), 340, 1989, сс. 245-246; Chien та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, сс. 9578-9582), відповідно до методу, описаному в Chevray та Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1991, сс. 5789-5793. Багато активаторів транскрипції, такі як GAL4 із дріжджів, складаються із двох фізично розділених доменів-модулів, один із яких діє як ДНК-з'єднуючий домен, а інший функціонує як домен активації транскрипції. Дріжджова система експресії, описана в наведених вище публікаціях (яку, як правило, позначають як «двогібридна система») має в цьому плані перевагу, і вона заснована на застосуванні двох гібридних білків, одного, у якому білок-мішень злитий із ДНК-зв'язуючим доменом GAL4, і іншого, у якому перспективний активуючий білок злитий із активуючим доменом. Експресія репортерного гена GAL1-lacZ під контролем GAL4 промотора, що активується, залежить від відновлення активності GAL4 через взаємодію типу білок-білок. Колонії, що містять взаємодіючі поліпептиди, виявляють за допомогою хромогенного субстрату для  $\beta$ -галактозидази. Повний набір (MATCHMAKER™) для ідентифікації взаємодій типу білок-білок між двома специфічними білками на основі застосування двох гібридів, надходить у продаж від фірми Clontech. Застосування цієї системи можна розширювати для картирування доменів білка, що приймають участь у специфічних білкових взаємодіях, а також для точного виявлення амінокислотних залишків, які мають вирішальне значення для цих взаємодій.

Сполуки, які впливають на взаємодію гена, що кодує ТАТ-поліпептид, представлений у даному описі, і інші внутрішньо- або позаклітинні компоненти, можна тестувати у такий спосіб: як правило, приготувлять реакційну суміш, що містить продукт гена та внутрішньо- або позаклітинний компонент, в умовах і протягом часу, які дають можливість відбутися взаємодії та сполученню двох продуктів. Для оцінки здатності перспективної сполуки інгібувати зв'язування, реакцію проводять за відсутності та за присутності досліджуваної сполуки. Крім того, у третю реакційну суміш, яка виконує функцію позитивного контролю, можна додавати плацебо. Зв'язування (утворення комплексу) між досліджуваною сполукою і внутрішньо- або позаклітинним компонентом, який є присутнім у суміші, оцінюють за допомогою описаного вище методу. Утворення комплексу в контрольній(их) реакції(ях), але не в реакційній суміші, що містить досліджувану сполу-

ку, свідчить про те, що досліджувана сполука впливає на взаємодію досліджуваної сполуки та її реакційного партнера.

Для аналізу антагоністів ТАТ-поліпептид можна додавати в клітину поряд із сполукою, що підлягає скринінгу щодо конкретного виду активності, і здатність сполуки інгібувати активність, що являє інтерес, у присутності ТАТ-поліпептиду свідчить про те, що сполука є антагоністом до ТАТ-поліпептиду. В іншому варіанті антагоністи можна виявляти шляхом об'єднання ТАТ-поліпептиду та потенційного антагоніста зі зв'язаними з мембраною рецепторами ТАТ-поліпептиду або рекомбінантного рецептора в умовах, придатних для аналізу конкурентного зв'язування. ТАТ-поліпептид можна мітити, наприклад, за допомогою радіоактивної мітки, для того, щоб кількість молекул ТАТ-поліпептиду, зв'язаних з рецептором, можна було використовувати для визначення ефективності потенційного антагоніста. Ген, що кодує рецептор, можна ідентифікувати численними методами, відомими спеціалістам у даній галузі, наприклад, шляхом пенінгу ліганду та FACS-аналізу (Coligan та ін., *Current Protocols in Immunol.*, 1(2), розділ 5, 1991). Переважно застосовують експресійне клонування, коли поліаденільовану РНК одержують із клітини, чутливої до ТАТ-поліпептиду, і створену із цієї РНК бібліотеку кДНК підрозділяють на пули та застосовують для трансфекції COS-клітин або інших клітин, нечутливих до ТАТ-поліпептиду. Трансфектовані клітини, які вирощують на скляних предметних стеклах, обробляють міченим ТАТ-поліпептидом. ТАТ-поліпептид можна мітити різними шляхами, включаючи йодування або інклюдію сайту, що розпізнається сайтспецифічною протеїніназою. Після фіксації та інкубації предметні стекла піддають авторадіографічному аналізу. Виявляють позитивні пули та одержують підпули та повторно трансфектують з використанням інтерактивного одержання підпулів і процесу повторного скринінгу, одержуючи зрештою один клон, який кодує передбачуваний рецептор.

Як інший метод ідентифікації рецептора мічений ТАТ-поліпептид можна на основі фотоафінності зв'язувати із клітинною мембраною або препаратами екстрактів, які експресують молекулу рецептора. Перехресно зшитий матеріал розділяють за допомогою ПААГ і експонують на рентгеновську плівку. Мічений комплекс, що містить рецептор, можна вирізати, розділити на пептидні фрагменти та здійснити мікросеквенування білка. Амінокислотну послідовність, одержану після мікросеквенування, можна застосовувати для створення набору вивірених олігонуклеотидних зондів для скринінгу бібліотеки кДНК із метою ідентифікації гена, який кодує передбачуваний рецептор.

В іншому методі аналізу антагоністів клітини ссавців або препарат мембран, експресуючих рецептор, можна інкубувати із міченим ТАТ-поліпептидом у присутності сполуки-«кандидата». Потім можна визначити здатність сполуки підвищувати або блокувати цю взаємодію.

Більш конкретними прикладами потенційних антагоністів є олігонуклеотид, що зв'язується зі

злиттями імуноглобуліну з ТАТ-поліпептидом, і, зокрема антитіла, включаючи (але не обмежуючись ними), полі- і моноклональні антитіла та фрагменти антитіл, одноланцюгові антитіла, антиідіотипічні антитіла та химерні або гуманізовані версії таких антитіл або фрагментів, а також людські антитіла та фрагменти антитіл. В іншому варіанті потенційний антагоніст може являти собою близькоспоріднений білок, наприклад, мутантну форму ТАТ-поліпептиду, який розпізнає рецептор, але немає ніякої ефективності, тим самим конкурентно інгібуючи дію ТАТ-поліпептиду.

Іншим потенційним антагоністом ТАТ-поліпептиду є антисмислова конструкція РНК або ДНК, одержана на основі антисмислової технології, коли, наприклад, молекула антисмислової РНК або ДНК діє, блокуючи безпосередньо трансляцію мРНК шляхом гібридизації із мРНК-мішенню та попереджаючи трансляцію білка. Антисмислову технологію можна використовувати для контролю генної експресії за допомогою утворення потрібної спіралі або антисмисловий ДНК або РНК, обидва ці методи засновані на зв'язуванні полінуклеотиду із ДНК або РНК. Наприклад, 5'-кодуючу ділянку полінуклеотидної послідовності, яка кодує зрілі ТАТ-поліпептиди, пропонувані у винаході, застосовують для створення олігонуклеотиду антисмислової РНК, що складається приблизно з 10-40 пар основ. Створюють олігонуклеотид ДНК, комплементарний ділянці гена, що приймає участь у транскрипції (потрібна спіраль - див. Lee та ін., *Nucl. Acids Res.*, 6, 1979, с. 3073; Cooney та ін., *Science*, 241, 1988, с. 456; Dervan та ін., *Science*, 251, 1991, с. 1360), тим самим перешкоджаючи транскрипції та виробництву ТАТ-поліпептиду. Олігонуклеотид антисмислової РНК гібридується із мРНК *in vivo* і блокує трансляцію молекули мРНК в ТАТ-поліпептид (антисмисловий - Okano, *Neurochem.*, 56, 1991, с. 560; *Oligodeoxynucleotide as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, вид-во CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Описані вище олігонуклеотиди можна вводити також у клітини, так що антисмислова РНК або ДНК може експресуватися *in vivo* і інгібувати виробництво ТАТ-поліпептиду. Коли застосовують антисмислову ДНК, то кращими є олігодезоксирибонуклеотиди, одержані із сайту ініціації трансляції, наприклад, приблизно від положення -10 і до положення +10 нуклеотидної послідовності гену-мішені.

Потенційні антагоністи являють собою невеликі молекули, які зв'язуються з активним сайтом, сайтом зв'язування рецептора або фактора росту або інших відповідних сайтів зв'язування ТАТ-поліпептидів, тим самим блокуючи нормальну біологічну активність ТАТ-поліпептиду. Прикладами невеликих молекул є (але не обмежуючись ними) невеликі пептиди або пептидоподібні молекули, переважно розчинні пептиди, і синтетичні непептидильні органічні або неорганічні сполуки.

Рибозими являють собою молекули РНК, які мають ферментативну активність та можуть каталізувати специфічне розщеплення РНК. Рибозими проявляють активність шляхом специфічної для послідовності гібридизації з комплементарною РНК-мішенню з наступним ендонуклеотичним ро-

зщепленням. Специфічні для рибозимів сайти розщеплення в потенційній РНК-мішені можна ідентифікувати відомими методами. Цей процес докладно описаний, наприклад, в Rossi, *Current Biology*, 4, 1994, сс. 469-471 і в публікації PCT WO 97/33551 (опублікована 18 вересня 1997 р.).

Молекули нуклеїнових кислот у структурі у вигляді потрібної спіралі, які застосовують для інгібування транскрипції, повинні бути одноланцюговими й складатися з дезоксинуклеотидів. Склад основ цих олігонуклеотидів створюють так, щоб він посилював утворення потрібної спіралі за допомогою правил спарювання основ Хугстена (Hoogsteen), при яких звичайно потрібні прийнятні за розмірами відрізки пуринів або піримідинів на одному ланцюзі дуплекса. Більш докладно див, наприклад, у публікації PCT WO 97/33551, вище.

Ці невеликі молекули можна ідентифікувати будь-яким одним або декількома скринінговими аналізами, описаними вище, і/або будь-якими іншими методами скринінгу, відомими спеціалістам у даній галузі.

Виділену нуклеїнову кислоту, що кодує ТАТ-поліпептид, можна застосовувати для рекомбінантного одержання ТАТ-поліпептиду за допомогою методів, добре відомих у даній галузі та представлених у даному описі. У свою чергу, одержані ТАТ-поліпептиди можна застосовувати для створення антитіл до ТАТ за допомогою методів, добре відомих у даній галузі та представлених у даному описі.

Антитіла, які специфічно зв'язуються з ТАТ-поліпептидом, пропонувані у даному винаході, а також інші молекули, ідентифіковані за допомогою описаного вище скринінгового аналізу, можна вводити для лікування різних захворювань, включаючи рак, у формі фармацевтичних композицій.

Якщо ТАТ-поліпептид є внутрішньоклітинним і як інгібітори застосовують повні антитіла, то кращими є антитіла, які інтерналізуються. Однак для введення антитіла або фрагмента антитіла в клітину можна застосовувати також методи ліпофекції або використовувати ліпосоми. Якщо використовують фрагменти антитіл, то кращим є найменший фрагмент, що має інгібуючу активність, який специфічно зв'язується із доменом білка-мішені. Наприклад, ґрунтуючись на даних про послідовності варіабельної ділянки антитіла, можна створювати молекули, які зберігають здатність зв'язуватися з послідовністю білка-мішені. Такі пептиди можна синтезувати хімічно і/або одержувати за допомогою методу рекомбінантної ДНК (див., наприклад, Marasco та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1993, сс. 7889-7893).

Препаративна форма, пропонувана в даному винаході, може містити також більше однієї діючої речовини, якщо це необхідно для конкретного показання, що підлягає лікуванню, переважно речовини, що мають додаткові види активності, які негативно не впливають одна на одну. В іншому або додатковому варіанті композиція може містити агент посилюючий її функцію, такий, наприклад, як цитотоксичний агент, цитокін, хіміотерапевтичний агент, агент, що інгібує ріст. Такі молекули повинні

бути присутнім у комбінації в кількостях, ефективних відносно поставленої мети.

Нижче винахід проілюстрований за допомогою прикладів, які не обмежують його обсяг. Зміст всіх процитованих в описі документів, у всій повноті включений в даний опис як посилання.

#### Приклади

Реагенти, які надходять до продажу, зазначені в прикладах, застосовували відповідно до інструкцій виробника, якщо не зазначено інше. Клітини, зазначені в наведених нижче прикладах і у описі, які позначені під реєстраційними номерами ATCC, одержані з Американської колекції типових культур, Манассас, шт. Вірджинія.

Приклад 1: Визначення профілю експресії в тканинах за допомогою GeneExpress®

Запатентовану базу даних, що містить інформацію про експресію генів (GeneExpress®, фірма Gene Logic Inc., Геттисберг, шт. Мериленд) аналізували з метою ідентифікації поліпептидів (і нуклеїнових кислот, що їх кодують), експресія яких у значному і придатному для виявлення ступені позитивно регулювалася в конкретній(их), людській(их) пухлинній(их) тканині(ах), що являє(ють) інтерес, у порівнянні з іншою(ими) людською(ими) пухлинною(ими) тканиною(нами) і/або здоровими людськими тканинами. Зокрема, аналіз бази даних GeneExpress® здійснювали, використовуючи або програмне забезпечення, одержане від фірми Gene Logic Inc., Геттисберг, шт. Мериленд, у сполученні з базою даних GeneExpress®, або власне програмне забезпечення, розроблене та написане на фірмі Genentech, Inc. для застосування в сполученні з базою даних GeneExpress®. Розрахункові величини позитивних відповідей в аналізі засновані на декількох критеріях, включаючи, наприклад, тканинну специфічність, пухлинну специфічність і рівень експресії в практично здорових і/або таких, що мають звичайний рівень проліферації, тканинах. Наведені нижче молекули мають профіль експресії, що характеризується високим рівнем експресії в тканині та значною та відтворюваною, придатною для виявлення підвищувальною регуляцією експресії в конкретній(их) людській(их) пухлині або пухлинах у порівнянні з іншою(ими) людською(ими) пухлиною(ами) і/або здоровими людськими тканинами та необов'язково відносно невисоким рівнем експресії у практично здорових і/або таких, що мають звичайний рівень проліферації, тканинах.

За допомогою описаного вище аналізу експресії виявлена значна, відтворювана та придатна для виявлення надекспресія мРНК, що кодує поліпептид TAT10772, при певних типах злоякісних захворювань яєчника людини, пухлинах молочної та підшлункової залози у порівнянні з відповідними здоровими тканинами яєчника, молочної та підшлункової залози відповідно.

#### А. Яєчник

У першому експерименті експресію TAT10772 аналізували у групі, що складається з 89 незалежно одержаних зразків здорової тканини людських яєчників. Результати цього аналізу продемонстрували, що рівень експресії мРНК TAT10772 у всіх зразках здорової тканини людських яєчників був у

значній мірі постійним і характеризувався дуже тісним розподілом, при цьому рівень експресії TAT10772 у здоровій тканині людських яєчників не перевищував більш ніж в 6 разів середній рівень експресії TAT10772 у групі зразків у цілому.

Для кількісного порівняння аналізували також рівень експресії TAT10772 у різних одержаних незалежно один від одного зразках злоякісної тканини людських яєчників. Одержані в цих аналізах результати продемонстрували, що рівень експресії TAT10772 у зразках злоякісної тканини в значній мірі варіювався, при цьому у великій кількості зразків злоякісної тканини виявлено принаймні 6-кратне (максимум приблизно 580-кратне) підвищення рівня експресії TAT10772 у порівнянні із середнім рівнем експресії TAT10772 у групі проаналізованих зразків здорової тканини. Більш конкретно, така, що виявляється та відтворювана надекспресія TAT10772 виявлена в зразках зазначених нижче типів раку яєчника в порівнянні зі зразками здорового яєчника (де числа в дужках для кожного типу раку показують кількість незалежних зразків, у яких виявлене принаймні 6-кратне збільшення рівня експресії TAT10772 у порівнянні із середнім рівнем експресії TAT10772 у проаналізованій групі зразків здорової тканини яєчників/загальну кількість проаналізованих незалежних зразків пухлинних тканин): аденокарцинома ендометрію (13/17), серозна цистаденокарцинома, включаючи папілярну (52/57) і аденокарциному паренхіматозних клітин (7/10). Для підтвердження цих результатів проводили додаткові експерименти.

#### Б. Молочна залоза

В іншому експерименті експресію TAT10772 аналізували в групі, що складається з 22 незалежно одержаних зразків здорової тканини людської молочної залози. Результати цього аналізу продемонстрували, що рівень експресії мРНК TAT10772 у всіх зразках здорової тканини людської молочної залози був у значній мірі постійним і характеризувався дуже вузьким розподілом, при цьому рівень експресії TAT10772 у здоровій тканині людської молочної залози не перевищував більш ніж в 2 рази середній рівень експресії TAT10772 у групі зразків у цілому.

Для кількісного порівняння аналізували також рівень експресії TAT10772 у різних одержаних незалежно один від одного 209 зразках людської HER-2-негативної карциноми, що інфільтрується, протоків молочної залози. Одержані в цих аналізах результати продемонстрували, що рівень експресії TAT10772 у зразках злоякісної тканини в значній мірі варіювався, при цьому в 76 з 209 зразків злоякісної тканини виявлено принаймні 2-кратне (максимум приблизно 15-кратне) підвищення рівня експресії TAT10772 у порівнянні із середнім рівнем експресії TAT10772 у групі проаналізованих зразків здорової тканини молочної залози.

#### В. Підшлункова залоза

В іншому експерименті експресію TAT10772 аналізували в групі, що складається з 51 незалежно одержаного зразка здорової тканини людської підшлункової залози. Результати цього аналізу продемонстрували, що рівень експресії мРНК

TAT10772 у всіх зразках здорової тканини людської підшлункової залози був у значній мірі постійним і характеризувався дуже тісним розподілом, при цьому рівень експресії TAT10772 у здоровій тканині людської підшлункової залози не перевищував більш ніж в 2 рази середній рівень експресії TAT10772 у групі зразків у цілому.

Для кількісного порівняння аналізували також рівень експресії TAT10772 в 65 одержаних незалежно один від одного зразках злоякісної тканини аденокарциноми підшлункової залози людини. Одержані в цих аналізах результати продемонстрували, що рівень експресії TAT10772 у зразках злоякісної тканини в значній мірі варіювався, при цьому в 33 з 65 зразків злоякісної тканини виявлене принаймні 2-кратне (максимум приблизно 21-кратне) підвищення рівня експресії TAT10772 у порівнянні із середнім рівнем експресії TAT10772 у групі проаналізованих зразків здорової тканини підшлункової залози.

З урахуванням наведених вище даних ясно, що поліпептид TAT10772 і нуклеїнова кислота, яка кодує цей поліпептид, являють собою дуже гарні моделі, які можна застосовувати для кількісного і якісного визначення рівня експресії поліпептиду TAT10772 і мРНК, що кодує його, у різних зразках тканин ссавців, що дає можливість здійснювати їх кількісне і якісне порівняння. Таким чином, поліпептид TAT10772 і нуклеїнова кислота, яка кодує цей поліпептид, являють собою молекули, унікальний профіль експресії яких можна застосовувати для діагностики певних типів злоякісних пухлин у ссавців, як представлено в даному описі. Крім того, оскільки цей аналіз продемонстрував, що для поліпептиду TAT10772 характерна значна, відтворювана та придатна для виявлення надекспресія в певних пухлинах людини в порівнянні з відповідними здоровими людськими тканинами, поліпептид TAT10772 є дуже гарною мішенню, яку можна застосовувати для терапевтичного лікування таких пухлин у ссавців.

Приклад 2: Аналіз мікрорядів для виявлення підвищувальної регуляції TAT-поліпептидів у злоякісних пухлинах

Мікроряди нуклеїнових кислот, які часто містять тисячі генних послідовностей, можна застосовувати для ідентифікації генів, які по-різному експресуються в уражених хворобою тканинах і їх здорових копіях. Використовуючи мікроряди нуклеїнових кислот, досліджувані та контрольні зразки мРНК із досліджуваних і контрольних зразків тканин піддавали зворотній транскрипції та мітили для створення кДНК-зондів. Потім кДНК-зонди гібридували з рядом нуклеїнових кислот, іммобілізованих на твердій підкладці. Створювали таку конфігурацію ряду, щоб послідовність і положення кожного члена ряду було відомим. Наприклад, на твердій підкладці можна іммобілізувати ряди відібраних генів, які, як відомо, експресуються при певних хворобливих станах. Гібридизація міченого зонду з конкретним членом ряду свідчить про те, що зразок, з якого одержаний зонд, експресує зазначений ген. Якщо сигнал гібридизації зонду з досліджуваного (хвора тканина) зразка вище, ніж сигнал гібридизації зонду з контрольного (здорова

тканина) зразка, то виявлений ген або гени, що надекспресуються у хворій тканині. Важливість цього результату полягає в тому, що білок, для якого характерна надекспресія у хворій тканині, можна застосовувати не тільки як діагностичний маркер присутності хворобливого стану, але також як терапевтичну мішень для лікування хворобливого стану.

Методологія гібридизації нуклеїнових кислот і метод створення мікрорядів добре відомі в даній галузі. Докладні конкретні дані про одержання нуклеїнових кислот для гібридизації та зондів, підготовки слайдів і про умови гібридизації, які застосовували в даному прикладі, наведені в заявці на патент РСТ сер. №. РСТ/US01/10482, що подана 30 березня 2001 р., яка включена в даний опис як посилання.

У даному прикладі оцінювали підвищувальну регуляцію експресії генів у злоякісних пухлинах, одержаних з різних людських тканин, у порівнянні зі злоякісними пухлинами з інших типів тканин і/або незлоякісними людськими тканинами з метою ідентифікації поліпептидів, які надекспресуються в конкретній(их) злоякісній(их) пухлині(ях). У деяких експериментах одержували тканину злоякісної людської пухлини та незлоякісної людської пухлини одного і того самого типу (часто одного і того самого пацієнта) і аналізували відносно експресії TAT-поліпептиду. Крім того, одержували тканину злоякісної людської пухлини, що належить до будь-якого іншого типу людських пухлин, і порівнювали зі зразком «універсальної» епітеліальної контрольної тканини, яку одержували, поєднуючи незлоякісні людські тканини епітеліального походження різних органів, включаючи печінку, нирку та легеню. мРНК, виділена з об'єднаних епітеліальних тканин, являє собою суміш генних продуктів, що експресуються із численних різних епітеліальних тканин, являючи тим самим дуже гарний негативний контроль, з яким проводять кількісне порівняння рівнів експресії генів у пухлинах епітеліального походження. Експерименти з гібридизації мікрорядів з використанням об'єднаних контрольних зразків дозволяли одержувати лінійний графік для 2-кольорового аналізу. Потім крутість нахилу створеного графіка для 2-кольорового аналізу застосовували в кожному експерименті для стандартизації співвідношень (виявлено в досліджуваному зразку:контролі). Стандартизовані співвідношення, одержані в різних експериментах, потім порівнювали та застосовували для ідентифікації експресії генів, що входять до кластеру. Таким чином, об'єднаний «універсальний контроль» не тільки дозволяє ефективно визначати експресію генів у зразку при порівнянні 2-х зразків, але дозволяє також здійснювати порівняння декількох зразків у декількох експериментах.

У наведених у даному прикладі експериментах нуклеїнові кислоти-зонди, одержані із представлених у даному описі нуклеотидних послідовностей, що кодують TAT-поліпептид, застосовували для створення мікрорядів, і РНК із різних пухлинних тканин застосовували для гібридизації з ними. Величину, одержану як стандартизоване співвідношення:експериментальне співвідношення, позна-

чили як «співвідношення, що відсікає». Як значимі розглядали тільки співвідношення, що перевищують співвідношення, що відсікає. Рівень значимості співвідношень визначали, виходячи з рівня шуму або розкиду для кожного експерименту, але, як правило, 1,8-2-кратне співвідношення, що відсікає, або більш високе співвідношення, що відсікає, використовували для ідентифікації генів-кандидатів при порівнянні відносного рівня надекспресії у зразках пухлини та у зразках відповідної здорової тканини і/або в об'єднаному універсальному контролі здорової епітеліальної тканини. Співвідношення для ідентифікованих таких генів, для яких характерна надекспресія в зразках пухлини, варіювали від 2- до 40-кратного або навіть ще більш високого. Для порівняння, у контрольному експерименті, у якому цю ж РНК мітили кожним із застосовуваних кольорів і гібридизували із собою ж, практично для всіх генів, сигнали яких перевищували фоновий рівень, одержане співвідношення було істотно нижче 1,8. Це свідчить про те, що експериментальний шум, що перевищує 1,8-кратне співвідношення, є надзвичайно низьким і що виявлене 1,8-кратне або навіть більш висока зміна є істотною і, як передбачається, відбиває реальне, придатне для виявлення та відтворене розходження експресії між порівнюваними та аналізованими зразками.

Результати цих експериментів демонструють, що для мРНК, що кодує поліпептид TAT10772, характерна надекспресія (тобто, принаймні 2-кратна) в 8 з 10 взятих незалежно зразках пухлини яєчника людини при порівнянні як зі здоровою тканиною яєчника людини, так і з об'єднаним контрольным зразком епітеліальної тканини. Ці дані демонструють також, що виявлена надекспресія є значимою, такою, що виявляється та відтвореною при оцінці множини зразків пухлини яєчника людини при порівнянні як зі здоровою тканиною яєчника людини, так і з об'єднаним контрольным зразком епітеліальної тканини. Як описано вище, ці дані демонструють, що поліпептид TAT10772, який пропонується у даному винаході, і нуклеїнову кислоту, яка його кодує, можна застосовувати не тільки як діагностичні маркери присутності у людини пухлин яєчника, але також як потенційні терапевтичні мішені для лікування цього типу раку в людини.

Приклад 3: Кількісний аналіз експресії мРНК TAT

У цьому досліді 5'-нуклеазний аналіз (наприклад, за допомогою TaqMan®) і кількісну ПЛР у реальному часі (наприклад, за допомогою ABI Prism 7700 Sequence Detection System® (фірма Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Фостер Сіті, шт. Каліфорнія) застосовували для пошуку генів, для яких характерна виражена надекспресія в злоякісній пухлині або пухлинах у порівнянні з іншими злоякісними пухлинами та здоровою незлоякісною тканиною. Аналіз реакції 5'-нуклеази являв собою флуоресцентний, заснований на застосуванні ПЛР метод, що дозволяє використовувати 5'-екзонуклеазну активність ферменту ДНК-полімерази Taq для моніторингу експресії гена у реальному часі. Два олігонуклеотидних праймера

(послідовності яких засновані на послідовності гена, що являє інтерес, або EST) застосовували для створення амплікону, типового для ПЛР. Створювали третій олігонуклеотид або зонд для виявлення нуклеотидної послідовності, локалізованої між двома ПЛР-праймерами. Зонд не «розтягувався» ДНК-полімеразою Taq і його мітили флуоресцентним барвником-репортером і флуоресцентним барвником-гасителем. Будь-яке індуковане лазером випромінювання барвника-репортера гаситься барвником-гасителем, коли два барвники локалізовані близько один до одного, тобто знаходяться на одному зонді. У процесі реакції ПЛР-ампліфікації ДНК-полімераза Taq розщеплює зонд залежно від матриці. Фрагменти зонду, що утворилися, дисоціюють у розчин і сигнал, що випускається барвником-репортером, вільний від гасильної дії другого флуорофору. Одна молекула барвника-репортера вивільняється з кожної знову синтезованої молекули, і виявлення незагашеного сигналу барвника-репортера є основою для кількісної і якісної інтерпретації даних. Цей метод аналізу добре відомий і його звичайно застосовують у даній галузі для кількісної ідентифікації розходжень в експресії генів у двох різних зразках людських тканин, див., наприклад, Higuchi та ін., *Biotechnology* 10, 1992, сс. 413-417; Livak та ін., *PCR Methods Appl.*, 4, 1995, сс. 357-362; Heid та ін., *Genome Res.* 6, 1996, сс. 986-994; Pennica та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(25), 1998, сс. 14717-14722; Pitti та ін. *Nature* 396(6712), 1998, сс. 699-703 і Bieche та ін., *Int. J. Cancer* 78, 1998, сс. 661-666.

Аналіз реакції, яка каталізується 5'-нуклеазою, здійснюють за допомогою пристрою для кількісної ПЛР у реальному часі, такого як ABI Prism 7700TM Sequence Detection. Система складається з термокомірки, лазера, камери із зарядовим зв'язком (CCD) і комп'ютера. Система дозволяє ампліфікувати зразки в 96-лунковому форматі в термокомірці. У процесі ампліфікації індукований лазером флуоресцентний сигнал у всіх 96 лунках збирають у реальному часі через оптико-волоконні кабелі та детектують в CCD. Система оснащена програмним забезпеченням для роботи пристрою та аналізу даних.

Вихідним матеріалом для скринінгу була мРНК, виділена з різних злоякісних тканин. мРНК попередньо піддавали кількісній оцінці, наприклад, флуорометрично. Як негативний контроль використовували РНК, виділену з різних здорових тканин того ж типу, що й злоякісна тканина, яка підлягає дослідженню. Як правило, зразок(и) пухлини безпосередньо порівнювали з «сумісними» зразками здорової тканини того ж типу, це означає, що зразки пухлини й здорової тканини одержані з одного і того самого індивідуума.

Дані, одержані при аналізі реакції, що каталізується 5'-нуклеазою, спочатку виражали у вигляді Ct або граничного циклу. Його визначали як цикл, при якому сигнал репортера накопичується на рівні, що перевищує фоновий рівень флуоресценції. Значення ACt застосовували як кількісну міру щодо числа вихідних копій конкретної послідовності-мішені в зразку нуклеїнової кислоти при порівнянні

результатів, одержаних для мРНК ракової тканини та мРНК здорової людської тканини.

Оскільки одна одиниця Ct відповідає одному ПЦР-циклу або приблизно 2-кратному відносному підвищенню у порівнянні з нормою, дві одиниці відповідають 4-кратному підвищенню, 3 одиниці відповідають 8-кратному відносному підвищенню й т.д., то можна якісно та кількісно оцінювати відносну кратність підвищення рівня експресії мРНК між двома або більшою кількістю різних тканин. Саме тому, як добре відомо в даній галузі, цей аналіз є в достатньому ступені чутливим і дозволяє з достатнім ступенем відтворюваності визначати принаймні 2-кратне підвищення рівня експресії мРНК у зразку людської пухлини в порівнянні з контрольним зразком здорової тканини.

За допомогою цього методу було встановлено, що для мРНК, яка кодує поліпептид TAT10772, характерна значима та відтворювана над експресія (тобто принаймні 2-кратна) в 9 з 10 взятих незалежно зразках пухлини яєчника людини при порівнянні як зі зразками здорової тканини яєчника людини, взятої в різних донорів, так і з «сумісними» зразками незлоякісної пухлини яєчника людини, які одержані із тканини того ж донора, що зразки пухлинної тканини. Як описано вище, ці дані демонструють, що поліпептид TAT10772, пропонований у даному винаході, і нуклеїнову кислоту, що його кодує, можна застосовувати не тільки як діагностичні маркери присутності у людини пухлин яєчника, але також як потенційні терапевтичні мішені для лікування цього типу раку у людини.

#### Приклад 4: Гібридизація in situ

Гібридизація in situ являє собою ефективний і багатобічний метод виявлення й локалізації нуклеотидних послідовностей у препаратах клітини або тканини. Його можна застосовувати, наприклад, для ідентифікації сайтів експресії генів, аналізу розподілення в тканині транскрипції, ідентифікації та локалізації вірусного зараження, для виявлення змін у специфічній синтезі мРНК і для хромосомного картирування.

Гібридизацію in situ здійснювали з використанням оптимізованої версії протоколу, описаного в Lu і Gillett, Cell Vision 1, 1994, сс. 169-176, застосовуючи одержані з використанням ПЛР мічені за допомогою <sup>33</sup>P-рибозонди. У цілому, метод полягає у наступному: робили зрізи фіксованих у формаліні, залитих у парафін людських тканин, вилучали парафін, вилучали білки за допомогою протеїнази К (20 г/мл) протягом 15 хв. при 37°C, а потім додатково обробляли для гібридизації in situ відповідно до методу, що описаний у Lu і Gillett, вище. Мічений за допомогою [<sup>33</sup>-P] антисмисловий УТФ-рибозонд створювали із ПЛР- продукту та гібридували при 55°C протягом ночі. Слайди занурювали в емульсію типу Kodak NTB2 для виявлення ядерних треків і експонували протягом 4 тижнів.

#### Синтез <sup>33</sup>P-рибозонда

6,0мкл (125 мКи) <sup>33</sup>P-УТФ (Amersham BF 1002, SA<2000 Ки/ммоль) швидко сушили у вакуумі. У кожну пробірку з висушеним <sup>33</sup>P-УТФ додавали наступні інгредієнти:

2,0мкл 5× буфера для транскрипції,

1,0мкл ДТТ (100мМ)  
2,0мкл суміші нуклеозид-5'-трифосфатів (НТФ) (2,5мМ: 10мкл; кожного по 10мМ ГТР, ЦТФ і АТФ+10мкл H<sub>2</sub>O)  
1,0мкл УТФ (50мкМ)  
1,0мкл Rnasin  
1,0мкл ДНК-матриці (1мкг)  
1,0мкл H<sub>2</sub>O  
1,0мкл РНК-полімерази (для ПЦР-продуктів T3=AS, T7=S, як правило).

Пробірки інкубували при 37°C протягом 1 год. Додавали 1,0мкл ДНКази RQ1, потім інкубували при 37°C протягом 15 хв. Додавали 90мкл ТЕ (10мМ Трис, рН 7,6/1мМ ЕДТК, рН 8,0) і суміш наносили за допомогою піпетки на папір типу DE81. Розчин, що залишився, вносили в пристрій для ультрафільтрації типу Microcon-50 і центрифугували з використанням програми 10 (6 хв.). Фільтруючий пристрій перевертали на другу пробірку та центрифугували з використанням програми 2 (3 хв.). Після кінцевого центрифугування для виділення додавали 100мкл ТЕ. 1мкл кінцевого продукту наносили за допомогою піпетки на папір типу DE81 і підраховували радіоактивність в 6мл Biofluor II.

Зонд піддавали електрофорезу на гелі TBE/сечовині. 1-3мкл зонду або 5мкл РНК Mrk III додавали до 3мкл буфера для завантаження. Після витримування при 95°C у нагрівальному блоці протягом 3 хв. зонд негайно переносили на лід. Лунки з гелем промивали, вносили зразок і здійснювали процес при 180-250 В протягом 45 хв. Гель загортали в саранову обгортку та експонували на XAR-плівку з посилюючим екраном у заморожувальному пристрої при -70°C протягом проміжку часу від 1 год. до всієї ночі.

#### <sup>33</sup>P-Гібридизація

##### А. Попередня обробка заморожених зрізів

Слайди виймали із заморожувального пристрою, поміщали в алюмінієві піддони та давали відтавати при кімнатній температурі протягом 5 хв. Піддони поміщали в інкубатор з температурою 55°C на 5 хв. для зниження конденсації. Слайди фіксували протягом 10 хв. в 4%-ому параформальдегіді на льоді в димовій витяжній шафі й промивали 0,5×SSC протягом 5 хв. при кімнатній температурі (25мл 20×SSC + 975мл SQ H<sub>2</sub>O). Після видалення білків у присутності 0,5мкг/мл протеїнази К протягом 10 хв. при 37°C (12,5мкл маточного розчину з концентрацією 10мг/мл в 250мл попередньо нагрітого вільного від РНКази буфера для РНКази), зрізи промивали 0,5×SSC протягом 10 хв. при кімнатній температурі. Зрізи дегідрували в 70%, 95%, 100%-ому етанолі, витримуючи по 2 хв. у кожному.

##### Б. Попередня обробка залитих у парафін зрізів

Зі слайдів вилучали парафін, поміщали в SQ H<sub>2</sub>O і промивали двічі в 2×SSC при кімнатній температурі по 5 хв. щоразу. У зрізах вилучали білки в присутності 20мкг/мл протеїнази К (500мкл попередньо нагрітого вільного від РНКази буфера для РНКази; 37°C, 15 хв.) - людський ембріон, або в присутності 8-кратного розчину протеїнази К (100мкл попередньо нагрітого вільного від РНКази буфера для РНКази; 37°C, 305 хв.) - тканини, об-



роблені формаліном. Наступне відмивання в 0,5×SSC і дегідратацію здійснювали відповідно до описаного вище методу.

#### В. Попередня гібридизація

Слайди вносили в пластмасову коробку, вистелену фільтрувальним папером, насиченим Вох-буфером (4×SSC, 50% формаміду).

#### Г. Гібридизація

Зонд ( $1,0 \times 10^6$  імпульсів на хв.) і 1,0мкл тРНК (маточний розчин з концентрацією 50мг/мл) на слайд витримували при 95°C протягом 3 хв. Слайди охолоджували на льоді, додавали по 48мкл буфера для гібридизації на слайд. Після струшування додавали 50мкл міченої за допомогою  $^{33}\text{P}$  суміші до 50мкл одержаного на стадії попередньої гібридизації продукту на слайд. Слайди інкубували протягом ночі при 55°C.

#### Д. Відмивання

Відмивання здійснювали 2×10 хв. за допомогою 2×SSC, ЕДТК при кімнатній температурі (400мл 20×SSC + 16мл 0,25М ЕДТК,  $V_i=4$  л), з наступною обробкою РНКазою А 37°C протягом 30 хв. (500мкл, 10мг/мл в 250мл буферу для РНКази (20мг/мл)). Слайди промивали 2×10 хв. за допомогою 2×SSC, ЕДТК при кімнатній температурі. Використовували наступні строги умови відмивання: 2 год. при 55°C, 0,1×SSC, ЕДТК (20мл 20×SSC + 16мл ЕДТК,  $V_i=4$  л).

#### Е. Олігонуклеотиди

Аналіз *in situ* здійснювали з різними послідовностями ДНК, представленими в даному описі. Застосовувані в цих аналізах олігонуклеотиди одержували так, щоб вони були комплементарні нуклеїновим кислотам (або їх компонентам), представленим нижче на кресленнях.

#### Є. Результати

Відносно експресії TAT10772 у здорових людських тканинах сильна експресія виявлена в слизовій бронхів і підслизових залозах. Однак у всіх інших здорових людських тканинах експресія TAT10772 не виявлена. На противагу цьому, виражена експресія TAT10772 була виявлена в 13 з 15 вивчених зразків пухлини яєчника людини (аденокарцинома та поверхневі епітеліальні пухлини). Крім того, виражена експресія TAT10772 була виявлена також в 8 з 9 зразків людської аденокарциноми матки.

Приклад 5: Одержання антитіл, які зв'язуються з TAT10772

У цьому прикладі продемонстроване одержання моноклональних антитіл, які специфічно зв'язуються з TAT10772.

Методи одержання моноклональних антитіл відомі в даній галузі та описані, наприклад, у Goding, вище. Імуногени, які можна застосовувати, включають очищений TAT, злиті білки, що містять TAT, і клітини, експресуючі рекомбінантний TAT на клітинній поверхні. Вибір імуногена може здійснювати спеціаліст у даній галузі без зайвих експериментів.

Мишей, таких як миші лінії Balb/c, імунізували імуногеном TAT, який емульгували у повному ад'юванті Фрейнда, і ін'єктували підшкірно або внутрішньочеревно в кількості 1-100мкг. В іншому варіанті імуноген емульгували в ад'юванті MPL-

TDM (фірма Ribi Immunochemical Research, Гамільтон, шт. Монтана) і ін'єктували в подушечку задньої лапи тварин. Потім імунізованих мишей через 10-12 днів піддавали бустер-ін'єкції додатковою дозою імуногена, емульгованого в вибраному ад'юванті. Потім протягом декількох тижнів мишей піддавали ще додатковій імунізації за допомогою бустер-ін'єкції. Періодично одержували зразки сироватки, шляхом взяття крові із заочноямокрової ділянки мишей з метою виявлення за допомогою ELISA антитіл до TAT.

Після визначення титру відповідного антитіла тваринам, які дали «позитивну» реакцію на антитіла, можна робити останню внутрішньочеревну ін'єкцію TAT. Через 3-4 дні мишей умертвляли та збирали клітини селезінки. Потім клітини селезінки зливали (за допомогою 35%-вого поліетиленгліколю) з вибраною лінією клітин мишачої мієломи, такою як P3X63AgU.1, що одержували з ATCC, No. CRL 1597. У результаті злиття одержували клітини гібридоми, які можна потім висівати в 96-ямові планшети для культури тканини, що містять НАТ-середовище (гіпоксантин, аміноптерин і тимідин) для інгібування проліферації незлитих клітин, гібридів мієломи та гібридів клітин селезінки.

Клітини гібридоми піддавали скринінгу за допомогою ELISA відносно реактивності до TAT. Виявлення клітин гібридоми, що дають «позитивну» реакцію та секретують необхідні моноклональні антитіла до TAT, відомо спеціалісту у даній галузі.

Клітини гібридоми, що дають позитивну реакцію, можна вводити внутрішньочеревно сингенним мишам лінії Balb/c для одержання асцитів, що містять моноклональні антитіла до TAT. В іншому варіанті клітини гібридоми можна вирощувати в колбах для культури тканини або ролер-флаконах. Очищення моноклональних антитіл, одержаних в асцитах, можна здійснювати осадженням сульфатом амонію з наступною гель-фільтрацією. В іншому варіанті можна застосовувати афінну хроматографію, засновану на зв'язуванні антитіла із протеїном А або протеїном G.

За допомогою описаного вище методу можна створювати 11 окремих і відмінних одна від одної ліній клітин гібридом, кожна з яких продукує моноклональні антитіла, що зв'язуються з поліпептидом TAT10772. Ці 11 ліній клітин гібридом позначені в даному описі як 16F7.1.15 (що продукує моноклональне антитіло 16F7), 17A8.1.3 (що продукує моноклональне антитіло 17A8), 9F3.1.3 (що продукує моноклональне антитіло 9F3), 16E12.2.15 (що продукує моноклональне антитіло 16E12), 16A7.1.3 (що продукує моноклональне антитіло 16A7), 10G11.1.1 (що продукує моноклональне антитіло 10G11), 5B10 (що продукує моноклональне антитіло 5B10), 11D10.1.14 (що продукує моноклональне антитіло 11D10), 5F6.1.24 (що продукує моноклональне антитіло 5F6), 7G6.2.6 (що продукує моноклональне антитіло 7G6) та 3A5.3 (що продукує моноклональне антитіло 3A5.3). За допомогою добре відомих і звичайно застосовуваних методів, таких як Вестер-блоттинг, ELISA, FACS-сортування, клітин, які експресують поліпептид TAT10772, і/або імуногістохімічних аналізів, встановлено, що моноклональні антитіла, які продуку-

ються цими 11 лініями гібридом, зв'язуються з поліпептидом TAT10772. З 11 ліній гібридами, які продукують функціонально активні моноклональні антитіла до TAT10772, двох (клони гібридом 11D10.1.14 і 3A5.3) депоновані відповідно до Будапештського договору в Американській колекції тканинних культур, Манассас, шт. Віргінія, як докладно описано нижче.

Приклад 6: Аналіз конкурентного зв'язування та картирування епітопів

Епітопи TAT10772, які зв'язуються моноклональними антитілами, визначали з використанням стандартного аналізу конкурентного зв'язування (Fetidly та ін., Cancer Research 50, 1990, сс. 1550-1558). Оцінку перехресного зв'язування здійснювали з використанням антитіл шляхом безпосереднього вимірювання флуоресценції на інтактних клітинах лінії PC3, сконструйованих для експресії TAT10772, за допомогою пристрою для кількісної оцінки флуоресценції типу PANDEX™ Screen Machine. Кожне моноклональне антитіло кон'югували з флуоросциннізотіоціанатом (ФІТЦ) за допомогою загальноприйнятих методик (Wofsy та ін., Selected Methods in Cellular Immunology, під ред. Mishel і Schiigi, вид-во W.J. Freeman Co., San Francisco, 1980, с. 287). Конфлюентні моношари експресуючих TAT10772 клітин PC3 трипсинізували, однократно промивали та ресуспендували з розрахунку  $1,75 \times 10^6$  клітин/мл у холодному ЗФР, що містить 0,5% бичачого сироваткового альбуміну (BSA) і 0,1%  $\text{NaN}_3$ . Додавали в кінцевій концентрації 1% латексні частинки (фірма IDC, Портленд, шт. Орегон) для зменшення закупорки мембран планшета PANDEX™. Клітини в суспензії (20мкл) і 20мкл очищених моноклональних антитіл (від 100 до 0,1мкг/мл) додавали в лунки планшета PANDEX™ і інкубували на льоді протягом 30 хв. У кожну лунку додавали попередньо визначене розведення мічених за допомогою ФІТЦ моноклональних антитіл в 20мкл, інкубували протягом 30 хв., промивали та визначали кількісно флуоресценцію за допомогою PANDEX™ Screen Machine. Приймали, що моноклональні антитіла зв'язуються з одним епітопом, якщо кожне з них блокувало зв'язування іншого на 40% або більше в порівнянні з контрольним моноклональним антитілом, узятому в такий же концентрації, що не має чутливості до цього епітопу. У цьому експерименті вважалося, що епітопами моноклональних антитіл 16F7, 17A8, 9F3, 16E12, 16A7, 10G11, 5B10, 11D10, 5F6, 7G6 і 3A5 є епітопи TAT10772 В, В, В, В, В, В, А, В, В, С і D відповідно. З використанням цього аналізу будь-який звичайний спеціаліст у даній галузі може ідентифікувати інші моноклональні антитіла, які зв'язуються із зазначеними вище епітопами.

Проводили також делеційний аналіз для ідентифікації приблизної локалізації поліпептидної послідовності, представленої в SEQ ID NO:2, описаних вище антигенних епітопів. Ці аналізи продемонстрували, що антигенний епітоп А TAT10772 виявлено між амінокислотами 6471-6560 SEQ ID NO:2, антигенний епітоп В TAT10772 виявлений між амінокислотами 6389-6470 SEQ ID NO:2, антигенний епітоп С TAT10772 виявлений між амінокислотами 6663-6806 SEQ ID NO:2 і антигенний епі-

топ D TAT10772 виявлений між амінокислотами 3765-6397 SEQ ID NO:2 (кожний містить приблизно сімнадцять повторів муцинподібних послідовностей, що складаються з 150 амінокислот, і тому найбільш ймовірно містить декілька однакових сайтів антигенних епітопів). Поліпептиди, що містять будь-які із зазначених конкретних ідентифікованих сайтів антигенних епітопів (і молекули нуклеїнових кислот, що кодує ці поліпептиди), падають під обсяг даного винаходу.

В іншому експерименті продемонстровано, що зв'язування моноклонального антитіла 3A5 із клітинами ліній OVCAR-3, OVCA-432 і SK-OV-3, як визначено за допомогою стандартного методу проточної цитометрії, пропорційно рівню експресії мРНК TAT10772, що експресується у кожній із цих трьох конкретних ліній клітин, що визначали за допомогою стандартного аналізу на основі кількісної ПЛР. Більш конкретно, як встановлено за допомогою стандартного аналізу на основі кількісної ПЛР, клітини ліній OVCAR-3, OVCA-432 і SK-OV-3 експресують високий, середній і низький рівень мРНК TAT10772 відповідно. Коли моноклональне антитіло 3A5 застосовували в стандартному аналізі проточної цитометрії для кількісної оцінки здатності 3A5 зв'язуватися із цими клітинами, то виявлено, що здатність 3A5 до зв'язування кількісно пропорційна відносній кількості мРНК TAT10772, присутній в цих клітинних лініях. Ці дані дозволяють припустити, що кількість мРНК TAT10772 у будь-якому конкретному типі клітин може бути кількісною мірою поліпептиду TAT10772, що експресується цим типом клітин, і у свою чергу, мірою здатності будь-якого специфічного антитіла до TAT10772 зв'язуватися із цим типом клітин.

Приклад 7: Імуногістохімічний аналіз

Антитіла до TAT10772 одержували відповідно до описаного вище методу та здійснювали імуногістохімічний аналіз із використанням моноклональних антитіл 3A5 і 11D10 у такий спосіб. Зрізи тканин (заморожені або залиті в парафін) спочатку фіксували протягом 5 хв. в ацетоні/етанолі. Потім зрізи промивали ЗФР і після цього блокували авідин і біотином (набір фірми Vector) по 10 хв. щоразу із наступним промиванням ЗФР. Потім зрізи блокували 10%-вою сироваткою протягом 20 хв. і після цього промокали для видалення надлишку сироватки. Потім до зрізів додавали первинне антитіло в концентрації 10мкг/мл і витримували протягом 1 год. і після цього середовища промивали ЗФР. Потім до зрізів додавали біотинізоване вторинне антитіло (до первинного антитіла) і витримували протягом 30 хв. і після цього зрізи промивали ЗФР. Потім зрізи обробляли реагентами, що входять до набору Vector ABC, протягом 30 хв. і потім зрізи промивали ЗФР. Після цього зрізи обробляли діамінобензидином (фірма Pierce) протягом 5 хв. і потім промивали ЗФР. Після цього зрізи піддавали контрастному забарвленню з використанням гематоксиліну Майєра, закривали покривними стеклами та візуалізували. Імуногістохімічний аналіз можна здійснювати також за допомогою методів, описаних в Sambrook та ін., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, вид-во Cold Spring Harbor Press, New York, 1989 і Ausubel та

ін., Current Protocols of Molecular Biology, вид-во John Wiley and Sons, Unit 3.16, 1997.

Результати цих аналізів демонструють, що моноклональне антитіло 11D10 не має здатності до помітного зв'язування з будь-якою зі здорових людських тканин наступних органів: аорта, головний мозок, ободова кишка, печінка, нирка, тонкий кишечник, шлунок, легень (як альвеолярна, так і бронхіальна тканина), яєчка, селезінка, щитовидна залоза, яєчник, матка, уротелій і плацента. Однак в 6 з 13 незалежних зразків людської аденокарциноми яєчника та в 1 з 7 незалежних зразків людської аденокарциноми ендометрію виявлене сильне зв'язування з антитілом 11D10. Крім того, в іншому експерименті виявлене сильне зв'язування антитіла 11D10 в 1 з 9 зразків пухлини людської аденокарциноми слизової оболонки, в 13 з 22 зразків пухлини людської аденокарциноми ендометрію, в 17 з 26 зразків пухлини людської серозної цистаденокарциноми та в 3 з 8 зразків пухлини людських паренхіматозних клітин.

Крім того, результати цього аналізу продемонстрували, що моноклональне антитіло 3A5, подібно моноклональному антитілу 11D10, не має здатності до помітного зв'язування з жодною з перерахованих вище здорових людських тканин. Однак зв'язування антитіла 3A5 виявлено в 2 з 2 незалежних зразків людської аденокарциноми яєчника (забарвлення мембран), 16 з 20 зразків пухлини людської аденокарциноми ендометрію, 24 з 25 зразків пухлини людської серозної цистаденокарциноми та в 5 з 10 зразків пухлини людських паренхіматозних клітин.

Приклад 8: Моноклональне антитіло 3A5 інтерналізується при зв'язуванні з поліпептидом TAT10772 на клітинах

У цьому експерименті продемонстровано, що моноклональне антитіло 3A5 інтерналізується в клітині, коли воно зв'язується з поліпептидом TAT10772 на клітинній поверхні. Зокрема, клітини лінії OVCAR-3 інкубували протягом 18 год. із моноклональним антитілом 3A5 і флуоресцентним декстраном і потім асоційоване із клітиною 3A5 визначали кількісно за допомогою міченого флуоресцеїном антитіла до 3A5. Ці аналізи продемонстрували, що антитіло 3A5 забарвлюється декстраном, що свідчить про проходження антитіла 3A5 у субклітинні компоненти інкубованих клітин, включаючи лізосомальні компартменти цих клітин.

Приклад 9: Гуманізація мишачих моноклональних антитіл

У цьому прикладі продемонстрована можливість застосування методу CDR-репарації для гуманізації мишачих антитіл 11D10 і 3A5 до TAT10772.

У процесі гуманізації використовували три форми TAT10772. Людський «злушуваний» антиген TAT10772 CA125, що містить повний «злушуваний» антиген, одержували від фірми US Biological C0050-10. «Стебло» TAT10772 складається з останнього, найближчого до С-кінця домену муцину, і наступної С-кінцевої послідовності, розташованої перед передбаченою трансмембранною ділянкою (амінокислоти 6282-6979 SEQ ID

NO:2). 5'-домен TAT10772 (амінокислоти 4471-5171 SEQ ID NO:2) являє собою рекомбінантний фрагмент позаклітинного домену, що кодує 5'-домени муцину, плюс С-кінцеву послідовність, розташовану перед передбаченою трансмембранною ділянкою. «Стебло» MUC16 і 5'-домен муцину експресували в CHO-клітинах і очищали загальноприйнятими методами.

Нумерація залишків дана за Кеботом (Kabat та ін., Sequences of proteins of immunological interest, 5-е вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991). Для позначення амінокислот застосовували однобуквені скорочення. Вирожденість ДНК позначали за допомогою коду IUB (Міжнародний біохімічний союз) (N=A/C/G/T, D=A/G/T, V=A/C/G, B=C/G/T, H=A/C/T, K=G/T, M=A/C, R=A/G, S=G/C, W=A/T, Y=C/T).

Клонування варіабельних ділянок мишачих 11D10 і 3A5 та створення химерних антитіл 11P10 та 3A5

Загальну РНК екстрагували із клітин гібридоми, що продукують 11D10 або 3A5, за допомогою стандартних методів. Варіабельну ділянку легкого (VL) і варіабельну ділянку важкого (VH) ланцюга ампліфікували за допомогою РЧ-ПЛР із вирожденними праймерами для важкого та легкого ланцюгів. «Прямі» праймери мали специфічність для N-кінцевих амінокислотних послідовностей VL- і VH-ділянок. Створювали відповідні «зворотні» праймери для LC і HC для відпалювання до ділянки в константній ділянці легкого ланцюга (CL) і домену 1 константної ділянки важкого ланцюга (CH1), які мають високу консервативність у різних видів. Ампліфіковані VL і VH клонували в експресійних векторах ссавців. Послідовність полінуклеотидної вставки, яка являє інтерес, визначали за допомогою звичайних методів секвенування. Амінокислотні послідовності VL (mu11D10-L) і VH (mu11D10-H) антитіла 11D10 представлені на Фіг. 3 і 4 відповідно (SEQ ID NO:4 і 7 відповідно); амінокислотні послідовності VL (mu3A5-L) і VH (mu3A5-H) антитіла 3A5 представлені на Фіг. 5 і 6 відповідно (SEQ ID NO:9 і 11 відповідно). HVR-ділянки відповідно до нумерації Кебота позначені жирним шрифтом на Фіг. 3-6.

Безпосередні трансплантати гіперваріабельної ділянки в акцепторну людську консенсусну каркасну ділянку

Застосовувана в цьому дослідженні фагміда являла собою одновалентний Fab-g3-презентуючий вектор і складалася з 2 відкритих рамок читування під контролем промотору rhoA. Перша відкрита рамка читування складалася із сигнальної послідовності still, злитої з VL- і CH1-доменами акцепторного легкого ланцюга, а друга складалася із сигнальної послідовності still, злитої з VH- і CH1-доменами акцепторного важкого ланцюга, за якою йшов мінорний фаговий оболонковий білок P3.

VL- та VH-ділянки мишачих антитіл 11D10 і 3A5 вирівнювали відносно людської VL капа I (huK1; SEQ ID NO:3) і людської VH підгрупи III (huIII; SEQ ID NO:6) консенсусних послідовностей. Для одержання HVR-трансплантатів гіперваріабельні ділянки мишачих антитіл трансплантували в

акцепторні каркасні ділянки huK1 і huK3. Для анти-тіла 3A5 оцінювали 2 акцепторні каркасні ділянки VH (позначені як 3A5.L і 3A5.F відповідно), що відрізняються тільки амінокислотою у положенні 78 (див. Фіг. 6A-Б).

Гіперваріабельні ділянки мишачих антитіл 11D10 і 3A5 створювали в акцепторній людській консенсусній каркасній ділянці для створення безпосередніх HVR-трансплантатів, тобто 11D10-трансплантату, 3A5.L-трансплантату та 3A5.E-трансплантату. У людську консенсусну акцепторну VL-ділянку трансплантували наступні ділянки: положення 24-34 (HVR-L1), 49-56 (HVR-L2) і 89-97 (HVR-L3). В VH-ділянку трансплантували положення 26-35A (HVR-H1), 49-65 (HVR-H2) і 93-102 (HVR-H3) (Фіг. 3-6). MacCallum зі співавторами (MacCallum та ін., J. Mol. Biol. 262, 1996, сс. 732-745) проаналізували кристалічні структури комплексів антитіл і антигенів і виявили, що положення 49 легкого ланцюга та положення 49, 93 і 94 важкого ланцюга є частиною ділянки контакту, і тому, ймовірно, відповідальні за включення цих положень у визначені HVR-L2, HVR-H2 і HVR-H3 при гуманізації антитіл.

Варіанти з безпосередніми трансплантатами створювали за допомогою мутагенезу за Кункелем (Kunkel) з використанням певного олігонуклеотиду для кожної гіперваріабельної ділянки. Правильність клонів оцінювали шляхом секвенування ДНК.

Рандомізація гіперваріабельних ділянок

У кожне несуче трансплантат антитіло у кожну гіперваріабельну ділянку за допомогою стратегії м'якої рандомізації (SR-бібліотеки), яка дозволяє зберігати перевагу відносно послідовностей мишачих гіперваріабельних ділянок, інтродуктували окремо різні послідовності. Для цієї мети використовували стратегію «зіпсованого» синтезу олігонуклеотидів, уперше описану у Gallor та ін., J. Med. Chem. 37, 1994, сс. 1233-1251. Для конкретного положення, що підлягає мутації, в гіперваріабельній ділянці кодон, що кодує амінокислоту дикого типу, «псували» за допомогою суміші 70-10-10-10 нуклеотидів, що приводило в середньому до 50% рівню мутацій у кожному положенні.

Олігонуклеотиди, одержані в результаті м'якої рандомізації, розташовувалися за послідовностями мишачих гіперваріабельних ділянок і містили такі ж ділянки, що й безпосередні трансплантати гіперваріабельних ділянок. Розмаїтість амінокислот, що розташовуються на початку послідовності H2 (положення 49) в VH-ділянці, обмежувалося A, G, S або T внаслідок використання коду RGC.

Крім описаних вище бібліотек м'якої рандомізації, кожне положення в кожній гіперваріабельній ділянці 3A5.b-трансплантату та 3A5.F-трансплантату повністю рандомізували за всіма можливими 20 амінокислотами за допомогою олігонуклеотидів, що кодують NNS. Це здійснювали з використанням 2 типів бібліотек. Для цього ланцюга створювали множину бібліотек першого типу, кожна з яких складалася з 20 членів, які мають одне повністю рандомізоване положення, локалізоване в одній з гіперваріабельних ділянок 3A5. Для охоплення кожного положення в гіперваріабель-

них ділянках створювали 63 бібліотеки цього типу та поєднували в пул «бібліотека одного положення» (SP-бібліотека), що включає моносайтові мутації, локалізовані в кожному положенні гіперваріабельної ділянки. Бібліотека другого типу включала одночасно всі 20 амінокислот у всіх положеннях (FR-бібліотека) в одній гіперваріабельній ділянці. Для кожного із двох типів бібліотек створювали по 6 бібліотек, кожна з яких містила окрему гіперваріабельну ділянку 3A5.L-трансплантату або 3A5.F-трансплантату.

Для того, щоб уникнути повторного вибору CDR-трансплантованих послідовностей дикого типу, у середину кожного HVR інтродуктували стоп-кодон (TAA) за допомогою мутагенезу за Кункелем, що дозволяло одержувати 6 різних матриць для кожного трансплантату (11D10-трансплантат, 3A5.L-трансплантат і 3A5.F-трансплантат), кожний зі стоп-кодоном, інтродукованим у різний HVR. При створенні SR-, FR- і SP-бібліотек, рандомізовані олігонуклеотиди використовували для інтродукції розмаїтості, а також для репарації стоп-кодону у відповідній матриці. Для бібліотек 3A5 використовували суміш 3A5.L- і 3A5.F-матриць при конструюванні кожної бібліотеки. Всі 3 типи бібліотек створювали для гуманізованого 3A5, у той час як для гуманізованого 11D10 створювали тільки SR-бібліотеку.

Створення фагових бібліотек

Пули рандомізованих олігонуклеотидів, створені, як зазначено вище, для інтродукції різноманітних варіантів у кожну гіперваріабельну ділянку, фосфорилювали окремо в 20мкл реакційної суміші, що містить 660нг олігонуклеотиду, 50мМ Трис, рН 7,5, 10мМ MgCl<sub>2</sub>, 1мМ АТФ, 20мМ ДТТ і 5 од. полі-нуклеотидкінази, протягом 1 год. при 37°C.

Для створення SR- і FR-бібліотек кожний фосфорилюваний пул олігонуклеотидів, призначений для інтродукції розмаїтості в один HVR, поєднували з 20мкг матриці Кункеля, що містить відповідний стоп-кодон. Реакцію здійснювали в 50мМ Трис, рН 7,5, 10мМ MgCl<sub>2</sub> у кінцевому об'ємі 500мкл, що приводило до того, що відношення олігонуклеотиду до матриці становило 3. Суміш відпалювали (ренатурували) при 90°C протягом 4 хв., при 50°C протягом 5 хв. і потім охолоджували на льоді. Потім ренатовану матрицю (250мкл) заповнювали, додаючи 1мкл 100мМ АТФ, 10мкл 25мМ дНТФ (25мМ кожного з дАТФ, дЦТФ, дГТФ і дТТФ), 15мкл 100мМ ДТТ, 25мкл 10×ТМ-буфера (0,5М Трис, рН 7,5, 0,1М MgCl<sub>2</sub>), 2400 од. Т4-лігази та 30 од. Т7-полімерази, протягом 3 год. при кімнатній температурі. Заповнений продукт потім остаточно очищали та переносили шляхом електропорації в клітини лінії SS320 і розмножували в присутності фага-хелпера M13/KO7 відповідно до методу, описаному в Sidhu та ін., Methods in Enzymology 328, 2000, сс. 333-363. Розміри бібліотек становили 1-2×10<sup>9</sup> незалежних клонів. Випадкові клони з початкових бібліотек секвенували для оцінки якості бібліотеки.

Для створення SP-бібліотек 3A5 здійснювали серію (63) стандартних реакцій мутагенезу за Кункелем в 96-лункових планшетах для ПЛР. З реакційних сумішей фосфорилюваних олігонуклеотидів

(див. вище) 2мкл додавали до 300нг матриці Кюн-келя, що містить відповідний стоп-кодон в 50мМ Трис, pH 7,5, 10мМ  $MgCl_2$  у кінцевому об'ємі 10мкл. Суміш відпалювали при 90°C протягом 2 хв., 50°C протягом 5 хв. і потім охолоджували на льоді. Потім ренатуровану матрицю заповнювали, додаючи 0,5мкл 10мМ АТФ, 0,5мкл 10мМ дНТФ (по 10мМ кожного з дАТФ, дЦТФ, дГТФ і дТТФ), 1мкл 100мМ ДТТ, 1мкл 10× ТМ-буфера (0,5М Трис, pH 7,5, 0,1М  $MgCl_2$ ), 80 од. Т4-лігази та 4 од. Т7-полімерази в загальному об'ємі 20мкл протягом 2 год. при кімнатній температурі. Кожним із цих заповнених і лігованих продуктів потім трансформували клітини лінії XL1-blue, вирощували в 0,5мл середовища 2YT, що містить 5мкг/мл тетрацикліну та фаг-хелпер M13/KO7 (MOI 10), протягом 2 год. при 37°C, а потім поєднували та переносили в 500мл середовища 2YT, що містить 50мкг/мл карбенациліну, і вирощували протягом 16 год. при 37°C.

#### Селекція фага

Для селекції описаних вище фагів TAT10772-«стебло» (2мкг/мл), CA125 (17мкг/мл), 5'-домен TAT10772 (2мкг/мл) або нейтравідин (2мкг/мл) іммобілізували в 3ФР на титраційних мікропланшетах типу MaxiSorp (фірма Nunc) протягом ночі при 4°C. Планшети блокували принаймні 1 год. за допомогою казеїнового блокатора (Casein Blocker) (фірма Pierce). Фаги збирали із супернатанту культури та суспендували в 3ФР, що містить 1% БСА та 0,05% Твін 20 (3ФРБТ). Після описаної вище селекції фагів лунки титраційного мікропланшета інтенсивно промивали 3ФР, що містить 0,05% Твін 20 (3ФРТ), і зв'язаний фаг елюювали, інкубуючи

лунки з 100мМ HCl протягом 30 хв. Фаг нейтралізували 1М Трис, pH 8 і ампліфікували з використанням клітин лінії XL1-Blue і фага-хелпера M13/KO7 і вирощували протягом ночі при 37°C у середовищі 2YT, доповненої 50мкг/мл карбенациліну. Титри фагів, елюйованих з лунки, що містить мішень, порівнювали з титрами фагів, одержаних з лунок, що не містять мішень, для оцінки збагачення.

Відомий метод сортування в розчині (Fuh та ін., J. Mol. Biol., 2004) і його можна застосовувати для селекції прискорювачів швидкості асоціації при використанні як контроль певної концентрації біотинілованої мішені та сповільнювачів швидкості дисоціації, що є результатом конкуренції з неміченою мішенню. TAT10772-«стебло» і 5'-домен TAT10772 біотинілювали за допомогою сульфохлорид-біотину (фірма Pierce).

TAT10772-«стебло» застосовували як мішень фага при гуманізації 11D10. TAT10772-«стебло» іммобілізували безпосередньо на титраційні мікропланшети типу MaxiSorp (фірма Nunc) з 2мкг/мл у 3ФР для першого циклу селекції фага. У наступних циклах селекції застосовували метод селекції у розчині (Fuh та ін. J. Mol. Biol., 2004). Біотинілований TAT10772-«стебло» спочатку інкубували з бібліотекою фага протягом 1 год. із наступним 5-хвилинним захопленням зв'язаного фага на сенсibilізованому нейтравідином планшеті. Перед стадією захоплення додавали немічений TAT10772-«стебло» (більше 100нМ) для збільшення тривалості часу з метою підвищення строгості селекції. У наступній таблиці узагальнені відомості про умови, які використовували для пенінгнення в розчині бібліотек 11D10.

Цикл селекції	Біотинілований TAT10772-«стебло»	Інкубація з надлишком TAT10772-«стебла»
2	10нМ	20 хв. при 25°C
3	10нМ	6,5 год. при 25°C
4	10нМ	88,5 год. при 25°C
5	1нМ	48 год. при 25°C, потім 52 год. при 37°C

CA125 та 5'-домен TAT10772 використовували як мішені для фагів при гуманізації 3A5. Бібліотеки сортували індивідуально для першого циклу селекції проти іммобілізованого 5'-домену TAT10772 (2мкг/мл у 3ФР) або CA125 (17мкг/мл у 3ФР), якими сенсibilізували титраційні мікропланшети типу MaxiSorp фірми Nunc. Після ампліфікації бібліотек (FR/SR/SP) і залежно від того, здійснювали пенінг проти CA125 або 5'-домену TAT10772, і сортували протягом ще 2 циклів проти відповідних іммобілізованих мішеней. Здійснювали три послідовних цикли селекції з постійним пенінгом проти іммобілізованих мішеней або шляхом селекції у відношенні біотинілованого 5'-домену TAT10772 за допомогою стратегії сортування в розчині (Fuh та ін. J. Mol. Biol., 2004). Для здійснення сортування в розчині бібліотеки фагів інкубували з 1нМ біотинілованим 5'-доменом TAT10772 протягом 1 год. із наступним додаванням надлишку неміченого 5'-домену TAT10772 (більше 100нМ) аж до 22 год. для підвищення строгості відбору. Фаг, зв'язаний з біотинілованим 5'-доменом, швидко захоплювався (5

хв.) при використанні сенсibilізованого нейтравідином планшета.

#### ELISA фага TAT10772-«стебла»

Титраційні мікропланшети типу MaxiSorp сенсibilізували TAT10772-«стеблом» у концентрації 2мкг/мл у 3ФР протягом ночі та потім блокували казеїновим блокатором (Casein Blocker). Фаги із супернатантів культури інкубували із серійно розведеним TAT10772-«стеблом» у 3ФРТ, що містить 1% БСА, у титраційних планшетах для культур тканини протягом 1 год., після чого 80мкл суміші переносили в лунки, сенсibilізовані мішенню, і витримували протягом 15 хв. для захоплення незв'язаного фага. Планшет промивали 3ФРТ і додавали кон'юговане з HRP антитіло до M13 (фірма Amersham Pharmacia Biotech) (1:5000 у 3ФРБТ) протягом 40 хв. Планшет промивали 3ФРТ і оцінювали, додаючи як субстрат тетраметилбензидин (Kirkegaard and Perry Laboratories, Геттисберг, шт. Мериленд). Будували графік залежності абсорбції при 450нм від концентрації мітки в розчині для визначення значення  $IC_{50}$ . Цю величину застосовували для оцінки афінності Fab-клону, що презентується на поверхні фага.

Виробництво та визначення афінності Fab і IgG

Для забезпечення експресії білка Fab для вимірювання афінності інтродукували стоп-кодон між важким ланцюгом і g3 у векторі, що несе дисплейну фагову бібліотеку. Клонами трансформували клітини *E. coli* 34B8 і вирощували в повному середовищі C.R.A.P. при 30°C (Presta та ін., *Cancer Res.* 57, 1997, сс. 4593-4599). Клітини збирали центрифугуванням, суспендували в ЗФР, 100мкМ ФМСФ (фенілметилсульфонілфторид), 100мкМ бензамідин, 2,5мМ ЕДТК і руйнували за допомогою мікропсевдозріджувача. Fab очищали за допомогою афінної хроматографії на протеїні G.

Визначення афінності здійснювали за допомогою резонансу поверхневого плазмону з використанням пристрою BIACore™-2000. На сенсорному чипі типу CM5 іммобілізували або такий, що дає ~500 одиниць відповіді (RU) 5'-домен TAT10772, або що дає ~300 RU IgG в 10мМ натрій-ацетатному буфері, pH 4,8 і ін'єктували серійні дворазові розведення відповідного партнера, що зв'язується (1-1000нМ) у ЗФРТ зі швидкістю потоку 20мкл/хв. Кожний зразок аналізували шляхом 5-хвилинної асоціації та 10-хвилинної дисоціації. Після кожної ін'єкції чип регенерували за допомогою 10мМ гліцину, pH 1,5. Відповідь, що характеризує зв'язування, коректували шляхом вирахування RU, одержаних при використанні потоку контрольних (чистих) клітин. У кінетичних аналізах використовували модель (1:1) Ленгмюра для одностороннього апроксимування швидкості асоціації ( $k_{on}$ ) і швидкості дисоціації ( $k_{off}$ ).

#### Гуманізація 11D10

Людська акцепторна каркасна ділянка, яку застосовували для гуманізації 11D10, складається з консенсусної послідовності людської VL капа I і варіанта людської консенсусної послідовності VH підгрупи III. Кожну VL- і VH-ділянку мишачого 11D10 вирівнювали відносно людських ділянок капа I і підгрупи III; кожну з (гіперваріабельних) ділянок (CDR), що визначають комплементарність, ідентифікували та трансплантували в людську акцепторну каркасну ділянку для створення HVR-трансплантату, який можна презентувати у вигляді Fab на фагу (Фіг. 3 і 4). Коли HVR-трансплантат 11D10, що презентується фагом, оцінювали відносно зв'язування з іммобілізованим CA125, було виявлене зв'язування фага. Коли послідовність HVR-трансплантату 11D10 експресували у вигляді Fab, то Біасоре-аналіз показав зв'язування з CA125.

Створювали SR-бібліотеку для 11D10, у якій кожний HVR індивідуально піддавали м'якої рандомізації. Кожну з 6 SR-бібліотек окремо піддавали пенінгу проти іммобілізованого TAT10772-«стебла» протягом 5 циклів селекції. Було виявлене збагачення, що починалося після 3 циклу та тривало протягом 5 циклу, клони збирали для аналізу послідовності ДНК. Виявлено зміни послідовності, характерні для кожного HVR. Клони піддавали скринінгу з використанням ELISA для фага TAT10772-«стебла». Відібрані клони експресували у вигляді Fab для наступного Біасоре-аналізу. Декілька клонів реформували у вигляді IgG для оцінки за допомогою аналізу Скетчарда. FACS-

аналіз із використанням клітин OVCAR-3 продемонстрував, що всі вивчені гуманізовані антитіла 11D10 мали здатність ефективно сортувати клітини при використанні FACS. Із цих результатів ясно, що існує множина змін послідовності, які можуть відновлювати афінність 11D10 із трансплантованою людською каркасною ділянкою, і що це антитіло можна гуманізувати шляхом CDR-репарації з одержанням афінності, що відповідає або перевищує афінність вихідного мишачого антитіла.

#### Гуманізація 3A5

Для гуманізації 3A5 застосовували дві людські акцепторні каркасні ділянки 3A5.L і 3A5.F, які складаються з консенсусної послідовності людської VL капа I і варіанта людської консенсусної послідовності VH підгрупи III. VL- і VH-ділянки мишачого 3A5 кожну вирівнювали відносно людських ділянок капа I і підгрупи III; кожну з ділянок (CDR), що визначають комплементарність, (гіперваріабельних) ідентифікували та трансплантували в людську акцепторну каркасну ділянку для створення HVR-трансплантату, який можна презентувати у вигляді Fab на фагу (Фіг. 5 і 6). Коли HVR-трансплантати 3A5, які презентуються фагом оцінювали відносно зв'язування з іммобілізованим CA125, то в обох випадках було виявлено зв'язування фага. Коли послідовності HVR-трансплантатів 3A5 експресували у вигляді Fab, то Біасоре-аналіз показав також зв'язування обох трансплантатів з 5'-доменом TAT10772.

Створювали SR-, FR- і SP-бібліотеки, у яких різновидність інтродукували окремо в кожний HVR HVR-трансплантату 3A5. Бібліотеку піддавали пенінгу проти CA125 і 5'-домону TAT10772, використовуючи стратегії як твердофазового сортування, так і сортування в розчині. Метод сортування в розчині дозволяє відбирати клони з високою афінністю за допомогою маніпуляцій з концентраціями біотинізованої мішені та тривалістю захоплення фага, у той час як додавання неміченої мішені можна застосовувати для елімінації клонів з більш швидкими швидкостями дисоціації (Fuh та ін. *J. Mol. Biol.* 340, 2004, сс. 1073-1093). Було виявлено збагачення, яке починалося після 2 циклу у всіх бібліотеках. FACS-аналіз із використанням клітин лінії OVCAR-3 продемонстрував, що всі вивчені гуманізовані антитіла 3A5 мали здатність ефективно сортувати клітини при використанні FACS. Після циклу 5 відбирали клони з кожної бібліотеки для аналізу послідовності ДНК, відповідні зміни послідовностей, характерні для HVR-H3, дозволяють припустити, що повторне створення цього CDR було важливим для відновлення зв'язування антигена.

#### Аналіз послідовностей гуманізованих клонів

Одержували амінокислотні послідовності всіх HVR легких і важких ланцюгів всіх гуманізованих клонів. Для гуманізованих антитіл 11D10 одержані HVR-послідовності представлені на Фіг. 7-12. Для гуманізованих антитіл 3A5 одержані HVR-послідовності представлені на Фіг. 13-18. На Фіг. 19 і 20 показаний приклад послідовностей акцепторної людської консенсусної каркасної ділянки варіабельної ділянки важкого й легкого ланцюгів відповідно. Під обсяг даного винаходу підпадають

антитіла, які містять принаймні одну з описаних послідовностей акцепторної людської консенсусної каркасної ділянки в сполученні принаймні з однією з описаних HVR-послідовностей.

Аналіз зв'язування відібраних гуманізованих клонів антитіла 3A5

Було відібрано декілька гуманізованих клонів 3A5, які повинні експресуватися у вигляді IgG, і охарактеризовано їх зв'язування з AT10772 за допомогою Біосеге-аналізу, конкурентного зв'язування за допомогою ELISA і аналізу зв'язування із клітинами лінії OVCAR-3. Результати, одержані за допомогою стандартних ELISA, представлені нижче в таблиці 7. Результати, одержані за допомогою стандартних Біосеге-аналізів, у яких оцінювали

зв'язування з 5'-доменом TAT10772 імобілізованого варіанта антитіла 3A5 у вигляді IgG, представлені нижче в таблиці 8. Слід зазначити, що всі вивчені антитіла являли собою IgG і містили послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга представлену в SEQ ID NO:211. Була виявлена зворотна мутація S49Y в VL, яка не впливала на зв'язування й була включена в кінцеві гуманізовані варіанти у вигляді тирозину, який найбільш часто є присутнім у цьому положенні. Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла зазначена в таблицях 7 і 8. Як видно з узагальнення таблиць 7 і 8, афінності декількох клонів відповідали або перевищували мономерну афінність химерного антитіла.

Таблиця 7

ELISA Kd (нМ)

Версія антитіла 3A5 CA125 5'-домен TAT10772 клітини OVCAR-3  
(послідовність VH-ланцюга)

химера 3A5

(mu3A5-H; SEQ ID NO:11)	0,3	2,3	0,3
3A5.L-трансплантат (SEQ ID NO:12)			7,1
3A5.F-трансплантат (SEQ ID NO:13)	51,4	90,3	0,6
3A5v1 (SEQ ID NO:198)	0,6	3,0	0,5
3A5v2 (SEQ ID NO:199)	0,8	3,7	0,7
3A5v3 (SEQ ID NO:200)	0,5	1,6	0,2
3A5v4 (SEQ ID NO:201)	0,3	2,4	0,8
3A5v5 (SEQ ID NO:202)	8,2	10,2	0,6
3A5v6 (SEQ ID NO:203)	4,4	5,7	0,6
3A5v7 (SEQ ID NO:204)	1,2	3,3	0,8
3A5v8 (SEQ ID NO:205)	0,4	2,6	0,5

Таблиця 8

Версія антитіла 3A5	ka (1/мс)	Kd (1/с)	Kd (нМ)
химера 3A5			
(mu3A5-H; SEQ ID NO:11)	4,48E+04	1,21E-04	2,7
3A5.F- трансплантат			
(SEQ ID NO:13)	2,85E+04	2,92E-04	10
3A5v1 (SEQ ID NO:198)	3,69E+04	1,78E-04	4,8
3A5v2 (SEQ ID NO:199)	3,34E+04	1,21E-04	3,6
3A5v3 (SEQ ID NO:200)	3,62E+04	1,30E-04	3,6
3A5v8 (SEQ ID NO:205)	5,51E+04	1,27E-04	2,3

Для декількох гуманізованих антитіл 3A5 оцінювали також конкурентне зв'язування за допомогою ELISA (що дозволяє оцінювати зв'язування з імобілізованим 5'-доменом TAT10772 і CA125), і аналіз зв'язування із клітинами лінії OVCAR-3, результати цих аналізів представлені на Фіг. 23-25. Як видно з Фіг. 23-25, всі вивчені гуманізовані антитіли до 3A5 мали сильну здатність до зв'язування з поліпептидом-мішенню TAT10772 і ефективно конкурувати за зв'язування в антигенних сайтах цього поліпептиду-мішені.

Вилучення потенційного сайту глікозилювання в CDR-H2 гуманізованих варіантів 3A5

Для запобігання потенційних зв'язаних з виробництвом витрат потенційний сайт глікозилювання в CDR-H2 гуманізованих варіантів 3A5 елімінували за допомогою методу фагової селекції для ідентифікації прийнятних замін послідовностей. N52 і S54 повністю рандомізували окремо, використовуючи кодон NNS для здійснення всіх можливих амінокислотних замін. Ці невеликі фагові бібліотеки, які складаються з 20 членів, селектували за ознакою зв'язування з 5'-доменом TAT10772. Хоча були виявлені й N52, і S54, часто виявляли й інші заміни в обох положеннях, при цьому найпоширенішими були заміни N52S і S54A. Деякі дані, одержані за допомогою стандартного аналізу Скетчарда, представлені нижче в таблиці 9, де представлені в таблиці антитіла експресувались у вигляді IgG, які мали послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:211, а послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга зазначена в таблиці 9. Коли кожна з описаних замін була включена в гуманізовані варіанти 3A5.v1 або 3A5.v4 (див. SEQ ID NO:206-209), то вони не впливали на афінність до зв'язування з TAT10772.

Таблиця 9

Версія антитіла 3A5 (послідовність VH-ланцюга)	Kd (нМ)
Химера 3A5 (mu3A5-H; SEQ ID NO:11)	0,57±0,3
3A5v1b 52 (SEQ ID NO:206)	0,47±0,1
3A5v1b 54 (SEQ ID NO:207)	0,37±0,4

3A5v4b 52 (SEQ ID NO:208)	0,46±0,5
---------------------------	----------

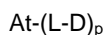
Приклад 10: Одержання кон'югованих з токсинном антитіл, які мають здатність зв'язуватися з TAT10772

Застосування кон'югатів антитіло-лікарський засіб (ADC), тобто імунокон'югатів, для місцевого введення цитотоксичних або цитостатичних агентів, тобто лікарських засобів, призначених для знищення або інгібування пухлинних клітин при лікуванні раку (Payne, Cancer Cell 3, 2003, сс. 207-212; Syrigos і Epenetos, Anticancer Research 19, 1999, сс. 605-614; Niculescu-Duvaz і Springer, Adv. Drug Del. Rev. 26, 1997, сс. 151-172; US 4975278), дозволяє здійснювати спрямоване введення фрагменту, який являє собою лікарський засіб, у пухлини та накопичувати його всередині клітин, у той час як системне введення таких лікарських агентів у некон'югованому вигляді може приводити до неприйнятних рівнів токсичності відносно здорових клітин, а не тільки до токсичності відносно пухлинних клітин, які потрібно знищити (Baldwin та ін., Lancet, 15 березня 1986, сс. 603-605; Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review» в Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, під ред. Pinchera та ін., 1985, сс. 475-506). Тим самим забезпечується максимальна ефективність при мінімальній токсичності. При створенні та удосконаленні ADC зусилля були сфокусовані на забезпеченні вибіркової моноклональності антитіл (Mat), а також характеристик зв'язування з лікарським засобом і вивільнення лікарського засобу. Опубліковано дані про те, що в цих стратегіях можна застосовувати як поліклональні антитіла, так і моноклональні антитіла (Rowland та ін., Cancer Immunol. Immunother., 21, 1986, сс. 183-87). Як лікарські засоби в цих методах застосовували дауноміцин, доксорубіцин, метотрексат і віндесин (Rowland та ін., 1986, вище). Токсини, застосовувані в кон'югатах антитіло-токсин, включають бактеріальні токсини, такі як дифтерійний токсин, рослинні токсини, такі як рицин, низькомолекулярні токсини, такі як гелданаміцин (Mandler та ін., J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19), 2000, сс. 1573-1581; Mandler та ін., Bioorganic & Med. Chem. Letters 10, 2000, сс.



1025-1028; Mandler та ін. *Bioconjugate Chem.* 13, 2002, сс. 786-791), майтансінної (EP 1391213; Liu та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1996, сс. 8618-8623) і каліхеаміцин (Lode та ін. *Cancer Res.* 58, 1998, с. 2928; Hinman та ін. *Cancer Res.* 53, 1993, сс. 3336-3342).

В кон'югатах антитіло-лікарський засіб (ADC), пропонованих у винаході, антитіло (At) кон'юговане за допомогою лінкера (L) з одним або декількома фрагментами, які являють собою лікарський засіб (D), так що на одне антитіло припадає, наприклад від приблизно 1 до приблизно 20 фрагментів, які являють собою лікарський засіб. ADC, який мають формулу:



можна одержувати декількома шляхами з використанням реакцій органічної хімії, умов і реагентів, відомих спеціалістам у даній галузі, включаючи: (1) взаємодію нуклеофільної групи антитіла із двовалентним лінкером з утворенням At-L за допомогою ковалентного зв'язку й наступну взаємодію із фрагментом, який являє собою лікарський засіб D; і (2) взаємодію нуклеофільної групи фрагмента, який являє собою лікарський засіб, із двовалентним лінкером з утворенням D-L за допомогою ковалентного зв'язку й наступну взаємодію з нуклеофільною групою антитіла. У даному описі представлені інші методи одержання ADC.

Лінкер може складатися з одного або декількох лінкерних компонентів. Прикладами лінкерних компонентів є 6-малеїмідокпроїл («MC»), малеїмідпропанол («MP»), валін-цитрулін («val-cit»), аланін-фенілаланін («ala-phe»), пара-амінобензилкарбоніл («PAB»), N-сукцинімідил-4-(2-піридилтіо)пентаноат («SPP»), N-сукцинімідил-4-N-малеїмідометилциклогексан-1-карбоксилат («SMCC») і N-сукцинімідил-4-(йодацетил)амінобензоат («SIAB»). У даній галузі відомі інші лінкерні компоненти, і деякі з них представлені в даному описі.

У деяких варіантах здійснення винаходу лінкер може містити амінокислотні залишки. Прикладами амінокислотних лінкерних компонентів є дипептид, трипептид, тетрапептид або пентапептид. Прикладами дипептидів є: валін-цитрулін (vc або val-cit), аланін-фенілаланін (af або ala-phe). Прикладами трипептидів є: гліцин-валін-цитрулін (gly-val-cit) і гліцин-гліцин-гліцин (gly-gly-gly). Амінокислотні залишки, які являють собою амінокислотний лінкерний компонент, включають амінокислоти, які зустрічаються в природних умовах, а також мінорні амінокислоти й амінокислотні аналоги, які не зустрічаються в природних умовах, такі як цитрулін. Амінокислотні лінкерні компоненти можна конструювати й оптимізувати із погляду їх вибіркового розщеплення конкретними ферментами, наприклад, асоційованою з пухлиною протеазою, катепсіном B, C і D, або плазміновою протеазою.

Нуклеофільні групи антитіл включають (але не обмежуючись ними): (I) N-кінцеві аміногрупи, (II) аміногрупи бічних ланцюгів, наприклад, лізин, (III) тіольні групи бічних ланцюгів, наприклад, цистеїн, і (IV) гідроксильні або аміногрупи цукрів, коли анти-

тіло глікозильовано. Аміногрупа, тіольна, гідроксильна, гідразидна, оксимова, гідразидна, тіосемікарбазонова, гідразинкарбоксилатна та арилгідразидна групи є нуклеофільними та мають здатність взаємодіяти з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами на лінкерних фрагментах і лінкерах, включаючи: (I) активні складні ефіри, такі як складні NHS-ефіри, складні HOBt-ефіри, галоформіати та галоїдангідріди; (II) галоїдні алкіли та бензили, такі як галоацетаміди; (III) альдегідні, кетонні, карбоксильні та малеїмідні групи. Деякі антитіла мають здатні до відновлення міжланцюгові дисульфідні, тобто цистеїнові містки. Антитіла можна зробити реакційноздатними щодо кон'югації з лінкерами шляхом обробки відновником, таким як ДТТ (дитіотреїтол). Таким чином, теоретично кожний цистеїновий місток може утворювати два реакційноздатні тіольні нуклеофіли. В антитіло можна інтродукувати додаткові нуклеофільні групи шляхом взаємодії лізину з 2-імінотіолоном (реагент Траута), що приводить до перетворення аміногрупи на тіольну групу. Реакційноздатні тіольні групи можна інтродукувати в антитіло (або його фрагмент) шляхом вбудовування одного, двох, трьох, чотирьох або більшої кількості залишків цистеїну (наприклад, з одержанням мутантних антитіл, що містять один або декілька ненативних цистеїнових амінокислотних залишків).

Кон'югати антитіло-лікарський засіб, пропоновані у винаході, можна одержувати також шляхом модифікації антитіла за допомогою інтродукції електрофільних фрагментів, які можуть взаємодіяти з нуклеофільними замісниками на лінкері або лікарському засобі. Цукри глікозильованих антитіл можна окиснювати, наприклад, за допомогою перйодатних окисників з утворенням альдегідних або кетонних груп, які можуть взаємодіяти з аміногрупою лінкерів або фрагментів лікарського засобу. Утворені групи, що являють собою імінові основи Шиффа, можуть утворювати стабільний зв'язок, або їх можна відновлювати, наприклад, борогідридними реагентами, з утворенням стабільних амінових зв'язків. В одному з варіантів здійснення винаходу взаємодія вуглеводного фрагмента глікозильованого антитіла або з галактозооксидазою, або з мета-перйодатом натрію може приводити до утворення карбонільних (альдегідних і кетонних) груп у білку, які можуть взаємодіяти з відповідними групами на лікарському засобі (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). В іншому варіанті здійснення винаходу білки, що містять N-кінцеві серинові або треонінові залишки, можна піддавати взаємодії з мета-перйодатом натрію з утворенням альдегіду на місці першої амінокислоти (Geoghegan і Stroh, *Bioconjugate Chem.* 3, 1992, сс. 138-146; US 5362852). Такий альдегід може вступати у взаємодію із фрагментом, що являє собою лікарський засіб, або лінкерним нуклеофілом.

В альтернативному варіанті злитий білок, що містить антитіло та цитотоксичний агент, можна створювати, наприклад, методами рекомбінації або пептидним синтезом. Ділянка ДНК може містити відповідні ділянки, які кодують дві частини кон'югату, які або є суміжними одна з одною, або розділені ділянкою, яка кодує лінкерний пептид та яка

не викликає порушення необхідних властивостей кон'югату.

Ще в одному варіанті здійснення винаходу антитіло можна кон'югувати із «рецептором» (таким як стрептавідин) для того, щоб використовувати при здійсненні попереднього напрямленого переносу в пухлину, коли кон'югат антитіло-рецептор вводять в організм пацієнта, після чого видаляють незв'язаний кон'югат із кровотоку з використанням агента, що сприяє кліренсу, і потім вводять «ліганд» (наприклад, авідин), який кон'югує із цитотоксичним агентом (наприклад, радіонуклеотидом).

В даній галузі добре відомі та знаходять широке застосування конкретні методи одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб шляхом зв'язування токсинів з очищеними антитілами. Наприклад, кон'югацію очищеного моноклонального антитіла з токсином DM1 можна здійснювати в такий спосіб. Очищене антитіло дериватизують за допомогою N-сукцинімідил-4-(2-піридилтіо)пентаноату (SPP) з метою введення дітіопіридилних груп. Антитіло (376,0мг, 8мг/мл) в 44,7мл 50мМ калій-фосфатного буфера (рН 6,5), що містить NaCl (50 мМ) і ЕДТК (1 мМ), обробляють SPP (5,3 молярних еквіваленти в 2,3мл етанолу). Після інкубації протягом 90 хв. в атмосфері аргону при температурі навколишнього середовища, реакційну суміш піддають гель-фільтрації на Sephadex G-25-колонці, урівноваженій 35мМ цитратом натрію, 154мМ NaCl та 2мМ ЕДТК. Потім фракції, що містять антитіло, поєднують і аналізують. Антитіло-SPP-Пу (337,0мг із відщеплюваними 2-тіопіридиновими групами) розбавляють за допомогою зазначеного вище 35мМ натрій-цитратного буфера, рН 6,5, до кінцевої концентрації 2,5мг/мл. Потім до розчину антитіла додають DM1 (1,7 еквівалентів, 16,1 моль) в 3,0мМ диметилацетаміді (DMA, 3 об. % у кінцевій реакційній суміші). Реакції дають протікати протягом 20 год. при температурі навколишнього середовища в атмосфері аргону. Реакційну суміш вносять на Sephacryl S300-колонку для гель-фільтрації (5,0 см×90,0 см, 1,77 л), урівноважену 35мМ цитратом натрію, 154мМ NaCl, рН 6,5. Швидкість потоку становить 5,0мл/хв., збирають 65 фракцій (по 20,0мл кожна). Фракції поєднують і аналізують, при цьому кількість молекул лікарського засобу DM1, зчеплених з однією молекулою антитіла (р') визначають шляхом зміни абсорбції при 252 та 280нм.

Як ілюстрація нижче наведений опис методу, яким можна здійснювати кон'югацію очищеного моноклонального антитіла з токсином DM1. Очищене антитіло дериватизують за допомогою сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилату (SMCC, фірма Pierce Biotechnology, Inc) для інтродукції SMCC-лінкера. Антитіло в концентрації 20мг/мл в 50мМ фосфаті калію/50мМ хлориді натрію/2мМ ЕДТК, рН 6,5 обробляють 7,5 молярними еквівалентами SMCC (20мМ у ДМСО, 6,7мг/мл). Після перемішування протягом 2 год. в атмосфері аргону при температурі навколишнього середовища реакційну суміш фільтрують через колонку Sephadex G25, урівноважену 50мМ фосфатом калію/50мМ хлоридом натрію/2мМ ЕДТК, рН

6,5. Фракції, які містять антитіло, поєднують і аналізують. Потім кон'югат антитіло-SMCC розбавляють 50мМ фосфатом калію/50мМ хлоридом натрію/2мМ ЕДТК, рН 6,5 до кінцевої концентрації 10мг/мл і піддають взаємодії з 10мМ розчином DM1 (1,7 екв., що припускає 5 SMCC/антитіло, 7,37мг/мл) у диметилацетаміді. Реакційну суміш перемішують при температурі навколишнього середовища в атмосфері аргону протягом 16,5 год. Потім одержану в результаті кон'югації суміш фільтрують через Sephadex G25-колонку для гель-фільтрації (1,5×4,9 см) з використанням 1×3ФР при рН 6,5. Після цього співвідношення DM1/антитіло (р) визначають шляхом вимірювання абсорбції при 252 та 280нм.

Крім того, вільний цистеїновий залишок на розглянутому антитілі можна модифікувати за допомогою реагенту BM(PEO)4, що містить бісмалеїдогрупу (фірма Pierce Chemical), залишаючи малеїмідогрупу на поверхні антитіла такою, що не прореагувала. Це можна здійснювати шляхом розчинення BM(PEO)4 у суміші 50%-вий етанол/вода до концентрації 10мМ і додавання десятикратного молярного надлишку до розчину, що містить антитіло в забуференому фосфатом соляному розчині при концентрації приблизно 1,6мг/мл (10 мікромоль), і даючи суміші прореагувати протягом 1 год. Надлишок BM(PEO)4 видаляють гель-фільтрацією в 30мМ цитратному буфері, рН 6, що містить 150мМ NaCl. Приблизно 10-кратний молярний надлишок DM1 розчиняють у диметилацетаміді (DMA) і додають до проміжного продукту, що являє собою антитіло-BMPEO. Для розчинення реагенту, який містить фрагмент, що являє собою лікарський засіб, можна використовувати також диметилформамід (DMF). Реакційній суміші дають прореагувати протягом ночі, після чого здійснюють гель-фільтрацію або діаліз у 3ФР для видалення лікарського засобу, що не прореагував. Для видалення високомолекулярних агрегатів і одержання очищеного кон'югату антитіло-BMPEO-DM1 застосовують гельфільтрацію на S200-колонках у 3ФР.

Як правило, цитотоксичні лікарські засоби кон'югують з антитілами за допомогою лізинових залишків, які часто присутні на антитілі у великих кількостях. Здійснюють також кон'югацію за допомогою тільних груп, які присутні або які вбудовують в антитіло, яке являє інтерес. Наприклад, опубліковані дані про те, що цистеїнові залишки інтродуквали в білки методами генетичної інженерії для формування сайтів для ковалентного приєднання лігандів (Better та ін., J. Biol. Chem. 13, 1994, сс. 9644- 9650; Bernhard та ін., Bioconjugate Chem. 5, 1994, сс. 126-132; Greenwood та ін., Therapeutic Immunology 1, 1994, сс. 247-255; Tu та ін., Proc. Natl. Acad. Sci USA 96, 1999, сс. 4862-4867; Kanno та ін., J. of Biotechnology, 76, 2000, сс. 207-214; Chmura та ін., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15), 2001, сс. 8480-8484; US 6248564). Коли в антитілі, що являє інтерес, є присутнім вільний цистеїновий залишок, то токсини можна зв'язувати із цим сайтом. Наприклад, реагенти, що являють собою лінкери для лікарського засобу, малеїмідокапроїл-монометилауристатин Е (MMAE), тобто MC-MMAE, малеїмідокапроїл-

монометилауристатин F (MMAF), тобто MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE або MC-val-cit-PAB-MMAF, розчинені в ДМСО, розбавляють в ацетонітрилі та воді до відомої концентрації та додають до охолодженого, дериватизованого шляхом вбудовування цистеїну антитіла в забуференому фосфаті соляному розчині (ЗФР). Приблизно через 1 год. додають надлишок малеїміду для припинення реакції та кепювання будь-яких тільних груп антитіла, які не прореагували. Реакційну суміш концентрують шляхом відцентрової ультрафільтрації та кон'югуюване з токсином антитіло очищають і знесолюють шляхом елюції через смолу G25 у ЗФР, фільтрують через фільтри з розміром отворів 0,2мкм у стерильних умовах і заморожують для зберігання.

Крім того, антитіла до ТАТ, пропоновані в даному винаході, можна кон'югувати із токсинами, що являють собою ауристатин і долостатин (такими як MMAE і MMAF), за допомогою наступного методу. Антитіло, розчинене в 500мМ борату натрію та 500мМ хлориду натрію при рН 8,0, обробляють надлишком 100мМ дітіотреїтолу (ДТТ). Після інкубації при 37°C протягом приблизно 30 хв., буфер заміняють шляхом елюції через смолу Sephadex G25 та елюють за допомогою ЗФР, що містить 1мМ ДТПК (діетилентриамінпентаоцтова кислота). Величину, що являє собою кількість тільних груп/Ат перевіряють шляхом визначення концентрації відновленого антитіла на основі вимірювання абсорбції розчином при 280нм і тільної концентрації за допомогою взаємодії з DTNB (фірма Aldrich, Мілуокі, шт. Вісконсин) і визначення абсорбції при 412нм. Відновлене антитіло розчиняють у ЗФР і охолоджують на льоді.

Реагент, що являє собою лінкер для лікарського засобу, (1) малеїмідокапроїлмонометіауристатин Е (MMAE), тобто MC-MMAE, (2) MC-MMAF, (3) MC-val-cit-PAB-MMAE або (4) MC-val-cit-PAB-MMAF, розчинений у ДМСО, розбавляють в ацетонітрилі та воді до відомої концентрації й додають до охолодженого відновленого антитіла в ЗФР. Приблизно через 1 год. додають надлишок малеїміду для припинення реакції та кепювання будь-яких тільних груп антитіла, які не прореагували. Реакційну суміш концентрують шляхом відцентрової ультрафільтрації та кон'югуюване антитіло очищають і знесолюють шляхом елюції через смолу G25 у ЗФР, фільтрують через фільтри з розмірами отворів 0,2мкм у стерильних умовах і заморожують для зберігання.

Приклад 11: Аналіз знищення пухлинних клітин in vitro

Клітини ссавців, які експресують ТАТ-поліпептид, що являє інтерес, можна одержувати за допомогою стандартних експресійних векторів і методів клонування. З іншого боку, багато ліній пухлинних клітин, які експресують ТАТ-поліпептид, що являє інтерес, доступні науковій громадськості, наприклад, їх можна одержувати з АТСС і їх легко можна ідентифікувати за допомогою стандартних аналізів ELISA або FACS. Моноклональні антитіла до ТАТ-поліпептиду (і їх похідні у вигляді кон'югатів з токсинами) можна застосовувати потім в аналізах з визначення здатності антитіла знищувати експресуючі ТАТ-поліпептид клітини in vitro.

Наприклад, клітини, які експресують ТАТ-поліпептид, що являє інтерес, одержують відповідно до описаного вище методу та висівають в 96-лункові планшети. У цьому аналізі кон'югат антитіло/токсин (або «оголене» антитіло) вбудовують у процесі 4-денної інкубації в клітини. В іншому незалежному аналізі клітини інкубують протягом 1 год. із кон'югатом антитіло/токсин (або «оголене» антитіло) і потім відмивають і інкубують у присутності кон'югату антитіло/токсин або без нього протягом 4 днів. Потім життєздатність клітин оцінюють за допомогою аналізу CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability фірми Promega (каталоговий № G7571). Необроблені клітини використовують як негативний контроль.

У першому експерименті, проведеному при здійсненні даного винаходу, оцінювали здатність різних концентрацій кон'югатів MMAF і MMAE химерних антитіл 3A5 і химерних антитіл 11D10 знищувати (1) експресуючі поліпептид ТАТ10772 клітини лінії OVCAR-3, (2) клітини, одержані з лінії PC3, створені для стабільної експресії поліпептиду ТАТ10772 на клітинній поверхні (PC3/A5.3B2), і (3) клітини лінії PC3, які не експресують поліпептид ТАТ10772 (PC3/neo). Застосовувані в цьому аналізі химерні антитіла 3A містили амінокислотну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:211, і амінокислотну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:11. Застосовувані в цьому аналізі химерні антитіла 11D10 містили амінокислотну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:4, і амінокислотну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:7. Результати цих експериментів представлені на Фіг. 26-31, і вони демонструють, що кожне з кон'югованих з токсином антитіл викликало помітні рівні смертності клітин ліній OVCAR-3 та PC3/A5.3B2 (тобто клітин, які експресують поліпептид ТАТ10772 на клітинній поверхні), у той час у всіх антитіл не виявлено ніякої помітної здатності знищувати клітини лінії PC3/neo (які не експресують поліпептид ТАТ10772 на клітинній поверхні). Ці дані демонструють, що вивчені антитіла мають здатність зв'язуватися з поліпептидом ТАТ10772 на поверхні клітин, які експресують зазначений поліпептид, і викликати загибель цих клітин in vitro.

Приклад 12: Аналіз знищення пухлинних клітин in vivo

Модель внутрішньочеревинної пухлини

Для тестування ефективності in vivo химерних антитіл 11D10 і 3A5 до поліпептиду ТАТ10772 мишам лінії 110 SCID вводили шляхом ін'єкції в черевинну порожнину клітини лінії OVCAR-3/лус з розрахунку  $2 \times 10^7$  клітин/миша та давали рости протягом 20 днів після ін'єкції. На 20 день після ін'єкції мишей розділяли на 9 різних груп по 9-10 мишей у групі, і в кожній миші визначали об'єм пухлини. У дні 23, 30, 37 і 44 після ін'єкції мишей обробляли в такий спосіб:

групу А - тільки наповнювачем,

групу Б - химерним 11D10-MC-vc-PAB-MMAE з розрахунку 2,5мкг/кг,

групу В - химерним 11D10-MC-vc-PAB-MMAF з розрахунку 2,5мг/кг,  
 групу Г - химерним 11D10-MC-MMAF з розрахунку 2,5мг/кг,  
 групу Д - химерним 3A5-MC-VC-PAB-MMAE з розрахунку 2,5мг/кг,  
 групу Е - химерним 3A5-MC-VC-PAB-MMAF з розрахунку 2,5мг/кг,  
 групу Є - химерним 3A5-MC-MMAF з розрахунку 2,5мг/кг,  
 групу Ж - антитілом до антигену амброзії MC-vc-PAB-MMAE з розрахунку 2,5мг/кг,  
 групу З - антитілом до антигену амброзії MC-vc-PAB-MMAF з розрахунку 2,5мг/кг.

Обсяг пухлини вимірювали в кожній миші на 27, 34, 41, 48, 55 і 69 дні після ін'єкції для визначення ефективності кожної обробки відносно зменшення об'єму пухлини. Крім того, щодня протягом 250 днів після обробки визначали відсоток виживання тварин.

Результати цих аналізів *in vivo* продемонстрували, що в мишей, яких обробляли тільки наповнювачем (група А) або неспецифічним стосовно TAT10772 антитілом до антигену амброзії (групи Ж та З), не було виявлено зменшення об'єму, що виявляється, пухлини після обробки. Фактично пухлини у цих тварин просто продовжували збільшуватися в розмірі із часом. Ці результати продемонстрували, що антитіла, які не мають здатності до зв'язування з поліпептидом TAT10772, навіть

будучи кон'югованими з токсином, не здійснюють специфічної (або навіть неспецифічної) терапевтичної дії. На відміну від цього в більшості тварин у групах Б-Є виявлено значиме та відтворюване зменшення об'єму пухлини після обробки, що свідчить про те, що обидва химерні антитіла 11D10 і 3A5 здійснюють специфічну терапевтичну дію *in vivo*. Фактично в багатьох тваринах у групах Б-Є виявлений повний некроз пухлини. Ці дані переконливо демонструють, що обидва химерні антитіла 11D10 і 3A5 мають специфічну значиму та відтворювану терапевтичну дію *in vivo* щодо лікування пухлин, які експресують поліпептид TAT10772.

Що стосується відсотка виживаності, то усі тварини в групах А, Ж та З загинули до 125 дня після імплантації. Однак, до цього моменту часу 90% тварин у групі Б, 80% тварин у групах Д і Е та 55% тварин у групах В, Г та Є залишалися живими, що свідчить про те, що обидва химерних антитіла 11D10 і 3A5 мають специфічну достовірну та відтворювану терапевтичну дію *in vivo* щодо лікування пухлин, які експресують поліпептид TAT10772. Результати, одержані за допомогою стандартної моделі пропорційного ризику Сох представлені нижче в таблиці 10, де наведені коефіцієнти ризику (H.R.) окремо для кожної з восьми підгруп, які не обробляли наповнювачем (для групи А, обробленої наповнювачем, коефіцієнт ризику був довільно призначений рівним 1,0).

Таблиця 10

Група	log H.R.	С. К. О. log H.R.	H.R.	95% довірчий інтервал для H.R.
В	-2,86	0,55	0,057	(0,019, 0,168)
С	-2,22	0,52	0,108	(0,039, 0,300)
Д	-1,40	0,48	0,248	(0,096, 0,635)
Е	-4,51	0,71	0,011	(0,0027, 0,044)
Г	-5,21	0,87	0,006	(0,001, 0,030)
Ж	-3,12	0,59	0,044	(0,013, 0,140)

Модель із використанням підшкірної ін'єкції, модель із використанням трансплантату в жирове тіло молочної залози та моделі з використанням ксенотрансплантатів

Результати додаткових експериментів *in vivo*, у яких оцінювали терапевтичну ефективність химерних антитіл 3A5, представлені на Фіг. 32-37. Більш конкретно, тестували кон'юговані з токсином химерні антитіла 3A5 відносно їх здатності зменшувати розмір пухлини *in vivo* для декількох різних форматів *in vivo*, включаючи утворення пухлини в результаті підшкірної ін'єкції клітин лінії PC3/C5.3B2 з наступними обробками різними антитілами (Фіг. 32), трансплантації клітин лінії OVCAR-3 у жирове тіло молочної залози мишей з вродженою відсутністю природних клітин-кілерів лінії SCID з наступними обробками різними антитілами (Фіг. 33-35 і 37) і ксенотрансплантації клітин лінії PC3/A5.3B2 у кількості 10 мільйонів на одну «голу» мишу (безтимусна миша з мутацією гена nude) з наступними обробками різними антитілами (Фіг. 36). Результати цих експериментів свідчать про те, що різні протестовані антитіла до TAT10772 мають ефективність при терапевтично-

му лікуванні *in vivo* пухлин, експресуючих TAT10772.

Приклад 13: Застосування TAT як зонд для гібридизації

У наведеному нижче методі описане використання нуклеотидної кодуєчої послідовності TAT як зонду для гібридизації, тобто для діагностики присутності пухлини в ссавця.

Представлену в даному описі ДНК, яка містить кодуєчу послідовність повнорозмірного або зрілого TAT, можна застосовувати як зонд для скринінгу гомологічних ДНК (наприклад тих, які кодують варіанти TAT, що зустрічаються в природних умовах) у бібліотеках кДНК людських тканин або геномних бібліотеках людських тканин.

Гібридизацію та відмивання фільтрів, які містять будь-які бібліотеки ДНК, проводили в наступних строгих умовах. Гібридизацію радіоактивно-маркованого виведеного з TAT зонду з фільтрами здійснювали в розчині, що містить 50% формаміду, 5×SSC, 0,1% ДСН, 0,1% пірофосфату натрію, 50мМ фосфату натрію, рН 6,8, 2×розчин Денхардта та 10% сульфату декстрану при 42°C протягом 20 год. Відмивання фільтрів проводили у водному

розчині, що містить 0,1×SSC та 0,1% ДСН при 42°C.

Потім можна ідентифікувати за допомогою стандартних методів, ДНК, які мають необхідну ідентичність послідовності мДНК, що кодує повнорозмірну нативну послідовність ТАТ.

Приклад 14: Експресія ТАТ in *E. coli*

У цьому прикладі продемонстроване одержання неглікозильованої форми ТАТ шляхом рекомбінантної експресії в *E. coli*.

Послідовність ДНК, що кодує ТАТ, спочатку ампліфікували з використанням вибраних ПЛР-праймерів. Праймери повинні містити сайти, розпізнавані рестриктазами, які відповідають сайтам, розпізнаваним рестриктазами, які розташовуються на експресійному векторі. Можна застосовувати різні експресійні вектори. Прикладом прийнятної вектора є рBR322 (одержаний з *E. coli*; див. Bolivar та ін., Gene, 2, 1977, с. 95), що містить гени, які обумовлюють стійкість до ампіциліну та тетрацикліну. Вектор розщеплювали рестриктазою та дефосфорилювали. Потім послідовності, одержані за допомогою ПЦР-ампліфікації, вбудовували шляхом лігування у вектор. Вектор переважно повинен включати послідовності, які кодують ген, що обумовлює стійкість до антибіотику, промотор *trp*, полігістидиновий лідер (включаючи перші 6 STII-кодони, полігістидинову послідовність і сайт розщеплення ентерокиназою), ділянку, яка кодує ТАТ, термінатор транскрипції фага лямбда та ген *argU*.

Потім суміш, одержану в результаті лігування, застосовували для трансформації вибраного штамму *E. coli* за допомогою методів, описаних в Sambrook та ін., вище. Трансформантів ідентифікували за їх здатністю рости на LB-планшетах і потім відбирали колонії, стійкі до антибіотику. Плазмидну ДНК можна виділяти та підтверджувати за допомогою рестрикційного аналізу та секвенування ДНК.

Відібрані клони можна вирощувати протягом ночі в рідкому культуральному середовищі, такому як LB-бульйон, доповненому антибіотиками. Одержані після культивування протягом ночі культури можна потім використовувати для інокулювання більших за розмірами культур. Потім клітини вирощували до необхідної оптичної густини, у цей час вмикалася експресія промотору.

Після культивування клітин протягом ще декількох годин клітини можна збирати центрифугуванням. Одержаний у результаті центрифугування клітинний дебрис можна солюбілізувати із використанням різних відомих у даній галузі агентів і солюбілізований білок ТАТ потім можна очищувати за допомогою колонки з хелатуючим металом в умовах, які забезпечують сильне зв'язування білка.

ТАТ можна експресувати в *E. coli* у формі, що включає поло-his-мітку, з використанням наступного методу. ДНК, яка кодує ТАТ, спочатку ампліфікували за допомогою вибраних ПЛР-праймерів. Праймери повинні містити сайти, розпізнавані рестриктазами, які відповідають сайтам, розпізнаваним рестриктазами, на експресійному векторі, і інші необхідні послідовності, які забезпечують ефективну та надійну ініціацію трансляції, швидке

очищення на колонці з хелатуючим металом і протеолітичне розщеплення ентерокиназою. Одержані після ПЛР-ампліфікації, мічені за допомогою полі-his послідовності потім вбудовували шляхом лігування в експресійний вектор, який застосовували для трансформації штаму-хазіяна *E. coli* 52 (W3110 *ruhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP (lacIq)*). Трансформантів спочатку вирощували в LB-середовищі, що містить 50мг/мл карбеніциліну, при 30°C при струшуванні до досягнення ОП<sub>600</sub> 3-5. Потім культури розводили в 50-100 разів середовищем CRAP (попередньо приготуванним шляхом змішання 3,57 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,71 г цитрату натрію·2H<sub>2</sub>O 1,07 г KCl, 5,36 г дріжджового екстракту Difco, 5,36 г гікази Sheffield SF в 500мл води, а також 110мМ MPOS, pH 7,3, 0,55% (мас./об.) глюкози та 7мМ MgSO<sub>4</sub>) і вирощували приблизно протягом 20-30 год. при 30°C при струшуванні. Зразки вилучали для підтвердження експресії за допомогою ДСН-ПААГ, і культуру великого розміру центрифугували для одержання клітинного дебрису. Клітинний дебрис зберігали в замороженому стані для очищення та повторної укладки ланцюга.

Пасту *E. coli*, одержану з ферментерів об'ємом 0,5-1л (6-10 г дебрису) ресуспендували в 10 об'ємах (мас./об.) буфера, що містить 7М гуанідин, 20мМ Трис, pH 8. Додавали твердий сульфат натрію та тетрагідрат натрію до кінцевих концентрацій 0,1 М і 0,02М відповідно та розчин перемішували протягом ночі при 4°C. Ця стадія дозволяла одержувати денатурований білок, у якому всі залишки цистеїну блоковані в результаті сульфітолізації. Розчин центрифугували при 40000 об/хв. на ультрацентрифузі фірми Beckman протягом 30 хв. Супернатант розводили 3-5 об'ємами буфера для хелатуючого металу (6М гуанідин, 20мМ Трис, pH 7,4) і фільтрували через фільтри з розміром отворів 0,22мк для освітлення. Освітлений екстракт вносили в колонку об'ємом 5мл з хелатуючим металом типу Qiagen Ni-NTA, урівноважену буфером для хелатуючого металу. Колонку промивали додатковим буфером, що містить 50мМ імідазолу (фірма Calbiochem, чистота Utrol), pH 7,4. Білок елюювали буфером, що містить 250мМ імідазол. Фракції, що містять необхідний білок, поєднували та зберігали при 4°C. Концентрацію білка визначали за абсорбцією при 280нм, використовуючи розрахований коефіцієнт збудження, ґрунтуючись на даних про його амінокислотну послідовність.

Здійснювали повторне укладку білка шляхом повільного розведення зразка у свіжоприготовленому буфері для повторної укладки, що містить: 20мМ Трис, pH 8,6, 0,3 М NaCl, 2,5М сечовину, 5мМ цистеїн, 20мМ гліцин в 1мМ ЕДТК. Об'єми для повторної укладки вибирали так, щоб кінцева концентрація білка становила 50-100мкг/мл. Розчин для повторної укладки обережно перемішували при 4°C протягом 12-36 год. Реакцію повторної укладки припиняли, додаючи ТФК до кінцевої концентрації 0,4% (значення pH приблизно 3). Перед додатковим очищенням білка розчин фільтрували через фільтр із розміром отворів 0,22мкм і додавали ацетонітрил до кінцевої концентрації 2-10%. Білок після повторної укладки хроматографували на колонці з оберненою фазою типу Poros R1/H,

використовуючи як рухому фазу буфер, що містить 0,1% ТФК, здійснюючи елюювання з використанням градієнта ацетонітрилу від 10 до 80%. Аліквоти фракцій, концентрацію яких визначали за абсорбцією при 280нм, аналізували на поліакриламідних гелях у присутності ДСН і фракції, що містять гомогенний повторно укладений білок поєднували. Як правило, види більшості білків із правильною повторною укладкою елюються при найнижчих концентраціях ацетонітрилу, оскільки ці види є найбільш компактними через те, що їх гідрофобні внутрішні ділянки захищені від взаємодії зі смолою оберненої фази. Агреговані види, як правило, елюються при більш високих концентраціях ацетонітрилу. Крім того, для відділення форм із помилковою укладкою від необхідних форм білків, на стадії з оберненою фазою вилучали зі зразків ендотоксин.

Фракції, які містять ТАТ-поліпептид з необхідною укладкою, поєднували й ацетонітрил вилучали, обережно барботуючи розчин струменем азоту. Білки включали в препаративну форму, яка містить 20мМ Hepes, рН 6,8 з 0,14М хлорид натрію та 4% маніту, шляхом діалізу або гель-фільтрації з використанням смол G25 Superfine (фірма Pharmacia), урівноважених у буфері для одержання препаративної форми, і стерилізували фільтрацією.

Деякі представлені в даному описі ТАТ-поліпептиди успішно експресували й очищали за допомогою зазначеного(их) методу(ів).

Приклад 15: Експресія ТАТ у клітинах ссавців

У цьому прикладі проілюстровано одержання потенційно глікозильованої форми ТАТ шляхом рекомбінантної експресії в клітинах ссавців.

Як експресійний вектор застосовували вектор pRK5 (див. EP 307247, опубліковану 15 березня 1989 р.). Необов'язково ДНК ТАТ вбудовували шляхом лігування в pRK5 за допомогою вібраних рестриктаз, які дозволяють вбудовувати ДНК ТАТ з використанням методів лігування, описаних в Sambrook та ін., вище. Одержаний вектор позначили як pRK5-TAT.

В одному з варіантів здійснення винаходу вибрані клітини-хазяїни можуть являти собою клітини лінії 293. Людські клітини лінії 293 (ATCC CCL 1573) вирощували до конфлюентності в планшетах для культури тканини в середовищі, такому як середовище DMEM, доповнене фетальною телячою сироваткою, і необов'язково живильними компонентами і/або антибіотиками. Приблизно 10мкг ДНК pRK5-TAT змішували приблизно з 1мкг ДНК, яка кодує РНК гену VA (Thimmaparra та ін., Cell, 31, 1982, с. 543), розчиняли в 500мкл 1мМ Трис-HCl, 0,1мМ ЕДТК, 0,227 CaCl<sub>2</sub>. До цієї суміші додавали по краплях 500мкл 50мМ HEPES (рН 7,35), 280мМ NaCl, 1,5мМ NaPO<sub>4</sub> і дозволяли утворитися осадку протягом 10 хв. при 25°C. Осад суспендували та додавали до клітин лінії 293 і витримували протягом приблизно 4 год. при 37°C. Культуральне середовище вилучали аспірацією та додавали протягом 30 с 2мл 20% гліцерину в ЗФР. Потім клітини лінії 293 промивали безсировотковим середовищем, додавали свіже середовище й клітини інкубували протягом приблизно 5 днів.

Приблизно через 24 год. після трансфекції культуральне середовище вилучали та замінювали культуральним середовищем (тільки) або культуральним середовищем, яке містить 200мКи/мл <sup>35</sup>S-цистеїну та 200мКи/мл <sup>35</sup>S-метіоніну. Після 12-годинної інкубації кондиціоноване середовище збирали, концентрували на обертовому фільтрі та вносили в гель, який містить 15% ДСН. Після електрофорезу гель можна сушити й експонувати на плівку протягом вибраного періоду часу для підтвердження присутності ТАТ-поліпептидів. Культурі, які містять трансфетовані клітини, можна піддавати додатковій інкубації (у безсировотковому середовищі) і біологічну активність середовища оцінювати за допомогою вибраних аналізів.

При використанні іншого підходу ТАТ можна короткочасно інтродукувати у клітини лінії 293 з використанням методу, заснованого на застосуванні сульфату декстрану, описаного в Sompayrac та ін., Proc. Natl. Acad. Sci., 12, 1981, с. 7575. Клітини лінії 293 вирощували до максимальної густини в обертовій колбі та додавали 700мкг ДНК pRK5-TAT. Клітини з обертової колби спочатку концентрували центрифугуванням і промивали ЗФР. Осад, який містить ДНК-декстран, інкубували на клітинному дебрисі протягом 4 год. Клітини обробляли 20% гліцерину протягом 90 с, промивали середовищем для культури тканини та повторно інтродукували в обертову колбу, яка містить середовище для культури тканини, 5мкг/мл бичачого інсуліну й 0,1мкг/мл бичачого трансферину. Приблизно через 4 дні кондиціоноване середовище центрифугували й фільтрували для вилучення клітин і дебрису. Потім зразки, які містять експресуючий ТАТ, концентрували й очищали за допомогою будь-якого вибраного методу, такого як діаліз і/або хроматографія на колонках.

В іншому варіанті здійснення винаходу ТАТ можна експресувати в СНО-клітинах. pRK5-TAT можна трансфектувати СНО-клітини, використовуючи відомі реагенти, такі як СаPO<sub>4</sub> або ДЕАЕ-декстран. Як зазначено вище, клітинні культури можна інкубувати і замінювати середовище культуральним середовищем (тільки) або культуральним середовищем, яке містить радіоактивну мітку, таку як <sup>35</sup>S-метіонін. Після визначення присутності ТАТ-поліпептиду культуральне середовище можна замінювати безсировотковим середовищем. Переважно культури інкубували протягом приблизно 6 днів, а потім збирали кондиціоноване середовище. Середовище, яке містить ТАТ, що експресується, потім можна концентрувати й очищувати за допомогою будь-якого вибраного методу.

ТАТ з міченими епітопами можна також експресувати, використовуючи як клітини-хазяїни СНО. ТАТ можна субклонувати у векторі pRK5. Вставку субклону можна піддавати ПЛР для злиття в рамці зчитування з вибраною міткою епітопу, такою як поліістидинова (полі-his) мітка в бакуловірусному експресійному векторі. Мічену за допомогою полі-his вставку ТАТ можна потім субклонувати у векторі, одержаному з OB40, який містить селектуємий маркер, такий DHFR, для відбору стабільних клонів. І, нарешті, СНО-клітини можна трансфектувати (відповідно до описаного вище

методу), використовуючи для введення вектор на основі OB40. Для підтвердження експресії можна здійснювати мічення відповідно до описаного вище методу. Потім культуральне середовище, яке містить експресуючий поло-his-мітку TAT, можна концентрувати й очищувати за допомогою будь-якого вибраного методу, такого як афінна  $\text{Ni}^{2+}$ -хелатувальна хроматографія.

TAT можна експресувати також в CHO- і/або COS-клітинах, використовуючи процедуру короткочасної експресії, або в CHO-клітинах з використанням будь-якої іншої процедури експресії.

Стабільну експресію в CHO-клітинах здійснювали за допомогою наступної процедури. Білки експресували у вигляді IgG-конструкції (імуноадгезин), у якій кодуючі послідовності розчинних форм (наприклад, позаклітинних доменів) відповідних білків зливали з послідовністю константної ділянки Ig1, яка містить шарнірну ділянку, CH2- і CH2-домени, і/або у вигляді міченої за допомогою полі-his форми.

Після ПЦР-ампліфікації відповідні ДНК субклонували в експресійному векторі, придатному для CHO, за допомогою стандартних методів, описаних в Ausubel та ін., *Current Protocols of Molecular Biology*, вид-во John Wiley and Sons, Unit 3.16, 1997. Конструювали експресійні вектори, придатні для CHO, сумісні із сайтами рестрикції на 5'- і 3'-кінцях ДНК-вставки, яка являє інтерес, що є зручним для «човникового» переносу кДНК. Вектор, застосовуваний для експресії в CHO-клітинах, описаний в Lucas та ін., *Nucl. Acids Res.* 24, 1996, сс. 1774-1779), поряд з його застосуванням з раннім промотором OB40/енхансером для запуску кДНК, яка являє інтерес і дигідрофолатредуктази (DHFR). Експресія DHFR дозволяє здійснювати селекцію за ознакою підтримки стабільності плазмиди після трансфекції.

Двадцять мкг необхідної плазмідної ДНК інтродукуювали приблизно в 10 мільйонах CHO-клітин за допомогою реагентів, які надходять у продаж для трансфекції SUPERFECT® (фірма Qiagen), DOSPER® або FUGENE® (фірма Boehringer Mannheim). Клітини вирощували відповідно до методу, описаного в Lucas та ін., вище. Приблизно  $3 \times 10^7$  клітин заморожували в ампулі для подальшого вирощування та виробництва відповідно до описаного нижче методу.

Ампули, які містять плазмідну ДНК, піддавали відтаванню, поміщаючи на водяну баню, і інтенсивно струшували. Вміст відбирали піпеткою та переносили в центрифужну пробірку, яка містить 10мл середовища, і центрифугували при 1000 об/хв. протягом 5 хв. Супернатант відбирали аспірацією й клітини ресуспендували в 10мл середовища для селекції (профільтроване через фільтр із розміром отворів 0,2мкм середовище PS20, доповнене 5% фетальної бичачої сироватки, обробленої діалізом-фільтрацією через фільтр із розміром отворів 0,2мкм). Потім аліквоти клітин вносили в 100-мілілітрову центрифугу, яка містить 90мл середовища для селекції. Через 1-2 дні клітини переносили в 250-мілілітрову центрифугу, яка містить 150мл середовища для селекції й інкубували при 37°C. Ще через 2-3 дні в 250-, 500- і 2000-

мілітрові центрифуги засівали з розрахунку  $3 \times 10^5$  клітин/мл. Середовище для клітин замінювали свіжим середовищем шляхом центрифугування та ресуспендували в середовищі для виробництва. Хоча можна застосовувати будь-яку придатну для CHO середовище, фактично можна застосовувати середовище для виробництва, описане в U.S. 5122469, виданому 16 червня 1992 р. В 3-літрову центрифугу для виробництва висівали  $1,2 \times 10^6$  клітин/мл. На 0 день визначали значення pH клітин. На 1 день із центрифуги брали зразок і починали продувку профільтованим повітрям. На 2 день із центрифуги брали зразок, температуру струшували до 33°C і розчиняли 30мл глюкози з концентрацією 500 г/л і 0,6мл 10%-вої протисліпкової речовини (наприклад, 35%-вої емульсії полідиметилсилоксану, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). У процесі виробництва значення pH регулювали при необхідності та підтримували на рівні 7,2. Через 10 днів або коли життєздатність падала нижче 70%, клітинну культуру збирали центрифугуванням і фільтрували через фільтр із розміром отворів 0,22мкм. Фільтрат або зберігали при 4°C або негайно вносили в колонки для очищення. Для конструкцій, мічених за допомогою полі-his, білки очищали з використанням колонки Ni-NTA (фірма Qiagen). Перед очищенням до кондиціонованого середовища додавали імідазол до концентрації 5 мМ. Кондиціоноване середовище нагнітали помпою на 6-мілілітрову Ni-NTA-колонку, урівноважену 20мМ Hepes, pH 7,4, буфером, що містить 0,3М NaCl та 5мМ імідазол, зі швидкістю потоку 4-5мл/хв. при 4°C. Після заповнення колонки промивали додатковим врівноважуючим буфером, і білок елюювали врівноважуючим буфером, що містить 0,25М імідазол. Білок з високим ступенем очищення потім знесолювали в буфері для зберігання, що містить 10мМ Hepes, 0,14М NaCl та 4% маніту, pH 6,8, з використанням 25-мілілітрової колонки типу G25 Superfine (фірма Pharmacia) і зберігали при -80°C.

Конструкції, які містили імуноадгезин (які несуть Fc) очищали з кондиціонованого середовища в такий спосіб. Кондиціоноване середовище нагнітали за допомогою помпи в 5-мілілітрову колонку (фірма Pharmacia), що містить протеїн А, попередньо врівноважену 20мМ Na-фосфатним буфером pH 6,8. Після заповнення колонки інтенсивно промивали врівноважуючим буфером, перед елюванням 100мМ лимонною кислотою, pH 3,5. Елюований білок негайно нейтралізували шляхом збирання 1-мілілітрових фракцій у пробірки, що містять 275мкл 1М Трис-буфера, pH 9. Білок з високим ступенем очищення потім знесолювали в буфері для зберігання, як описано вище для білків, що несуть полі-his мітку. Еомогенність визначали за допомогою поліакриламідних гелів у присутності DCH і N-кінцевого амінокислотного секвенування з розщепленням за Едманом.

Деякі представлені в даному описі TAT-поліпептиди успішно експресували та очищали за допомогою зазначеного(их) методу(ів).

Приклад 16: Експресія TAT у дріжджах

Нижче описаний метод рекомбінантної експресії TAT у дріжджах.

Насамперед, конструювали придатні для дріжджів експресійні вектори для внутрішньоклітинного виробництва або секреції ТАТ під контролем промотору ADH2/GAPDH. ДНК, що кодує ТАТ і промотор, вбудовували в придатні сайти рестрикції в вибраній плазмиді для здійснення безпосередньої внутрішньоклітинної експресії ТАТ. Для секреції ДНК, що кодує ТАТ, можна клонувати в вибраній плазмиді разом із ДНК, що кодує промотор ADH2/GAPDH, нативний сигнальний пептид ТАТ або інший сигнальний пептид ссавців, або, наприклад, альфа-фактор або сигнал секреції інвертази/лідерну послідовність дріжджів, і лінкерні послідовності (при необхідності), придатні для експресії ТАТ.

Клітини дріжджів, наприклад, штам дріжджів AB110, можна потім трансформувати описаними вище експресійними плазмидами та культивувати в вибраних зброджуваних середовищах. Супернатанти трансформованих дріжджів можна аналізувати шляхом осадження 10%-вою трифтороцтовою кислотою та розділення на ПААГ-ДСН із наступним забарвленням гелів кумаси брильянто-вим блакитним.

Потім рекомбінантний ТАТ можна виділяти й очищувати шляхом видалення дріжджових клітин зі зброджуваного середовища центрифугуванням і наступного концентрування середовища за допомогою вибраних патронних фільтрів. Концентрат, який містить ТАТ, можна додатково очищувати за допомогою хроматографії на колонках зі смолою.

Деякі представлені в даному описі ТАТ-поліпептиди успішно експресували й очищали за допомогою зазначеного(их) методу(ів).

Приклад 17: Експресія ТАТ у заражених бакуловірусом клітинах комах

Нижче описаний метод рекомбінантної експресії ТАТ у заражених бакуловірусом клітинах комах.

Послідовність, яка кодує ТАТ, зливали проти ходу транскрипції відносно мітки епітопу, у бакуловірусному експресійному векторі. Такі мітки епітопів включають поло-гш-мітки й імуноглобулінові мітки (типу Fc-ділянок IgG). Можна застосовувати різні плазмиди, включаючи плазмиди, одержані із плазмід, які надходять у продаж, таких як pVL1393 (фірма Novagen). В цілому, метод полягає у наступному: послідовність, яка кодує ТАТ або необхідний фрагмент кодуючої послідовності ТАТ, такої як послідовність, яка кодує позаклітинний домен трансмембранного білка, або послідовність, яка кодує зрілий білок, якщо білок являє собою позаклітинний білок, ампліфікований за допомогою ПЛР із використанням праймерів, комплементарних 5'- і 3'-ділянкам. 5'-праймер може включати фланкуючі (вибрані) сайти, розпізнавані рестриктазами. Потім продукт розщеплювали за допомогою зазначених вибраних рестриктаз і субклонували в експресійному векторі.

Рекомбінантний бакуловірус створювали шляхом трансфекції вищевказаної плазмиди та вірусної ДНК BACULOGOLD™ (фірма Pharmingen) у клітинах *Spodoptera frugiperda* («Sf9») (ATCC CRL 1711) за допомогою ліпофектину (що надходить у продаж від фірми GIBCO-BRL). Після інкубації

протягом 4-5 днів при 28°C вірус, що вивільняється, збирали та використовували для додаткових ампліфікацій. Зараження вірусом і експресію білка здійснювали відповідно до методу, описаного в O'Reilly та ін., *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press, 1994.

Експресований мічений за допомогою поло-his-мітки ТАТ можна потім очищати, наприклад, з використанням  $\text{Ni}^{2+}$ -хелатної афінної хроматографії в такий спосіб. Одержували екстракти заражених рекомбінантним вірусом Sf9-клітин відповідно до методу, описаного в Rupert та ін., *Nature*, 362, 1993, сс. 175-179. В цілому, метод полягає у наступному: Sf9-клітини промивали, ресуспендували в обробленому ультразвуком буфері (25мл Hepes, pH 7,9; 12,5mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,1 mM EDTK; 10% гліцерину; 0,1% NP-40; 0,4M KCl) і обробляли двічі ультразвуком по 20 с. льодом. Одержані після обробки ультразвуком зразки освітлювали, центрифугували й супернатант розбавляли в 50 разів буфером для завантаження (50mM фосфат, 300mM NaCl, 10% гліцерину, pH 7,8) і фільтрували через фільтр із розміром отворів 0,45мкм. Підготували агарозну  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-колонку (що надходить у продаж від фірми Qiagen) з об'ємом шару 5мл, промивали 25мл води й урівноважували 25мл буфера для завантаження. Профільтрований клітинний екстракт вносили в колонку зі швидкістю 0,5мл/хв. Колонку промивали до вихідного рівня, що відповідає  $A_{280}$ , буфером для завантаження, у цей момент часу починали збір фракції. Потім колонку промивали другим промивним буфером (50mM фосфат; 300mM NaCl, 10% гліцерину, pH 6,0), який елюював неспецифічно зв'язаний білок. Після досягнення знову вихідного рівня, який відповідає  $A_{280}$ , колонку обробляли, використовуючи градієнт імідазолу від 0 до 500mM у другому промивному буфері. Збирали фракції об'ємом 1мл і аналізували за допомогою ДСН-ПААГ і забарвленням сріблом або Вестерн-блотингом з використанням кон'югованої з  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA лужної фосфатази (фірма Qiagen). Фракції, які містять елюований мічений за допомогою his<sub>10</sub> ТАТ, поєднували й піддавали діалізу в протитечії буферу для завантаження.

В іншому варіанті очищення міченого за допомогою IgG (або міченого за допомогою Fc) ТАТ можна здійснювати за допомогою відомих хроматографічних методів, включаючи, наприклад, хроматографію на колонках, заповнених протеїном А або протеїном G.

Деякі представлені в даному описі ТАТ-поліпептиди успішно експресували й очищали за допомогою зазначеного(их) методу(ів).

Приклад 18: Очищення ТАТ-поліпептидів за допомогою специфічних антитіл

Нативні або рекомбінантні ТАТ-поліпептиди можна очищувати за допомогою різних стандартних методів, відомих в галузі очищення білків. Наприклад, про-ТАТ-поліпептид, зрілий ТАТ-поліпептид або пре-ТАТ-поліпептид очищали з використанням імуноафінної хроматографії за допомогою антитіл, специфічних у відношенні ТАТ-поліпептиду, який являє інтерес. В цілому, метод полягає у наступному: збирали колонку для імуно-



афінної хроматографії шляхом ковалентного зшивання антитіла до ТАТ-поліпептиду з активованою хроматографічною смолою.

Одержували поліклональні імуноглобуліни з імунної сироватки або шляхом осадження сульфатом амонію, або шляхом очищення на імобілізованому протеїні А (фірма Pharmacia LKB Biotechnology, Піскатавей, шт. Нью-Джерсі). Аналогічно цьому моноклональні антитіла одержували з асцитної рідини мишей шляхом осадження сульфатом амонію або шляхом хроматографії на імобілізованому протеїні А. Частково очищений імуноглобулін ковалентно зв'язували із хроматографічною смолою, такою як активована  $\text{CnBr}$  SEPHAROSE™ (фірма Pharmacia LKB Biotechnology). Антитіло зшивали зі смолою, смола блокували та похідну смоли промивали відповідно до інструкцій виробника.

Таку імуноафінну колонку застосовували для очищення ТАТ-поліпептиду шляхом одержання фракції із клітин, які містять ТАТ-поліпептид у розчинній формі. Цей препарат приготувляли шляхом солюбілізації цілої клітини або субклітинної фракції, одержаної після диференціального центрифугування при додаванні детергенту, або будь-якими іншими методами, добре відомими в даній галузі. В іншому варіанті розчинний ТАТ-поліпептид, який містить сигнальну послідовність, може секретуватися в прийнятній кількості в середовище, у якому вирощували клітини.

Препарат, який містить розчинний ТАТ поліпептид, пропускали через імуноафінну колонку й колонку промивали в умовах, які забезпечують переважну абсорбцію ТАТ-поліпептиду (наприклад, буфери з високою іонною силою в присутності детергенту). Потім колонку елюювали в умовах, при яких, відбувається порушення зв'язування антитіла/ТАТ-поліпептид (наприклад, буфер з низьким значенням рН, наприклад, зі значення рН 2-3, або висока концентрація хаотропного агента, такого як сечовина або іон тіоціанату), і збирали ТАТ-поліпептид.

Депонування матеріалу

В Американській колекції типових культур (American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC)) були депоновані наступні матеріали:

Таблиця 11

Матеріал	Per. № ATCC	Дата депонування
Лінія клітин гібридоми 3A5.3	PTA-6695	4 травня 2005 р.
Лінія клітин гібридоми 11D10.1.14	PTA-6696	4 травня 2005 р.

Ці депозити були зроблені відповідно до Будапештського договору про Міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для мети процедури патентування й з огляду на нижчезгадані правила (Будапештський договір). Це гарантує підтримання в життєздатному стані депонованої культури протягом 30 років, починаючи з дати депонування. ATCC повинна забезпечувати доступність депозитів відповідно до Будапештського договору й відповідно до угоди між фірмою Genentech, Inc. і ATCC, що гарантує постійну й необмежену доступність потомства депонованої культури для наукової громадськості після видачі відповідного патенту США або після опублікування для наукової громадськості будь-якої заявки на патент США або іноземної заявки на патент, яка буде опублікована першою, і гарантує доступність потомства для представника, зазначеного Комісаром за патентами і товарними знаками США, які повинні бути для цього озглавлені відповідно до 35 USC §122 і відповідних правил, затверджених Комісаром (включаючи 37 CFR §1.14, насамперед відповідно до 886 OG 638).

Уповноважений за даною заявкою згодний з тим, що, якщо культура депонованих матеріалів загине або буде загублена або порушена при культивуванні в придатних умовах, то матеріали після повідомлення повинні бути негайно замінені іншими такими ж. Доступність депонованого матеріалу не повинна бути витлумачена як ліцензія на втілення винаходу на практиці в порушення прав, гарантованих відповідним органом будь-якого уряду відповідно до його законів про патенти. Наведений вище письмовий опис винаходу повинен бути достатнім для того, щоб спеціаліст у даній галузі міг здійснити винахід на практиці. Обсяг даного винаходу не обмежений депонованими конструкціями, оскільки депонований варіант здійснення винаходу слід розглядати як одну з ілюстрацій конкретних об'єктів винаходу, і будь-які функціонально еквівалентні конструкції підпадають під обсяг даного винаходу. Депонування матеріалу в цьому випадку не означає ні можливість того, що представлений письмовий опис є неадекватним для здійснення на практиці будь-якого об'єкта винаходу, включаючи його найкращий варіант здійснення, ні те, що його можна розглядати як обмежуючий обсяг формули винаходу конкретними наведеними ілюстраціями. Фактично спеціалістам у даній галузі із представленого вище опису повинні бути очевидні різні модифікації винаходу крім наведених і описаних у даному описі, і вони підпадають під обсяг формули винаходу, яка дається.

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Дженентек, Інк.

<120> Композиції та способи діагностики й лікування пухлини

<130> P5040R1-РСТ

<140> РСТ/US2006/023099

<141> 2006-06-14

<150> US 60/793,951

<151> 2006-04-21

<150> US 60/692,092

<151> 2005-06-20

<160> 211

<210> 1

<211> 21112

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
cctgtgactt ctcttctcac ccctggcctg gtgataacca cagacaggat 50
gggcataagc agagaacctg gaaccagttc cacttcaaат ttgagcagca 100
cctcccatga gagactgacc actttggaag aactgtaga tacagaagcc 150
atgcagcctt ccacacacac agcagtgacc aacgtgagga cctccatttc 200
tggaсatgaa tcacaatctt ctgtcctatc tgactcagag acacccaaag 250
ccacatctcc aatgggtacc acctacacca tgggggaaac gagtgtttcc 300
atatccactt ctgacttctt tgagaccagc agaattcaga tagaaccaac 350
atcctccctg acttctggat tgagggagac cagcagctct gagaggatca 400
gctcagccac agagggaagc actgtccttt ctgaagtgcc cagtgggtgt 450
accactgagg tctccaggac agaagtgata tcctctaggg gaacatccat 500
gtcagggcct gatcagttca ccatatcacc agacatctct actgaagcga 550
```

217

93875

218

tcaccaggct ttctacttcc cccattatga cagaatcagc agaaagtgcc 600  
atcactattg agacaggttc tcttggggct acatcagagg gtaccctcac 650  
cttgacaccc tcaacaacaa ccttttggtc agggaccac tcaactgcat 700  
ctccaggatt ttcacactca gagatgacca ctcttatgag tagaactcct 750  
ggagatgtgc catggccgag ccttccctct gtggaagaag ccagctctgt 800  
ctcttctca ctgtcttcac ctgccatgac ctcaacttct tttttctcca 850  
cattaccaga gagcatctcc tctctctctc atcctgtgac tgcacttctc 900  
acccttggcc cagtgaagac cacagacatg ttgcgcacaa gctcagaacc 950  
tgaaaccagt tcacctcaa atttgagcag cacctcagct gaaatattag 1000  
ccacgtctga agtcaccaa gatagagaga aaattcatcc ctctcaaac 1050  
acacctgtag tcaatgtagg gactgtgatt tataaacatc tatcccttc 1100  
ctctgttttg gctgacttag tgacaacaaa acccacatct ccaatggcta 1150  
ccacctccac tctggggaat acaagtgtt ccacatcaac tctgccttc 1200  
ccagaaacta tgatgacaca gccaaacttc tccctgactt ctggattaag 1250  
ggagatcagt acctctcaag agaccagctc agcaacagag agaagtgcct 1300  
ctctttctgg aatgccact ggtgctacta ctaaggctc cagaacagaa 1350  
gccctctct taggcagaac atccaccca ggtcctgctc aatccacaat 1400  
atcaccagaa atctccacgg aaaccatcac tagaatttct actccctca 1450  
ccacgacagg atcagcagaa atgaccatca ccccaaaaac aggtcattct 1500  
ggggcatcct cacaaggtag ctttaccttg gacacatcaa gcagagctc 1550  
ctggccagga actcactcag ctgcaactca cagatctcca cactcagga 1600  
tgaccactcc tatgagcaga ggtcctgagg atgtgtcatg gccaaagccg 1650  
ccatcagtgg aaaaaactag cctccatct tccctggtgt ctttatctgc 1700  
agtaacctca ccttcgccac ttattccac accatctgag agtagccact 1750

cgtctcctct cgggtgact tctcttttca cccctgtcat gatgaagacc 1800  
acagacatgt tggacacaag cttggaacct gtgaccactt cacctcccag 1850  
tatgaatata acctcagatg agagtctggc cacttctaaa gccaccatgg 1900  
agacagaggc aattcagctt tcagaaaaca cagctgtgac tcagatgggc 1950  
accatcagtg ctagacaaga attctattcc tcttatccag gcctcccaga 2000  
gccatccaaa gtgacatctc cagtggtcac ctcttcacc ataaaagaca 2050  
ttgtttctac aaccatacct gcttcctctg agataacaag aattgagatg 2100  
gagtcaacat ccacctgac cccacacca agggagacca gcacctcca 2150  
ggagatccac tcagccaca agccaagcac tgttccttac aaggcactca 2200  
ctagtgccac gattgaggac tccatgacac aagtcatgtc ctctagcaga 2250  
ggacctagcc ctgatcagtc cacaatgtca caagacatat cactgaagt 2300  
gatcaccagg ctctctacct ccccatcaa gacagaatct acagaaatga 2350  
ccattaccac ccaaacaggt tctcctgggg ctacatcaag gggtaacctt 2400  
accttgaca cttcaacaac ttttatgtca gggaccatt caactgcac 2450  
tcaaggattt tcacactcac agatgaccgc tcttatgagt agaactcctg 2500  
gagaggtgcc atggctaagc catccctctg tggaagaagc cagctctgcc 2550  
tctttctcac tgtcttcacc tgtcatgacc tcctctctc cgtttcttc 2600  
cacattacca gacagcatcc actcttcttc gcttcctgtg acatcacttc 2650  
tcacctcagg gctgggaag accacagagc tgttgggcac aagctcagaa 2700  
cctgaaacca gttaccccc aaatttgagc agcacctcag ctgaaatact 2750  
ggccaccact gaagtcacta cagatacaga gaaactggag atgaccaatg 2800  
tggtaacctc aggtatata catgaatctc cttcctctgt cctagctgac 2850  
tcagtgacaa caaaggccac atcttcaatg ggtatcacct accccacagg 2900  
agatacaaat gttctcacat caacctctgc cttctctgac accagtagga 2950

221

93875

222

ttcaaacaaa gtcaaagctc tcactgactc ctgggttgat ggagaccagc 3000  
atctctgaag agaccagctc tgccacagaa aaaagcactg tcctttctag 3050  
tgtgcccact ggtgctacta ctgaggtctc caggacagaa gccatctctt 3100  
ctagcagaac atccatccca ggccctgctc aatccacaat gtcacagac 3150  
acctccatgg aaaccatcac tagaatttct acccccctca caaggaaaga 3200  
atcaacagac atggccatca cccccaaaac aggtccttct ggggctacct 3250  
cgcagggtac ctttaccttg gactcatcaa gcacagcctc ctggccagga 3300  
actcactcag ctacaactca gagatttcca cggtcagtgg tgacaactcc 3350  
tatgagcaga ggtcctgagg atgtgtcatg gccaaagccg ctgtctgtgg 3400  
aaaaaaaaacag ccctccatct tccctgggtat cttcatcttc agtaacctca 3450  
ccttcgccac tttattccac accatctggg agtagccact cctctcctgt 3500  
ccctgtcact tctcttttca cctctatcat gatgaaggcc acagacatgt 3550  
tggatgcaag tttggaacct gagaccactt cagctcccaa tatgaatatc 3600  
acctcagatg agagtctggc cgcttctaaa gccaccacgg agacagaggc 3650  
aattcacgtt tttgaaaata cagcagcgtc ccatgtggaa accaccagtg 3700  
ctacagagga actctattcc tcttccccag gcttctcaga gccaacaaaa 3750  
gtgatatctc cagtggtcac ctcttcctct ataagagaca acatggtttc 3800  
cacaacaatg cctggctcct ctggcattac aaggattgag atagagtcaa 3850  
tgtcatctct gaccctgga ctgagggaga ccagaacctc ccaggacatc 3900  
acctcatcca cagagacaag cactgtcctt tacaagatgc cctctggtgc 3950  
cactcctgag gtctccagga cagaagttat gccctctagc agaacatcca 4000  
ttcctggccc tgctcagtc acaatgtcac tagacatctc cgatgaagtt 4050  
gtcaccagge tgtctacctc tcccatcatg acagaatctg cagaaataac 4100  
catcaccacc caaacagggtt attctctggc tacatcccag gttacccttc 4150

223

93875

224

ccttgggcac ctcaatgacc tttttgtcag ggaccactc aactatgtct 4200  
caaggacttt cacactcaga gatgaccaat cttatgagca ggggtcctga 4250  
aagtctgtca tggacgagcc ctgcttttgt ggaaacaact agatcttcct 4300  
cttctctgac atcattacct ctacgacct cactttctcc tgtgtcctcc 4350  
acattactag acagtagccc ctctctcct cttcctgtga cttcacttat 4400  
cctcccaggc ctggtgaaga ctacagaagt gttggataca agctcagagc 4450  
ctaaaaccag ttcactctca aatttgagca gcacctcagt tgaaataccg 4500  
gccacctctg aaatcatgac agatacagag aaaattcatc cttcctcaaa 4550  
cacagcggtg gccaaagtga ggacctccag ttctgttcat gaatctcatt 4600  
cctctgtcct agctgactca gaaacaacca taaccatacc ttcaatgggt 4650  
atcacctcgg ctgtggagga taccactgtt ttcacatcaa atcctgcctt 4700  
ctctgagact aggaggattc cgacagagcc aacattctca ttgactcctg 4750  
gattcagggg gactagcacc tctgaagaga ccacctcaat cacagaaaca 4800  
agtgcagtcc tttttggagt gccactagt gctactactg aagtctccat 4850  
gacagaaata atgtcctcta atagaacaca catccctgac tctgatcagt 4900  
ccacgatgtc tccagacatc atcactgaag tgatcaccag gctctcttcc 4950  
tcattccatga tgtcagaatc aacacaaatg accatcacca ccaaaaaaag 5000  
ttctcctggg gctacagcac agagtactct taccttggcc acaacaacag 5050  
cccccttggc aaggaccac tcaactgttc ctctagatt tttacactca 5100  
gagatgacaa ctcttatgag taggagtcct gaaaatccat catggaagag 5150  
ctctcccttt gtggaaaaaa ctagctcttc atcttctctg ttgtccttac 5200  
ctgtcacgac ctacacctct gtttcttcca cattaccgca gagtatccct 5250  
tcctcctctt tttctgtgac ttactcctc acccaggca tgggtgaagac 5300  
tacagacaca agcacagaac ctggaaccag tttatctcca aatctgagtg 5350

gcacctcagt tgaaatactg gctgcctctg aagtcaccac agatacagag 5400  
aaaattcatc cttcttcaag catggcagtg accaatgtgg gaaccaccag 5450  
ttctggacat gaactatatt cctctgtttc aatccactcg gagccatcca 5500  
aggctacata cccagtgggt actccctctt ccatggctga aacctctatt 5550  
tccacatcaa tgcctgctaa ttttgagacc acaggatttg aggctgagcc 5600  
atthttctcat ttgacttctg gacttaggaa gaccaacatg tccctggaca 5650  
ccagctcagt cacaccaaca aatacacctt cttctcctgg gtccactcac 5700  
cttttacaga gttccaagac tgatttcacc tcttctgcaa aaacatcatc 5750  
cccagactgg cctccagcct cacagtatac tgaaattcca gtggacataa 5800  
tcacccccct taatgcttct ccatctatta cggagtccac tgggataacc 5850  
tccttcccag aatccaggtt tactatgtct gtaacagaaa gtactcatca 5900  
tctgagtaca gatttgctgc cttcagctga gactatttcc actggcacag 5950  
tgatgccttc tctatcagag gccatgactt catttgccac cactggagtt 6000  
ccacgagcca tctcaggttc aggtagtcca ttctctagga cagagtcagg 6050  
ccctggggat gctactctgt ccaccattgc agagagcctg ccttcatcca 6100  
ctctgtgcc attctcctct tcaaccttca ctaccactga ttcttcaacc 6150  
atcccagccc tccatgagat aacttcctct tcagctaccc catatagagt 6200  
ggacaccagt cttgggacag agagcagcac tactgaagga cgcttggtta 6250  
tggtcagtac tttggacact tcaagccaac caggcaggac atcttcatca 6300  
cccatthttgg ataccagaat gacagagagc gttgagctgg gaacagtga 6350  
aagtgttat caagttcctt cactctcaac acggttgaca agaactgatg 6400  
gcattatgga acacatcaca aaaataccca atgaagcagc acacagaggt 6450  
accataagac cagtcaaagg cctcagaca tccacttcgc ctgccagtcc 6500  
taaaggacta cacacaggag ggacaaaaag aatggagacc accaccacag 6550

ctctgaagac caccaccaca gctctgaaga ccacttccag agccaccttg 6600  
accaccagtg tctatactcc cactttggga aactgactc ccctcaatgc 6650  
atcaatgcaa atggccagca caatccccac agaaatgatg atcacaaccc 6700  
catatgtttt ccctgatgtt ccagaaacga catcctcatt ggctaccagc 6750  
ctgggagcag aaaccagcac agctcttccc aggacaaccc catctgtttt 6800  
caatagagaa tcagagacca cagcctcact ggtctctcgt tctggggcag 6850  
agagaagtcc ggttattcaa actctagatg tttcttctag tgagccagat 6900  
acaacagctt catgggttat ccctcctgca gagaccatcc caactgtttc 6950  
caagacaacc cccaattttt tccacagtga attagacact gtatcttcca 7000  
cagccaccag tcatggggca gacgtcagct cagccattcc aacaaatato 7050  
tcacctagtg aactagatgc actgaccca ctggtcacta tttcggggac 7100  
agatactagt acaacattcc caacactgac taagtcccca catgaaacag 7150  
agacaagaac cacatggctc actcatcctg cagagaccag ctcaactatt 7200  
cccagaacaa tccccattt ttctcatcat gaatcagatg ccacaccttc 7250  
aatagccacc agtcctgggg cagaaaccag ttcagctatt ccaattatga 7300  
ctgtctcacc tgggtgcagaa gatctgggtga cctcacaggt cactagttct 7350  
ggcacagaca gaaatatgac tattccaact ttgactcttt ctctgggtga 7400  
accaaagacc atagcctcat tagtcacca tctgaagca cagacaagtt 7450  
cggccattcc aacttcaact atctcgctg ctgtatcacg gttggtgacc 7500  
tcaatggtca ccagtttggc ggcaaagaca agtacaacta atcgagctct 7550  
gacaaaactcc cctggtgaa cagctacaac agtttcattg gtcacgcatt 7600  
ctgcacagac cagccaaca gttccctgga caacttccat ttttttccat 7650  
agtaaatacag acaccacacc ttcaatgacc accagtcatg gggcagaatc 7700  
cagttcagct gttccaactc caactgtttc aactgaggta ccaggagtag 7750



tgaccccttt ggtcaccagt tctagggcag tgatcagtac aactattcca 7800  
attctgactc tttctcctgg tgaaccagag accacacctt caatggccac 7850  
cagtcatggg gaagaagcca gttctgctat tccaactcca actgtttcac 7900  
ctggggtacc aggagtgggtg acctctctgg tcaactagttc tagggcagtg 7950  
actagtacaa ctattccaat tctgactttt tctcttgggtg aaccagagac 8000  
cacaccttca atggccacca gtcatgggac agaagctggc tcagctgttc 8050  
caactgtttt acctgaggta ccaggaatgg tgacctctct ggttgctagt 8100  
tctagggcag taaccagtac aactcttcca actctgactc tttctcctgg 8150  
tgaaccagag accacacctt caatggccac cagtcatggg gcagaagcca 8200  
gctcaactgt tccaactgtt tcacctgagg taccaggagt ggtgacctct 8250  
ctggtcacta gttctagtgg agtaaacagt acaagtattc caactctgat 8300  
tctttctcct ggtgaactag aaaccacacc ttcaatggcc accagtcatg 8350  
gggcagaagc cagctcagct gttccaactc caactgtttc acctggggta 8400  
tcaggagtgg tgacccctct ggtcactagt tccagggcag tgaccagtac 8450  
aactattcca attctaactc tttcttctag tgagccagag accacacctt 8500  
caatggccac cagtcatggg gtagaagcca gtcagctgt tctaactgtt 8550  
tcacctgagg taccaggaat ggtgaccttt ctggtcacta gttctagagc 8600  
agtaaccagt acaactattc caactctgac tatttcttct gatgaaccag 8650  
agaccacaac ttcatgggtc acccattctg aggcaaagat gatttcagcc\_\_700  
attccaactt taggtgtctc ccctactgta caagggtgg tgacttcact 8750  
ggtcactagt tctgggtcag agaccagtgc gttttcaaact ctaactgttg 8800  
cctcaagtca accagagacc atagactcat gggtcgctca tcttgggaca 8850  
gaagcaagtt ctgttggtcc aactttgact gtctccactg gtgagccgtt 8900  
tacaaatata tcattgggtc cccatcctgc agagagtagc tcaactcttc 8950

231

93875

232

ccaggacaac ctcaaggttt tcccacagtg aattagacac tatgccttct 9000  
acagtcacca gtctgagggc agaattccagc tcagccattt caacaactat 9050  
ttcacctggg ataccaggtg tgctgacatc actggtcact agctctggga 9100  
gagacatcag tgcaactttt ccaacagtg ctagtcccc acatgaatca 9150  
gaggcaacag cctcatgggt tactcatcct gcagtcacca gcacaacagt 9200  
tcccaggaca acccctaatt attctcatag tgaaccagac accacaccat 9250  
caatagccac cagtctggg gcagaagcca cttcagattt tccaacaata 9300  
actgtctcac ctgatgtacc agatatggta acctcacagg tcactagttc 9350  
tgggacagac accagtataa ctattccaac tctgactctt tcttctgggtg 9400  
agccagagac cacaacctca tttatcacct attctgagac acatacaagt 9450  
tcagccattc caactctccc tgtctccct gatgcatcaa agatgctgac 9500  
ctcactggtc atcagttctg ggacagacag cactacaact ttccaacac 9550  
tgacggagac cccatatgaa ccagagacaa cagccataca gctcattcat 9600  
cctgcagaga ccaacacaat ggttcccagg acaactocca agt-ttcca 9650  
tagtaagtca gacaccacac tcccagtagc catcaccagt cctgggccag 9700  
aagccagttc agctgtttca acgacaacta tctcacctga tatgtcagat 9750  
ctggtgacct cactgggtccc tagttctggg acagacacca gtacaacctt 9800  
cccaacattg agtgagacct catatgaacc agagactaca gccacgtggc 9850  
tcactcatcc tgcagaaacc agcacaacgg tttctgggac aattccaac 9900  
ttttcccata ggggatcaga cactgcaccc tcaatggtea ccagtcctgg 9950  
agtagacacg aggtcaggtg ttccaactac aaccatocca cccagtatac 10000  
caggggtagt gacctcacag gtcactagtt ctgcaacaga cactagtaca 10050  
gctattccaa ctttgactcc ttctcctggg gaaccagaga ccacagcctc 10100  
atcagctacc catcctggga cacagactgg cttcactggt ccaattcgga 10150

ctgttccttc tagtgagcca gatacaatgg cttcctgggt cactcatcct 10200  
ccacagacca gcacacctgt ttccagaaca acctccagtt tttcccatag 10250  
tagtccagat gccacacctg taatggccac cagtcctagg acagaagcca 10300  
gttcagctgt actgacaaca atctcacctg gtgcaccaga gatggtgact 10350  
tcacagatca ctagttcttg ggagcaacc agtacaactg ttccaacttt 10400  
gactcattct cctggatatg cagagaccac agccttattg agcacccatc 10450  
ccagaacaga gacaagtaaa acatttcctg cttcaactgt gtttcctcaa 10500  
gtatcagaga ccacagcctc actcaccatt agacctggtg cagagactag 10550  
cacagctctc ccaactcaga caacatcctc tctcttcacc ctacttgtaa 10600  
ctggaaccag cagagttgat ctaagtccaa ctgcttcacc tgggtgtttct 10650  
gcaaaaacag cccactttc caccatcca gggacagaaa ccagcacaat 10700  
gattccaact tcaactcttt cccttggttt actagagact acaggcttac 10750  
tggccaccag ctcttcagca gagaccagca cgagtactct aactctgact 10800  
gtttcccctg ctgtctctgg gctttccagt gcctctataa caactgataa 10850  
gccccaaact gtgacctctt ggaacacaga aacctacca tctgtaactt 10900  
cagttggacc cccagaattt tccaggactg tcacaggcac cactatgacc 10950  
ttgataccat cagagatgcc aacaccacct aaaaccagtc atggagaagg 11000  
agtgagtcca accactatct tgagaactac aatgggtgaa gccactaatt 11050  
tagctaccac aggttccagt cccactgtgg ccaagacaac aaccaccttc 11100  
aatacactgg ctggaagcct ctttactcct ctgaccacac ctgggatgtc 11150  
caccttggcc tctgagagtg tgacctcaag aacaagttat aaccatcggc 11200  
cctggatctc caccaccagc agttataacc gtcggtactg gaccctgcc 11250  
accagcactc cagtgaactc tacattctcc ccagggattt ccacatcctc 11300  
catccccagc tccacagcag ccacagtccc attcatggtg ccattcacco 11350

235

93875

236

tcaacttcac catcaccaac ctgcagtagc aggaggacat gcggcaccct 11400  
ggttcaagga agttcaacgc cacagagaga gaactgcagg gtctgctcaa 11450  
acccttggtc aggaatagca gtctggaata cctctattca ggctgcagac 11500  
tagcctcact caggccagag aaggatagct cagccacggc agtggatgcc 11550  
atctgcacac atcgccctga cctgaagac ctcggtactg acagagagcg 11600  
actgtactgg gagctgagca atctgacaaa tggcatccag gagctgggcc 11650  
cttacaccct ggaccggaac agtctctatg tcaatggttt caccatcga 11700  
agctctatgc ccaccaccag cactcctggg acctccacag tggatgtggg 11750  
aacctcaggg actccatcct ccagccccag cccacgact gctggccctc 11800  
tcctgatgcc gttcacccctc aacttcacca tcaccaacct gcagtagcag 11850  
gaggacatgc gtgcactgg ctccaggaag ttcaacacca tggagagtgt 11900  
cctgcagggt ctgctcaagc catgtttcaa gaacaccagt gttggccctt 11950  
tgtactctgg ctgcagattg accttgetca ggcccgagaa agatggggca 12000  
gccactggag tggatgccat ctgcacccac cgccttgacc ccaaaagccc 12050  
tggactcaac agggagcagc tgtactggga gctaagcaaa ctgaccaatg 12100  
acattgaaga gctgggcccc tacaccctgg acaggaacag tctctatgtc 12150  
aatggtttca cccatcagag ctctgtgtcc accaccagca ctctggggac 12200  
ctccacagtg gatctcagaa cctcagggac tccatcctcc ctctccagcc 12250  
ccacaattat ggctgctggc cctctcctgg taccattcac cctcaacttc 12300  
accatcacca acctgcagta tggggaggac atgggtcacc ctggtccag 12350  
gaagttcaac accacagaga gggtcctgca gggctctgctt ggtcccatat 12400  
tcaagaacac cagtgttggc cctctgtact ctggctgcag actgacctct 12450  
ctcagggtccg agaaggatgg agcagccact ggagtggatg ccatctgcat 12500  
ccatcatctt gacccccaaa gccctggact caacagagag cggctgtact 12550

237

93875

238

gggagctgag ccaactgacc aatggcatca aagagctggg cccctacacc 12600  
ctggacagga acagtctcta tgtcaatggg ttcacccatc ggacctctgt 12650  
gcccaccacc agcactcctg ggacctccac agtggacctt ggaacctcag 12700  
ggactccatt ctccctccca agccccgcaa ctgctggccc tctcctggtg 12750  
ctgttcaccc tcaacttcac catcaccaac ctgaagtatg aggaggacat 12800  
gcatcgccct ggctccagga agttcaacac cactgagagg gtctctgcaga 12850  
ccctggttgg tcttatgttc aagaacacca gtgttggcct tctgtactct 12900  
ggctgcagac tgaccttgct caggtcagag aaggatggag cagccactgg 12950  
agtggatgcc atctgcaccc accgtcttga ccccaaaagc cctggagtgg 13000  
acagggagca gctatactgg gagctgagcc aactgaccaa tggcatcaaa 13050  
gagctgggcc cctacaccct ggacaggaac agtctctatg tcaatggttt 13100  
caccatttg atccctgtgc ccaccagcag caccctggg acctccacag 13150  
tggaaccttg gtcagggact ccctcctccc tccccagccc cacaagtgt 13200  
actgctggcc ctctcctggg gccgttcacc ctcaacttca ccatacacia 13250  
cctgaagtac gaggaggaca tgcatgccc tggctccagg aagttcaaca 13300  
ccacagagag agtctgcag agtctgcttg gtcccatgtt caagaacacc 13350  
agtgttggcc ctctgtactc tggctgcaga ctgaccttgc tcagggtccga 13400  
gaaggatgga gcagccactg gagtggatgc catctgcacc caccgtcttg 13450  
accccaaaag ccctggagtg gacagggagc agctatactg ggagctgagc 13500  
cagctgacca atggcatcaa agagctgggt ccctacaccc tggacagaaa 13550  
cagtctctat gtcaatggtt tcacccatca gacctctgcg cccaacacca 13600  
gcactcctgg gacctccaca gtggaccttg ggacctcagg gactccatcc 13650  
tcctcccca gccctacatc tgctggccct ctctggtgc cattcacct 13700  
caacttcacc atcaccaacc tgcagtacga ggaggacatg catcacccag 13750

gctccaggaa gttcaacacc acggagcggg tctgcaggg tctgcttgg 13800  
cccatgttca agaacaccag tgcggcctt ctgtactctg gctgcagact 13850  
gaccttgctc aggcctgaga agaatggggc agccactgga atggatgcca 13900  
tctgcagcca ccgtcttgac cccaaaagcc ctggactcaa cagagagcag 13950  
ctgtactggg agctgagcca gctgacccat ggcatcaaag agctggggcc 14000  
ctacaccctg gacaggaaca gtctctatgt caatggttcc acccatcgga 14050  
gctctgtggc ccccaccagc actcctggga cctccacagt ggaccttggg 14100  
acctcaggga ctccatcctc cctccccagc cccacaacag ctgttcctct 14150  
cctggtgccg ttcacctca actttaccat caccaatctg cagtatgggg 14200  
aggacatgcg tcaacctggc tccaggaagt tcaacaccac agagagggtc 14250  
ctgcagggtc tgcttggtcc cttgttcaag aactccagtg tcggccctct 14300  
gtactctggc tgcagactga tctctctcag gtctgagaag gatggggcag 14350  
ccactggagt ggatgccatc tgcaccacc accttaacc tcaaagccct 14400  
ggactggaca gggagcagct gtactggcag ctgagccaga tgaccaatgg 14450  
catcaaagag ctggggccct acacctgga ccggaacagt ctctacgtca 14500  
atggtttcac ccatcggagc tctgggctca ccaccagcac tcttggact 14550  
tccacagttg accttggaac ctgagggact ccatccccg tcccagccc 14600  
cacaactgct ggccctctcc tggtgccatt caccctaaac ttcaccatca 14650  
ccaacctgca gtatgaggag gacatgcac gccctggatc taggaagtcc 14700  
aacgccacag agagggctct gcagggtctg cttagtccca tattcaagaa 14750  
ctccagtgtt ggccctctgt actctggctg cagactgacc tctctcaggc 14800  
ccgagaagga tggggcagca actggaatgg atgctgtctg cctctaccac 14850  
cctaattcca aaagacctgg gctggacaga gagcagctgt actgggagct 14900  
aagccagctg acccacaaca tcactgagct gggccctac agcctggaca 14950

gggacagtct ctatgtcaat ggtttcaccc atcagaactc tgtgcccacc 15000  
accagtactc ctgggacctc cacagtgtac tgggcaacca ctgggactcc 15050  
atcctccttc cccggccaca cagagcctgg ccctctcctg ataccattca 15100  
ctttcaactt taccatcacc aacctgcatt atgaggaaaa catgcaacac 15150  
cctggttcca ggaagttcaa caccacggag agggttctgc agggctctgct 15200  
caagcccttg ttcaagaaca ccagtgttgg ccctctgtac tctggctgca 15250  
gactgacctt gctcagacct gagaagcagg aggcagccac tggagtggac 15300  
accatctgta cccaccgct tgatcccatc ggacctggac tggacagaga 15350  
gcggctatac tgggagctga gccagctgac caacagcatc acagagctgg 15400  
gacctacac cctggatagg gacagtctct atgtcaatgg cttcaaccct 15450  
tggagctctg tgccaaccac cagcactcct gggacctcca cagtgcacct 15500  
ggcaacctct gggactccat cctccctgcc tggccacaca gccctgtcc 15550  
ctctcttgat accattcacc ctcaacttta ccatcaccaa cctgcattat 15600  
gaagaaaaca tgcaacaccc tggttccagg aagttcaaca ccacggagag 15650  
ggttctgcag ggtctgctca agcccttggt caagagcacc agcgttggcc 15700  
ctctgtactc tggctgcaga ctgaccttgc tcagacctga gaaacatggg 15750  
gcagccactg gagtggacgc catctgcacc ctccgccttg atccactgg 15800  
tcctggactg gacagagagc ggctatactg ggagctgagc cagctgacca 15850  
acagcgttac agagctgggc ccctacaccc tggacaggga cagtctctat 15900  
gtcaatggct tcacccatcg gagctctgtg ccaaccacca gtattcctgg 15950  
gacctctgca gtgcacctgg aaacctctgg gactccagcc tccctccctg 16000  
gccacacagc ccctggccct ctctgggtgc cattcacctt caacttcaact 16050  
atcaccaacc tgcagtatga ggaggacatg cgtcaccttg gttccaggaa 16100  
gttcaacacc acggagagag tcctgcaggg tctgtctcaag cccttgttca 16150

agagcaccag tgttggccct ctgtactctg gctgcagact gaccttgctc 16200  
aggcctgaaa aacgtggggc agccaccggc gtggacacca tctgcactca 16250  
ccgccttgac cctctaaacc ctggactgga cagagagcag ctatactggg 16300  
agctgagcaa actgaccogt ggcatcatcg agctggggcc ctacctctg 16350  
gacagaggca gtctctatgt caatggtttc acccatcgga actttgtgcc 16400  
catcaccagc actcctggga cctccacagt acacctagga acctctgaaa 16450  
ctccatcctc cctacctaga cccatagtgc ctggccctct cctggtgcca 16500  
ttcacctca acttcacat caccaacttg cagtatgagg aggccatgcg 16550  
acacctggc tccaggaagt tcaataccac ggagagggtc ctacagggtc 16600  
tgctcaggcc cttgttcaag aataccagta tcggccctct gtactccagc 16650  
tgcagactga ccttgctcag gccagagaag gacaaggcag ccaccagagt 16700  
ggatgccatc tgtaccacc accctgacc tcaaagccct ggactgaaca 16750  
gagagcagct gtactgggag ctgagccagc tgaccacgg catcactgag 16800  
ctggggccct acacctgga cagggacagt ctctatgtcg atggtttcac 16850  
tcattggagc ccataccaa ccaccagcac tcctgggacc tccatagtga 16900  
acctgggaac ctctgggatc ccaccttccc tcctgaaac tacagccacc 16950  
ggccctctcc tggtgccatt cactctaac ttcacatca ctaacctaca 17000  
gtatgaggag aacatgggtc accctggctc caggaagttc aacatcacgg 17050  
agagtgttct gcagggtctg ctcaagccct tgttcaagag caccagtgtt 17100  
ggccctctgt attctggctg cagactgacc ttgctcaggc ctgagaagga 17150  
cggagtagcc accagagtgg acgcatctg caccacccgc cctgaccca 17200  
aatccctgg gctagacaga cagcagctat actgggagct gagccagctg 17250  
accacagca tcactgagct gggaccctac accctggata gggacagtct 17300  
ctatgtcaat ggtttcaccc agcggagctc tgtgcccacc accagcactc 17350



245

93875

246

ctgggacttt cacagtacag ccggaacct ctgagactcc atcatccctc 17400  
cctggcccca cagccactgg ccctgtctg ctgccattca cctcaattt 17450  
taccatcatt aacctgcagt atgaggagga catgcatgc cctggctcca 17500  
ggaagttcaa caccacggag agggtccttc agggctctgt tatgcccttg 17550  
ttcaagaaca ccagtgtcag ctctctgtac tctggttgca gactgacctt 17600  
gctcaggcct gagaaggatg gggcagccac cagagtggat gctgtctgca 17650  
cccatcgtcc tgaccccaaa agccctggac tggacagaga ggggctgtac 17700  
tggaagctga gccagctgac ccacggcatc actgagctgg gccctacac 17750  
cctggacagg cacagtctct atgtcaatgg tttcacccat cagagctcta 17800  
tgacgaccac cagaactcct gatacctcca caatgcacct ggcaacctcg 17850  
agaactccag cctccctgtc tggacctacg accgccagcc ctctcctgg 17900  
gctattcaca attaacttca ccatcactaa cctgcggtat gaggagaaca 17950  
tgcatcacc tggtcttaga aagtttaaca ccacggagag agtccttcag 18000  
ggctctgtca ggctgtgtt caagaacacc agtgttgcc ctctgtactc 18050  
tggtctcaga ctgacctgc tcaggcccaa gaaggatggg gcagccacca 18100  
aagtggatgc catctgcacc taccgccctg atcccaaaag cctgggactg 18150  
gacagagagc agctatactg ggagctgagc cagctaacc acagcatcac 18200  
tgagctgggc ccctacacc tggacagga cagtctctat gtcaatgggt 18250  
tcacacagcg gagctctgtg cccaccacta gcattcctgg gacccccaca 18300  
gtggacctgg gaacatctgg gactccagtt tctaaacctg gtccctcggc 18350  
tgccagccct ctctgggtgc tattcaactc caacttcacc atcaccaacc 18400  
tgcggtatga ggagaacatg cagcacctg gctccaggaa gttcaacacc 18450  
acggagaggg tccttcaggg cctgtctcagg tccctgttca agagcaccag 18500

tgttggccct ctgtactctg gctgcagact gactttgctc aggcctgaaa 18550  
aggatgggac agccactgga gtggatgcca tctgcacca ccaccctgac 18600  
cccaaaagcc ctaggctgga cagagagcag ctgtattggg agctgagcca 18650  
gctgaccac aatatcactg agctgggccc ctatgccttg gacaacgaca 18700  
gcctctttgt caatggtttc actcatcgga gctctgtgtc caccaccagc 18750  
actcctggga cccccacagt gtatctggga gcatctaaga ctccagcctc 18800  
gatatttggc ccttcagctg ccagccatct cctgatacta ttcaccctca 18850  
acttcacat cactaacctg cggtatgagg agaacatgtg gcctggctcc 18900  
aggaagttca aactacaga gagggtcctt cagggcctgc taaggccctt 18950  
gttcaagaac accagtgttg gccctctgta ctctggctgc aggctgacct 19000  
tgctcaggcc agagaaagat ggggaagcca ccggagtgga tgccatctgc 19050  
accaccgcc ctgacccac aggccttggg ctggacagag agcagctgta 19100  
tttgagctg agccagctga cccacagcat cactgagctg ggcccctaca 19150  
cactggacag ggacagtctc tatgtcaatg gtttcacca tcggagctct 19200  
gtaccacca ccagcaccgg ggtggtcagc gaggagccat tcacactgaa 19250  
cttcaccatc aacaacctgc gctacatggc ggacatgggc caaccggct 19300  
ccctcaagtt caacatcaca gacaacgtca tgcagcacct gctcagtcct 19350  
ttgttccaga ggagcagcct ggggtgcacg tacacaggct gcagggtcat 19400  
cgcactaagg tctgtgaaga acggtgtga gacacgggtg gacctcctct 19450  
gcacctacct gcagcccctc agcggcccag gtctgcctat caagcaggtg 19500  
ttccatgagc tgagccagca gaccatggc atcaccggc tgggcccta 19550  
ctctctggac aaagacagcc tctacctaa cggttacaat gaacctggtc 19600  
cagatgagcc tctacaact cccaagccag ccaccacatt cctgcctcct 19650  
ctgtcagaag ccacaacagc catggggtac cacctgaaga ccctcact 19700

caacttcacc atctccaatc tccagtattc accagatatg ggcaagggct 19750  
cagctacatt caactccacc gaggggggtcc ttcagcacct gctcagaccc 19800  
ttgttccaga agagcagcat gggcccccctc tacttgggtt gccaaactgat 19850  
ctccctcagg cctgagaagg atggggcagc cactgggtgtg gacaccacct 19900  
gcacctacca ccctgaccct gtgggccccg ggctggacat acagcagctt 19950  
tactgggagc tgagtcagct gacccatggg gtcacccaac tgggcttcta 20000  
tgtcctggac agggatagcc tcttcatcaa tggctatgca cccagaatt 20050  
tatcaatccg gggcgagtac cagataaatt tccacattgt caactggaac 20100  
ctcagtaatc cagaccccac atcctcagag tacatcacc cgtctgagga 20150  
catccaggac aaggtcacca cactctacaa aggcagtcaa ctacatgaca 20200  
cattccgctt ctgcctggtc accaacttga cgatggactc cgtgttggtc 20250  
actgtcaagg cattgttctc ctccaatttg gaccccagcc tgggtggagca 20300  
agtctttcta gataagacc tgaatgcctc attccattgg ctgggctcca 20350  
octaccagtt ggtggacatc catgtgacag aaatggagtc atcagtttat 20400  
caaccaacaa gcagctccag caccagcac ttctacctga atttcacat 20450  
caccaaccta ccatattccc aggacaaagc ccagccaggc accaccaatt 20500  
accagaggaa caaaaggaat attgaggatg cgctcaacca actcttccga 20550  
aacagcagca tcaagagtta tttttctgac tgtcaagttt caacattcag 20600  
gtctgtcccc aacaggcacc acaccgggt ggactccctg tgtaacttct 20650  
cgccactggc tcggagagta gacagagttg ccatctatga ggaatttctg 20700  
cggatgaccc ggaatggtac ccagctgcag aacttcaccc tggacaggag 20750  
cagtgtcctt gtggatgggt attctcccaa cagaaatgag cccttaactg 20800  
ggaattctga cttcccttc tgggctgtca tcctcatcgg cttggcagga 20850  
ctcctgggac tcatcacatg cctgatctgc ggtgtcctgg tgaccaccg 20900

251

93875

252

ccggcggaag aaggaaggag aatacaacgt ccagcaacag tgcccaggct 20950  
actaccagtc acacctagac ctggaggatc tgcaatgact ggaacttgcc 21000  
ggtgcctggg gtgcctttcc cccagccagg gtccaaagaa gcttggtctgg 21050  
ggcagaaata aaccatattg gtcggaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 21100  
aaaaaaaaaa aa 21112

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 6995

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

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

253

93875

254

Ser Met Ser Gly	Pro Asp Gln Phe Thr	Ile Ser Pro Asp Ile Ser
170		175 180
Thr Glu Ala Ile	Thr Arg Leu Ser Thr	Ser Pro Ile Met Thr Glu
185		190 195
Ser Ala Glu Ser	Ala Ile Thr Ile Glu Thr	Gly Ser Pro Gly Ala
200		205 210
Thr Ser Glu Gly	Thr Leu Thr Leu Asp Thr	Ser Thr Thr Thr Phe
215		220 225
Trp Ser Gly Thr	His Ser Thr Ala Ser	Pro Gly Phe Ser His Ser
230		235 240
Glu Met Thr Thr	Leu Met Ser Arg Thr	Pro Gly Asp Val Pro Trp
245		250 255
Pro Ser Leu Pro	Ser Val Glu Glu Ala Ser	Ser Val Ser Ser Ser
260		265 270
Leu Ser Ser Pro	Ala Met Thr Ser Thr	Ser Phe Phe Ser Thr Leu
275		280 285
Pro Glu Ser Ile	Ser Ser Ser Pro His	Pro Val Thr Ala Leu Leu
290		295 300
Thr Leu Gly Pro	Val Lys Thr Thr Asp	Met Leu Arg Thr Ser Ser
305		310 315
Glu Pro Glu Thr	Ser Ser Pro Pro Asn	Leu Ser Ser Thr Ser Ala
320		325 330
Glu Ile Leu Ala	Thr Ser Glu Val Thr	Lys Asp Arg Glu Lys Ile
335		340 345
His Pro Ser Ser	Asn Thr Pro Val Val	Asn Val Gly Thr Val Ile
350		355 360
Tyr Lys His Leu	Ser Pro Ser Ser Val	Leu Ala Asp Leu Val Thr
365		370 375
Thr Lys Pro Thr	Ser Pro Met Ala Thr	Thr Ser Thr Leu Gly Asn
380		385 390

255

93875

256

Thr Ser Val Ser	Thr Ser Thr	Pro Ala Phe	Pro Glu Thr	Met Met
	395		400	405
Thr Gln Pro Thr	Ser Ser Leu	Thr Ser Gly	Leu Arg Glu	Ile Ser
	410		415	420
Thr Ser Gln Glu	Thr Ser Ser	Ala Thr Glu	Arg Ser Ala	Ser Leu
	425		430	435
Ser Gly Met Pro	Thr Gly Ala	Thr Thr Lys	Val Ser Arg	Thr Glu
	440		445	450
Ala Leu Ser Leu	Gly Arg Thr	Ser Thr Pro	Gly Pro Ala	Gln Ser
	455		460	465
Thr Ile Ser Pro	Glu Ile Ser	Thr Glu Thr	Ile Thr Arg	Ile Ser
	470		475	480
Thr Pro Leu Thr	Thr Thr Gly	Ser Ala Glu	Met Thr Ile	Thr Pro
	485		490	495
Lys Thr Gly His	Ser Gly Ala	Ser Ser Gln	Gly Thr Phe	Thr Leu
	500		505	510
Asp Thr Ser Ser	Arg Ala Ser	Trp Pro Gly	Thr His Ser	Ala Ala
	515		520	525
Thr His Arg Ser	Pro His Ser	Gly Met Thr	Thr Pro Met	Ser Arg
	530		535	540
Gly Pro Glu Asp	Val Ser Trp	Pro Ser Arg	Pro Ser Val	Glu Lys
	545		550	555
Thr Ser Pro Pro	Ser Ser Leu	Val Ser Leu	Ser Ala Val	Thr Ser
	560		565	570
Pro Ser Pro Leu	Tyr Ser Thr	Pro Ser Glu	Ser Ser His	Ser Ser
	575		580	585
Pro Leu Arg Val	Thr Ser Leu	Phe Thr Pro	Val Met Met	Lys Thr
	590		595	600
Thr Asp Met Leu	Asp Thr Ser	Leu Glu Pro	Val Thr Thr	Ser Pro
	605		610	615
Pro Ser Met Asn	Ile Thr Ser	Asp Glu Ser	Leu Ala Thr	Ser Lys
	620		625	630

257

93875

258

Ala Thr Met Glu Thr Glu Ala Ile Gln Leu Ser Glu Asn Thr Ala		
635	640	645
Val Thr Gln Met Gly Thr Ile Ser Ala Arg Gln Glu Phe Tyr Ser		
650	655	660
Ser Tyr Pro Gly Leu Pro Glu Pro Ser Lys Val Thr Ser Pro Val		
665	670	675
Val Thr Ser Ser Thr Ile Lys Asp Ile Val Ser Thr Thr Ile Pro		
680	685	690
Ala Ser Ser Glu Ile Thr Arg Ile Glu Met Glu Ser Thr Ser Thr		
695	700	705
Leu Thr Pro Thr Pro Arg Glu Thr Ser Thr Ser Gln Glu Ile His		
710	715	720
Ser Ala Thr Lys Pro Ser Thr Val Pro Tyr Lys Ala Leu Thr Ser		
725	730	735
Ala Thr Ile Glu Asp Ser Met Thr Gln Val Met Ser Ser Ser Arg		
740	745	750
Gly Pro Ser Pro Asp Gln Ser Thr Met Ser Gln Asp Ile Ser Thr		
755	760	765
Glu Val Ile Thr Arg Leu Ser Thr Ser Pro Ile Lys Thr Glu Ser		
770	775	780
Thr Glu Met Thr Ile Thr Thr Gln Thr Gly Ser Pro Gly Ala Thr		
785	790	795
Ser Arg Gly Thr Leu Thr Leu Asp Thr Ser Thr Thr Phe Met Ser		
800	805	810
Gly Thr His Ser Thr Ala Ser Gln Gly Phe Ser His Ser Gln Met		
815	820	825
Thr Ala Leu Met Ser Arg Thr Pro Gly Glu Val Pro Trp Leu Ser		
830	835	840
His Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Ser		
845	850	855

259

93875

260

Ser Pro Val Met Thr Ser Ser Ser Pro Val Ser Ser Thr Leu Pro	860	865	870
Asp Ser Ile His Ser Ser Ser Leu Pro Val Thr Ser Leu Leu Thr	875	880	885
Ser Gly Leu Val Lys Thr Thr Glu Leu Leu Gly Thr Ser Ser Glu	890	895	900
Pro Glu Thr Ser Ser Pro Pro Asn Leu Ser Ser Thr Ser Ala Glu	905	910	915
Ile Leu Ala Thr Thr Glu Val Thr Thr Asp Thr Glu Lys Leu Glu	920	925	930
Met Thr Asn Val Val Thr Ser Gly Tyr Thr His Glu Ser Pro Ser	935	940	945
Ser Val Leu Ala Asp Ser Val Thr Thr Lys Ala Thr Ser Ser Met	950	955	960
Gly Ile Thr Tyr Pro Thr Gly Asp Thr Asn Val Leu Thr Ser Thr	965	970	975
Pro Ala Phe Ser Asp Thr Ser Arg Ile Gln Thr Lys Ser Lys Leu	980	985	990
Ser Leu Thr Pro Gly Leu Met Glu Thr Ser Ile Ser Glu Glu Thr	995	1000	1005
Ser Ser Ala Thr Glu Lys Ser Thr Val Leu Ser Ser Val Pro Thr	1010	1015	1020
Gly Ala Thr Thr Glu Val Ser Arg Thr Glu Ala Ile Ser Ser Ser	1025	1030	1035
Arg Thr Ser Ile Pro Gly Pro Ala Gln Ser Thr Met Ser Ser Asp	1040	1045	1050
Thr Ser Met Glu Thr Ile Thr Arg Ile Ser Thr Pro Leu Thr Arg	1055	1060	1065
Lys Glu Ser Thr Asp Met Ala Ile Thr Pro Lys Thr Gly Pro Ser	1070	1075	1080
Gly Ala Thr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Leu Asp Ser Ser Ser Thr	1085	1090	1095



261

93875

262

Ala Ser Trp Pro Gly Thr His Ser Ala Thr Thr Gln Arg Phe Pro	1100	1105	1110
Arg Ser Val Val Thr Thr Pro Met Ser Arg Gly Pro Glu Asp Val	1115	1120	1125
Ser Trp Pro Ser Pro Leu Ser Val Glu Lys Asn Ser Pro Pro Ser	1130	1135	1140
Ser Leu Val Ser Ser Ser Ser Val Thr Ser Pro Ser Pro Leu Tyr	1145	1150	1155
Ser Thr Pro Ser Gly Ser Ser His Ser Ser Pro Val Pro Val Thr	1160	1165	1170
Ser Leu Phe Thr Ser Ile Met Met Lys Ala Thr Asp Met Leu Asp	1175	1180	1185
Ala Ser Leu Glu Pro Glu Thr Thr Ser Ala Pro Asn Met Asn Ile	1190	1195	1200
Thr Ser Asp Glu Ser Leu Ala Ala Ser Lys Ala Thr Thr Glu Thr	1205	1210	1215
Glu Ala Ile His Val Phe Glu Asn Thr Ala Ala Ser His Val Glu	1220	1225	1230
Thr Thr Ser Ala Thr Glu Glu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro Gly Phe	1235	1240	1245
Ser Glu Pro Thr Lys Val Ile Ser Pro Val Val Thr Ser Ser Ser	1250	1255	1260
Ile Arg Asp Asn Met Val Ser Thr Thr Met Pro Gly Ser Ser Gly	1265	1270	1275
Ile Thr Arg Ile Glu Ile Glu Ser Met Ser Ser Leu Thr Pro Gly	1280	1285	1290
Leu Arg Glu Thr Arg Thr Ser Gln Asp Ile Thr Ser Ser Thr Glu	1295	1300	1305
Thr Ser Thr Val Leu Tyr Lys Met Pro Ser Gly Ala Thr Pro Glu	1310	1315	1320

263

93875

264

Val Ser Arg Thr Glu Val Met Pro Ser Ser Arg Thr Ser Ile Pro		
1325	1330	1335
Gly Pro Ala Gln Ser Thr Met Ser Leu Asp Ile Ser Asp Glu Val		
1340	1345	1350
Val Thr Arg Leu Ser Thr Ser Pro Ile Met Thr Glu Ser Ala Glu		
1355	1360	1365
Ile Thr Ile Thr Thr Gln Thr Gly Tyr Ser Leu Ala Thr Ser Gln		
1370	1375	1380
Val Thr Leu Pro Leu Gly Thr Ser Met Thr Phe Leu Ser Gly Thr		
1385	1390	1395
His Ser Thr Met Ser Gln Gly Leu Ser His Ser Glu Met Thr Asn		
1400	1405	1410
Leu Met Ser Arg Gly Pro Glu Ser Leu Ser Trp Thr Ser Pro Arg		
1415	1420	1425
Phe Val Glu Thr Thr Arg Ser Ser Ser Ser Leu Thr Ser Leu Pro		
1430	1435	1440
Leu Thr Thr Ser Leu Ser Pro Val Ser Ser Thr Leu Leu Asp Ser		
1445	1450	1455
Ser Pro Ser Ser Pro Leu Pro Val Thr Ser Leu Ile Leu Pro Gly		
1460	1465	1470
Leu Val Lys Thr Thr Glu Val Leu Asp Thr Ser Ser Glu Pro Lys		
1475	1480	1485
Thr Ser Ser Ser Pro Asn Leu Ser Ser Thr Ser Val Glu Ile Pro		
1490	1495	1500
Ala Thr Ser Glu Ile Met Thr Asp Thr Glu Lys Ile His Pro Ser		
1505	1510	1515
Ser Asn Thr Ala Val Ala Lys Val Arg Thr Ser Ser Ser Val His		
1520	1525	1530
Glu Ser His Ser Ser Val Leu Ala Asp Ser Glu Thr Thr Ile Thr		
1535	1540	1545
Ile Pro Ser Met Gly Ile Thr Ser Ala Val Glu Asp Thr Thr Val		
1550	1555	1560

265

93875

266

Phe Thr Ser Asn Pro Ala Phe Ser Glu Thr Arg Arg Ile Pro Thr		
1565	1570	1575
Glu Pro Thr Phe Ser Leu Thr Pro Gly Phe Arg Glu Thr Ser Thr		
1580	1585	1590
Ser Glu Glu Thr Thr Ser Ile Thr Glu Thr Ser Ala Val Leu Phe		
1595	1600	1605
Gly Val Pro Thr Ser Ala Thr Thr Glu Val Ser Met Thr Glu Ile		
1610	1615	1620
Met Ser Ser Asn Arg Thr His Ile Pro Asp Ser Asp Gln Ser Thr		
1625	1630	1635
Met Ser Pro Asp Ile Ile Thr Glu Val Ile Thr Arg Leu Ser Ser		
1640	1645	1650
Ser Ser Met Met Ser Glu Ser Thr Gln Met Thr Ile Thr Thr Gln		
1655	1660	1665
Lys Ser Ser Pro Gly Ala Thr Ala Gln Ser Thr Leu Thr Leu Ala		
1670	1675	1680
Thr Thr Thr Ala Pro Leu Ala Arg Thr His Ser Thr Val Pro Pro		
1685	1690	1695
Arg Phe Leu His Ser Glu Met Thr Thr Leu Met Ser Arg Ser Pro		
1700	1705	1710
Glu Asn Pro Ser Trp Lys Ser Ser Pro Phe Val Glu Lys Thr Ser		
1715	1720	1725
Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser Leu Pro Val Thr Thr Ser Pro Ser		
1730	1735	1740
Val Ser Ser Thr Leu Pro Gln Ser Ile Pro Ser Ser Ser Phe Ser		
1745	1750	1755
Val Thr Ser Leu Leu Thr Pro Gly Met Val Lys Thr Thr Asp Thr		
1760	1765	1770
Ser Thr Glu Pro Gly Thr Ser Leu Ser Pro Asn Leu Ser Gly Thr		
1775	1780	1785

267

93875

268

Ser Val Glu Ile Leu Ala Ala Ser Glu Val Thr Thr Asp Thr Glu	1790	1795	1800
Lys Ile His Pro Ser Ser Ser Met Ala Val Thr Asn Val Gly Thr	1805	1810	1815
Thr Ser Ser Gly His Glu Leu Tyr Ser Ser Val Ser Ile His Ser	1820	1825	1830
Glu Pro Ser Lys Ala Thr Tyr Pro Val Gly Thr Pro Ser Ser Met	1835	1840	1845
Ala Glu Thr Ser Ile Ser Thr Ser Met Pro Ala Asn Phe Glu Thr	1850	1855	1860
Thr Gly Phe Glu Ala Glu Pro Phe Ser His Leu Thr Ser Gly Leu	1865	1870	1875
Arg Lys Thr Asn Met Ser Leu Asp Thr Ser Ser Val Thr Pro Thr	1880	1885	1890
Asn Thr Pro Ser Ser Pro Gly Ser Thr His Leu Leu Gln Ser Ser	1895	1900	1905
Lys Thr Asp Phe Thr Ser Ser Ala Lys Thr Ser Ser Pro Asp Trp	1910	1915	1920
Pro Pro Ala Ser Gln Tyr Thr Glu Ile Pro Val Asp Ile Ile Thr	1925	1930	1935
Pro Phe Asn Ala Ser Pro Ser Ile Thr Glu Ser Thr Gly Ile Thr	1940	1945	1950
Ser Phe Pro Glu Ser Arg Phe Thr Met Ser Val Thr Glu Ser Thr	1955	1960	1965
His His Leu Ser Thr Asp Leu Leu Pro Ser Ala Glu Thr Ile Ser	1970	1975	1980
Thr Gly Thr Val Met Pro Ser Leu Ser Glu Ala Met Thr Ser Phe	1985	1990	1995
Ala Thr Thr Gly Val Pro Arg Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Pro	2000	2005	2010
Phe Ser Arg Thr Glu Ser Gly Pro Gly Asp Ala Thr Leu Ser Thr	2015	2020	2025

269

93875

270

Ile Ala Glu Ser Leu Pro Ser Ser Thr Pro Val Pro Phe Ser Ser		
2030	2035	2040
Ser Thr Phe Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Ile Pro Ala Leu His		
2045	2050	2055
Glu Ile Thr Ser Ser Ser Ala Thr Pro Tyr Arg Val Asp Thr Ser		
2060	2065	2070
Leu Gly Thr Glu Ser Ser Thr Thr Glu Gly Arg Leu Val Met Val		
2075	2080	2085
Ser Thr Leu Asp Thr Ser Ser Gln Pro Gly Arg Thr Ser Ser Ser		
2090	2095	2100
Pro Ile Leu Asp Thr Arg Met Thr Glu Ser Val Glu Leu Gly Thr		
2105	2110	2115
Val Thr Ser Ala Tyr Gln Val Pro Ser Leu Ser Thr Arg Leu Thr		
2120	2125	2130
Arg Thr Asp Gly Ile Met Glu His Ile Thr Lys Ile Pro Asn Glu		
2135	2140	2145
Ala Ala His Arg Gly Thr Ile Arg Pro Val Lys Gly Pro Gln Thr		
2150	2155	2160
Ser Thr Ser Pro Ala Ser Pro Lys Gly Leu His Thr Gly Gly Thr		
2165	2170	2175
Lys Arg Met Glu Thr Thr Thr Thr Ala Leu Lys Thr Thr Thr Thr		
2180	2185	2190
Ala Leu Lys Thr Thr Ser Arg Ala Thr Leu Thr Thr Ser Val Tyr		
2195	2200	2205
Thr Pro Thr Leu Gly Thr Leu Thr Pro Leu Asn Ala Ser Met Gln		
2210	2215	2220
Met Ala Ser Thr Ile Pro Thr Glu Met Met Ile Thr Thr Pro Tyr		
2225	2230	2235
Val Phe Pro Asp Val Pro Glu Thr Thr Ser Ser Leu Ala Thr Ser		
2240	2245	2250

271

93875

272

Leu Gly Ala Glu Thr Ser Thr Ala Leu Pro Arg Thr Thr Pro Ser		
2255	2260	2265
Val Phe Asn Arg Glu Ser Glu Thr Thr Ala Ser Leu Val Ser Arg		
2270	2275	2280
Ser Gly Ala Glu Arg Ser Pro Val Ile Gln Thr Leu Asp Val Ser		
2285	2290	2295
Ser Ser Glu Pro Asp Thr Thr Ala Ser Trp Val Ile His Pro Ala		
2300	2305	2310
Glu Thr Ile Pro Thr Val Ser Lys Thr Thr Pro Asn Phe Phe His		
2315	2320	2325
Ser Glu Leu Asp Thr Val Ser Ser Thr Ala Thr Ser His Gly Ala		
2330	2335	2340
Asp Val Ser Ser Ala Ile Pro Thr Asn Ile Ser Pro Ser Glu Leu		
2345	2350	2355
Asp Ala Leu Thr Pro Leu Val Thr Ile Ser Gly Thr Asp Thr Ser		
2360	2365	2370
Thr Thr Phe Pro Thr Leu Thr Lys Ser Pro His Glu Thr Glu Thr		
2375	2380	2385
Arg Thr Thr Trp Leu Thr His Pro Ala Glu Thr Ser Ser Thr Ile		
2390	2395	2400
Pro Arg Thr Ile Pro Asn Phe Ser His His Glu Ser Asp Ala Thr		
2405	2410	2415
Pro Ser Ile Ala Thr Ser Pro Gly Ala Glu Thr Ser Ser Ala Ile		
2420	2425	2430
Pro Ile Met Thr Val Ser Pro Gly Ala Glu Asp Leu Val Thr Ser		
2435	2440	2445
Gln Val Thr Ser Ser Gly Thr Asp Arg Asn Met Thr Ile Pro Thr		
2450	2455	2460
Leu Thr Leu Ser Pro Gly Glu Pro Lys Thr Ile Ala Ser Leu Val		
2465	2470	2475
Thr His Pro Glu Ala Gln Thr Ser Ser Ala Ile Pro Thr Ser Thr		
2480	2485	2490

273

93875

274

Ile Ser Pro Ala Val Ser Arg Leu Val Thr Ser Met Val Thr Ser		
2495	2500	2505
Leu Ala Ala Lys Thr Ser Thr Thr Asn Arg Ala Leu Thr Asn Ser		
2510	2515	2520
Pro Gly Glu Pro Ala Thr Thr Val Ser Leu Val Thr His Ser Ala		
2525	2530	2535
Gln Thr Ser Pro Thr Val Pro Trp Thr Thr Ser Ile Phe Phe His		
2540	2545	2550
Ser Lys Ser Asp Thr Thr Pro Ser Met Thr Thr Ser His Gly Ala		
2555	2560	2565
Glu Ser Ser Ser Ala Val Pro Thr Pro Thr Val Ser Thr Glu Val		
2570	2575	2580
Pro Gly Val Val Thr Pro Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Ile		
2585	2590	2595
Ser Thr Thr Ile Pro Ile Leu Thr Leu Ser Pro Gly Glu Pro Glu		
2600	2605	2610
Thr Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly Glu Glu Ala Ser Ser		
2615	2620	2625
Ala Ile Pro Thr Pro Thr Val Ser Pro Gly Val Pro Gly Val Val		
2630	2635	2640
Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Ile		
2645	2650	2655
Pro Ile Leu Thr Phe Ser Leu Gly Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser		
2660	2665	2670
Met Ala Thr Ser His Gly Thr Glu Ala Gly Ser Ala Val Pro Thr		
2675	2680	2685
Val Leu Pro Glu Val Pro Gly Met Val Thr Ser Leu Val Ala Ser		
2690	2695	2700
Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Leu Pro Thr Leu Thr Leu Ser		
2705	2710	2715

275

93875

276

Pro Gly Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly	2720	2725	2730
Ala Glu Ala Ser Ser Thr Val Pro Thr Val Ser Pro Glu Val Pro	2735	2740	2745
Gly Val Val Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Ser Gly Val Asn Ser	2750	2755	2760
Thr Ser Ile Pro Thr Leu Ile Leu Ser Pro Gly Glu Leu Glu Thr	2765	2770	2775
Thr Pro Ser Met Ala Thr Ser His Gly Ala Glu Ala Ser Ser Ala	2780	2785	2790
Val Pro Thr Pro Thr Val Ser Pro Gly Val Ser Gly Val Val Thr	2795	2800	2805
Pro Leu Val Thr Ser Ser Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Ile Pro	2810	2815	2820
Ile Leu Thr Leu Ser Ser Ser Glu Pro Glu Thr Thr Pro Ser Met	2825	2830	2835
Ala Thr Ser His Gly Val Glu Ala Ser Ser Ala Val Leu Thr Val	2840	2845	2850
Ser Pro Glu Val Pro Gly Met Val Thr Phe Leu Val Thr Ser Ser	2855	2860	2865
Arg Ala Val Thr Ser Thr Thr Ile Pro Thr Leu Thr Ile Ser Ser	2870	2875	2880
Asp Glu Pro Glu Thr Thr Thr Ser Leu Val Thr His Ser Glu Ala	2885	2890	2895
Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu Gly Val Ser Pro Thr Val	2900	2905	2910
Gln Gly Leu Val Thr Ser Leu Val Thr Ser Ser Gly Ser Glu Thr	2915	2920	2925
Ser Ala Phe Ser Asn Leu Thr Val Ala Ser Ser Gln Pro Glu Thr	2930	2935	2940
Ile Asp Ser Trp Val Ala His Pro Gly Thr Glu Ala Ser Ser Val	2945	2950	2955



278

Val	Pro	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Thr	Gly	Glu	Pro	Phe	Thr	Asn	Ile	
					2960				2965					2970	
Ser	Leu	Val	Thr	His	Pro	Ala	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Pro	Arg	
				2975					2980					2985	
Thr	Thr	Ser	Arg	Phe	Ser	His	Ser	Glu	Leu	Asp	Thr	Met	Pro	Ser	
				2990					2995					3000	
Thr	Val	Thr	Ser	Pro	Glu	Ala	Glu	Ser	Ser	Ser	Ala	Ile	Ser	Thr	
				3005					3010					3015	
Thr	Ile	Ser	Pro	Gly	Ile	Pro	Gly	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Val	Thr	
				3020					3025					3030	
Ser	Ser	Gly	Arg	Asp	Ile	Ser	Ala	Thr	Phe	Pro	Thr	Val	Pro	Glu	
				3035					3040					3045	
Ser	Pro	His	Glu	Ser	Glu	Ala	Thr	Ala	Ser	Trp	Val	Thr	His	Pro	
				3050					3055					3060	
Ala	Val	Thr	Ser	Thr	Thr	Val	Pro	Arg	Thr	Thr	Pro	Asn	Tyr	Ser	
				3065					3070					3075	
His	Ser	Glu	Pro	Asp	Thr	Thr	Pro	Ser	Ile	Ala	Thr	Ser	Pro	Gly	
				3080					3085					3090	
Ala	Glu	Ala	Thr	Ser	Asp	Phe	Pro	Thr	Ile	Thr	Val	Ser	Pro	Asp	
				3095					3100					3105	
Val	Pro	Asp	Met	Val	Thr	Ser	Gln	Val	Thr	Ser	Ser	Gly	Thr	Asp	
				3110					3115					3120	
Thr	Ser	Ile	Thr	Ile	Pro	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Ser	Gly	Glu	Pro	
				3125					3130					3135	
Glu	Thr	Thr	Thr	Ser	Phe	Ile	Thr	Tyr	Ser	Glu	Thr	His	Thr	Ser	
				3140					3145					3150	
Ser	Ala	Ile	Pro	Thr	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Asp	Ala	Ser	Lys	Met	
				3155					3160					3165	
Leu	Thr	Ser	Leu	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Asp	Ser	Thr	Thr	Thr	
				3170					3175					3180	

279

93875

280

Phe	Pro	Thr	Leu	Thr	Glu	Thr	Pro	Tyr	Glu	Pro	Glu	Thr	Thr	Ala
			3185						3190					3195
Ile	Gln	Leu	Ile	His	Pro	Ala	Glu	Thr	Asn	Thr	Met	Val	Pro	Arg
			3200						3205					3210
Thr	Thr	Pro	Lys	Phe	Ser	His	Ser	Lys	Ser	Asp	Thr	Thr	Leu	Pro
			3215						3220					3225
Val	Ala	Ile	Thr	Ser	Pro	Gly	Pro	Glu	Ala	Ser	Ser	Ala	Val	Ser
			3230						3235					3240
Thr	Thr	Thr	Ile	Ser	Pro	Asp	Met	Ser	Asp	Leu	Val	Thr	Ser	Leu
			3245						3250					3255
Val	Pro	Ser	Ser	Gly	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Thr	Phe	Pro	Thr	Leu
			3260						3265					3270
Ser	Glu	Thr	Pro	Tyr	Glu	Pro	Glu	Thr	Thr	Ala	Thr	Trp	Leu	Thr
			3275						3280					3285
His	Pro	Ala	Glu	Thr	Ser	Thr	Thr	Val	Ser	Gly	Thr	Ile	Pro	Asn
			3290						3295					3300
Phe	Ser	His	Arg	Gly	Ser	Asp	Thr	Ala	Pro	Ser	Met	Val	Thr	Ser
			3305						3310					3315
Pro	Gly	Val	Asp	Thr	Arg	Ser	Gly	Val	Pro	Thr	Thr	Thr	Ile	Pro
			3320						3325					3330
Pro	Ser	Ile	Pro	Gly	Val	Val	Thr	Ser	Gln	Val	Thr	Ser	Ser	Ala
			3335						3340					3345
Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ala	Ile	Pro	Thr	Leu	Thr	Pro	Ser	Pro	Gly
			3350						3355					3360
Glu	Pro	Glu	Thr	Thr	Ala	Ser	Ser	Ala	Thr	His	Pro	Gly	Thr	Gln
			3365						3370					3375
Thr	Gly	Phe	Thr	Val	Pro	Ile	Arg	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Glu	Pro
			3380						3385					3390
Asp	Thr	Met	Ala	Ser	Trp	Val	Thr	His	Pro	Pro	Gln	Thr	Ser	Thr
			3395						3400					3405
Pro	Val	Ser	Arg	Thr	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	His	Ser	Ser	Pro	Asp
			3410						3415					3420

281

93875

282

Ala Thr Pro Val Met Ala Thr Ser Pro Arg Thr Glu Ala Ser Ser		
3425	3430	3435
Ala Val Leu Thr Thr Ile Ser Pro Gly Ala Pro Glu Met Val Thr		
3440	3445	3450
Ser Gln Ile Thr Ser Ser Gly Ala Ala Thr Ser Thr Thr Val Pro		
3455	3460	3465
Thr Leu Thr His Ser Pro Gly Met Pro Glu Thr Thr Ala Leu Leu		
3470	3475	3480
Ser Thr His Pro Arg Thr Glu Thr Ser Lys Thr Phe Pro Ala Ser		
3485	3490	3495
Thr Val Phe Pro Gln Val Ser Glu Thr Thr Ala Ser Leu Thr Ile		
3500	3505	3510
Arg Pro Gly Ala Glu Thr Ser Thr Ala Leu Pro Thr Gln Thr Thr		
3515	3520	3525
Ser Ser Leu Phe Thr Leu Leu Val Thr Gly Thr Ser Arg Val Asp		
3530	3535	3540
Leu Ser Pro Thr Ala Ser Pro Gly Val Ser Ala Lys Thr Ala Pro		
3545	3550	3555
Leu Ser Thr His Pro Gly Thr Glu Thr Ser Thr Met Ile Pro Thr		
3560	3565	3570
Ser Thr Leu Ser Leu Gly Leu Leu Glu Thr Thr Gly Leu Leu Ala		
3575	3580	3585
Thr Ser Ser Ser Ala Glu Thr Ser Thr Ser Thr Leu Thr Leu Thr		
3590	3595	3600
Val Ser Pro Ala Val Ser Gly Leu Ser Ser Ala Ser Ile Thr Thr		
3605	3610	3615
Asp Lys Pro Gln Thr Val Thr Ser Trp Asn Thr Glu Thr Ser Pro		
3620	3625	3630
Ser Val Thr Ser Val Gly Pro Pro Glu Phe Ser Arg Thr Val Thr		
3635	3640	3645

283

93875

284

Gly Thr Thr Met Thr Leu Ile Pro Ser Glu Met Pro Thr Pro Pro	3650	3655	3660
Lys Thr Ser His Gly Glu Gly Val Ser Pro Thr Thr Ile Leu Arg	3665	3670	3675
Thr Thr Met Val Glu Ala Thr Asn Leu Ala Thr Thr Gly Ser Ser	3680	3685	3690
Pro Thr Val Ala Lys Thr Thr Thr Thr Phe Asn Thr Leu Ala Gly	3695	3700	3705
Ser Leu Phe Thr Pro Leu Thr Thr Pro Gly Met Ser Thr Leu Ala	3710	3715	3720
Ser Glu Ser Val Thr Ser Arg Thr Ser Tyr Asn His Arg Ser Trp	3725	3730	3735
Ile Ser Thr Thr Ser Ser Tyr Asn Arg Arg Tyr Trp Thr Pro Ala	3740	3745	3750
Thr Ser Thr Pro Val Thr Ser Thr Phe Ser Pro Gly Ile Ser Thr	3755	3760	3765
Ser Ser Ile Pro Ser Ser Thr Ala Ala Thr Val Pro Phe Met Val	3770	3775	3780
Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu	3785	3790	3795
Asp Met Arg His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ala Thr Glu Arg	3800	3805	3810
Glu Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Arg Asn Ser Ser Leu	3815	3820	3825
Glu Tyr Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Ala Ser Leu Arg Pro Glu	3830	3835	3840
Lys Asp Ser Ser Ala Thr Ala Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg	3845	3850	3855
Pro Asp Pro Glu Asp Leu Gly Leu Asp Arg Glu Arg Leu Tyr Trp	3860	3865	3870
Glu Leu Ser Asn Leu Thr Asn Gly Ile Gln Glu Leu Gly Pro Tyr	3875	3880	3885

285

93875

286

Thr	Leu	Asp	Arg	Asn	Ser	Leu	Tyr	Val	Asn	Gly	Phe	Thr	His	Arg
				3890					3895					3900
Ser	Ser	Met	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Val	Asp
				3905					3910					3915
Val	Gly	Thr	Ser	Gly	Thr	Pro	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Pro	Thr	Thr
				3920					3925					3930
Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Met	Pro	Phe	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Ile	Thr
				3935					3940					3945
Asn	Leu	Gln	Tyr	Glu	Glu	Asp	Met	Arg	Arg	Thr	Gly	Ser	Arg	Lys
				3950					3955					3960
Phe	Asn	Thr	Met	Glu	Ser	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Leu
				3965					3970					3975
Phe	Lys	Asn	Thr	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Tyr	Ser	Gly	Cys	Arg	Leu
				3980					3985					3990
Thr	Leu	Leu	Arg	Pro	Glu	Lys	Asp	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly	Val	Asp
				3995					4000					4005
Ala	Ile	Cys	Thr	His	Arg	Leu	Asp	Pro	Lys	Ser	Pro	Gly	Leu	Asn
				4010					4015					4020
Arg	Glu	Gln	Leu	Tyr	Trp	Glu	Leu	Ser	Lys	Leu	Thr	Asn	Asp	Ile
				4025					4030					4035
Glu	Glu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Thr	Leu	Asp	Arg	Asn	Ser	Leu	Tyr	Val
				4040					4045					4050
Asn	Gly	Phe	Thr	His	Gln	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro
				4055					4060					4065
Gly	Thr	Ser	Thr	Val	Asp	Leu	Arg	Thr	Ser	Gly	Thr	Pro	Ser	Ser
				4070					4075					4080
Leu	Ser	Ser	Pro	Thr	Ile	Met	Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Pro
				4085					4090					4095
Phe	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Ile	Thr	Asn	Leu	Gln	Tyr	Gly	Glu	Asp
				4100					4105					4110

287

93875

288

Met Gly His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val		
4115	4120	4125
Leu Gln Gly Leu Leu Gly Pro Ile Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly		
4130	4135	4140
Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Ser Leu Arg Ser Glu Lys		
4145	4150	4155
Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Ile His His Leu		
4160	4165	4170
Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asn Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Glu		
4175	4180	4185
Leu Ser Gln Leu Thr Asn Gly Ile Lys Glu Leu Gly Pro Tyr Thr		
4190	4195	4200
Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Thr		
4205	4210	4215
Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Asp Leu		
4220	4225	4230
Gly Thr Ser Gly Thr Pro Phe Ser Leu Pro Ser Pro Ala Thr Ala		
4235	4240	4245
Gly Pro Leu Leu Val Leu Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn		
4250	4255	4260
Leu Lys Tyr Glu Glu Asp Met His Arg Pro Gly Ser Arg Lys Phe		
4265	4270	4275
Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Thr Leu Val Gly Pro Met Phe		
4280	4285	4290
Lys Asn Thr Ser Val Gly Leu Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr		
4295	4300	4305
Leu Leu Arg Ser Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala		
4310	4315	4320
Ile Cys Thr His Arg Leu Asp Pro Lys Ser Pro Gly Val Asp Arg		
4325	4330	4335
Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr Asn Gly Ile Lys		
4340	4345	4350

289

93875

290

Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn		
4355	4360	4365
Gly Phe Thr His Trp Ile Pro Val Pro Thr Ser Ser Thr Pro Gly		
4370	4375	4380
Thr Ser Thr Val Asp Leu Gly Ser Gly Thr Pro Ser Ser Leu Pro		
4385	4390	4395
Ser Pro Thr Ser Ala Thr Ala Gly Pro Leu Leu Val Pro Phe Thr		
4400	4405	4410
Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Lys Tyr Glu Glu Asp Met His		
4415	4420	4425
Cys Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln		
4430	4435	4440
Ser Leu Leu Gly Pro Met Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu		
4445	4450	4455
Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Ser Glu Lys Asp Gly		
4460	4465	4470
Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg Leu Asp Pro		
4475	4480	4485
Lys Ser Pro Gly Val Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser		
4490	4495	4500
Gln Leu Thr Asn Gly Ile Lys Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp		
4505	4510	4515
Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Gln Thr Ser Ala		
4520	4525	4530
Pro Asn Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Asp Leu Gly Thr		
4535	4540	4545
Ser Gly Thr Pro Ser Ser Leu Pro Ser Pro Thr Ser Ala Gly Pro		
4550	4555	4560
Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln		
4565	4570	4575

291

93875

292

Tyr Glu Glu Asp Met His His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr	4580	4585	4590
Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Gly Pro Met Phe Lys Asn	4595	4600	4605
Thr Ser Val Gly Leu Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu	4610	4615	4620
Arg Pro Glu Lys Asn Gly Ala Ala Thr Gly Met Asp Ala Ile Cys	4625	4630	4635
Ser His Arg Leu Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asn Arg Glu Gln	4640	4645	4650
Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Gly Ile Lys Glu Leu	4655	4660	4665
Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe	4670	4675	4680
Thr His Arg Ser Ser Val Ala Pro Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser	4685	4690	4695
Thr Val Asp Leu Gly Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser Leu Pro Ser	4700	4705	4710
Pro Thr Thr Ala Val Pro Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe	4715	4720	4725
Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Gly Glu Asp Met Arg His Pro Gly	4730	4735	4740
Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu	4745	4750	4755
Gly Pro Leu Phe Lys Asn Ser Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly	4760	4765	4770
Cys Arg Leu Ile Ser Leu Arg Ser Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr	4775	4780	4785
Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr His His Leu Asn Pro Gln Ser Pro	4790	4795	4800
Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Gln Leu Ser Gln Met Thr	4805	4810	4815



293

93875

294

Asn Gly Ile Lys Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser		
4820	4825	4830
Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Gly Leu Thr Thr		
4835	4840	4845
Ser Thr Pro Trp Thr Ser Thr Val Asp Leu Gly Thr Ser Gly Thr		
4850	4855	4860
Pro Ser Pro Val Pro Ser Pro Thr Thr Ala Gly Pro Leu Leu Val		
4865	4870	4875
Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu		
4880	4885	4890
Asp Met His Arg Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ala Thr Glu Arg		
4895	4900	4905
Val Leu Gln Gly Leu Leu Ser Pro Ile Phe Lys Asn Ser Ser Val		
4910	4915	4920
Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Ser Leu Arg Pro Glu		
4925	4930	4935
Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Met Asp Ala Val Cys Leu Tyr His		
4940	4945	4950
Pro Asn Pro Lys Arg Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp		
4955	4960	4965
Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Asn Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr		
4970	4975	4980
Ser Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Gln		
4985	4990	4995
Asn Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser Thr Val Tyr		
5000	5005	5010
Trp Ala Thr Thr Gly Thr Pro Ser Ser Phe Pro Gly His Thr Glu		
5015	5020	5025
Pro Gly Pro Leu Leu Ile Pro Phe Thr Phe Asn Phe Thr Ile Thr		
5030	5035	5040

295

93875

296

Asn Leu His Tyr Glu Glu Asn Met Gln His Pro Gly Ser Arg Lys		
5045	5050	5055
Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu		
5060	5065	5070
Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu		
5075	5080	5085
Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Gln Glu Ala Ala Thr Gly Val Asp		
5090	5095	5100
Thr Ile Cys Thr His Arg Val Asp Pro Ile Gly Pro Gly Leu Asp		
5105	5110	5115
Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr Asn Ser Ile		
5120	5125	5130
Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val		
5135	5140	5145
Asn Gly Phe Asn Pro Trp Ser Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro		
5150	5155	5160
Gly Thr Ser Thr Val His Leu Ala Thr Ser Gly Thr Pro Ser Ser		
5165	5170	5175
Leu Pro Gly His Thr Ala Pro Val Pro Leu Leu Ile Pro Phe Thr		
5180	5185	5190
Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu His Tyr Glu Glu Asn Met Gln		
5195	5200	5205
His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln		
5210	5215	5220
Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Lys Ser Thr Ser Val Gly Pro Leu		
5225	5230	5235
Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys His Gly		
5240	5245	5250
Ala Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr Leu Arg Leu Asp Pro		
5255	5260	5265
Thr Gly Pro Gly Leu Asp Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Glu Leu Ser		
5270	5275	5280

297

93875

298

Gln Leu Thr Asn Ser Val Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp		
5285	5290	5295
Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Val		
5300	5305	5310
Pro Thr Thr Ser Ile Pro Gly Thr Ser Ala Val His Leu Glu Thr		
5315	5320	5325
Ser Gly Thr Pro Ala Ser Leu Pro Gly His Thr Ala Pro Gly Pro		
5330	5335	5340
Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln		
5345	5350	5355
Tyr Glu Glu Asp Met Arg His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr		
5360	5365	5370
Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Lys Ser		
5375	5380	5385
Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu		
5390	5395	5400
Arg Pro Glu Lys Arg Gly Ala Ala Thr Gly Val Asp Thr Ile Cys		
5405	5410	5415
Thr His Arg Leu Asp Pro Leu Asn Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln		
5420	5425	5430
Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Lys Leu Thr Arg Gly Ile Ile Glu Leu		
5435	5440	5445
Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Arg Gly Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe		
5450	5455	5460
Thr His Arg Asn Phe Val Pro Ile Thr Ser Thr Pro Gly Thr Ser		
5465	5470	5475
Thr Val His Leu Gly Thr Ser Glu Thr Pro Ser Ser Leu Pro Arg		
5480	5485	5490
Pro Ile Val Pro Gly Pro Leu Leu Val Pro Phe Thr Leu Asn Phe		
5495	5500	5505

299

93875

300

Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu Ala Met Arg His Pro Gly		
5510	5515	5520
Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu		
5525	5530	5535
Arg Pro Leu Phe Lys Asn Thr Ser Ile Gly Pro Leu Tyr Ser Ser		
5540	5545	5550
Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Lys Ala Ala Thr		
5555	5560	5565
Arg Val Asp Ala Ile Cys Thr His His Pro Asp Pro Gln Ser Pro		
5570	5575	5580
Gly Leu Asn Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr		
5585	5590	5595
His Gly Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser		
5600	5605	5610
Leu Tyr Val Asp Gly Phe Thr His Trp Ser Pro Ile Pro Thr Thr		
5615	5620	5625
Ser Thr Pro Gly Thr Ser Ile Val Asn Leu Gly Thr Ser Gly Ile		
5630	5635	5640
Pro Pro Ser Leu Pro Glu Thr Thr Ala Thr Gly Pro Leu Leu Val		
5645	5650	5655
Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln Tyr Glu Glu		
5660	5665	5670
Asn Met Gly His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ile Thr Glu Ser		
5675	5680	5685
Val Leu Gln Gly Leu Leu Lys Pro Leu Phe Lys Ser Thr Ser Val		
5690	5695	5700
Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu		
5705	5710	5715
Lys Asp Gly Val Ala Thr Arg Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg		
5720	5725	5730
Pro Asp Pro Lys Ile Pro Gly Leu Asp Arg Gln Gln Leu Tyr Trp		
5735	5740	5745

301

93875

302

Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr		
5750	5755	5760
Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr Gln Arg		
5765	5770	5775
Ser Ser Val Pro Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Phe Thr Val Gln		
5780	5785	5790
Pro Glu Thr Ser Glu Thr Pro Ser Ser Leu Pro Gly Pro Thr Ala		
5795	5800	5805
Thr Gly Pro Val Leu Leu Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Ile		
5810	5815	5820
Asn Leu Gln Tyr Glu Glu Asp Met His Arg Pro Gly Ser Arg Lys		
5825	5830	5835
Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Met Pro Leu		
5840	5845	5850
Phe Lys Asn Thr Ser Val Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu		
5855	5860	5865
Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Arg Val Asp		
5870	5875	5880
Ala Val Cys Thr His Arg Pro Asp Pro Lys Ser Pro Gly Leu Asp		
5885	5890	5895
Arg Glu Arg Leu Tyr Trp Lys Leu Ser Gln Leu Thr His Gly Ile		
5900	5905	5910
Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg His Ser Leu Tyr Val		
5915	5920	5925
Asn Gly Phe Thr His Gln Ser Ser Met Thr Thr Thr Arg Thr Pro		
5930	5935	5940
Asp Thr Ser Thr Met His Leu Ala Thr Ser Arg Thr Pro Ala Ser		
5945	5950	5955
Leu Ser Gly Pro Thr Thr Ala Ser Pro Leu Leu Val Leu Phe Thr		
5960	5965	5970

303

93875

304

Ile Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Arg Tyr Glu Glu Asn Met His		
5975	5980	5985
His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln		
5990	5995	6000
Gly Leu Leu Arg Pro Val Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu		
6005	6010	6015
Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Lys Lys Asp Gly		
6020	6025	6030
Ala Ala Thr Lys Val Asp Ala Ile Cys Thr Tyr Arg Pro Asp Pro		
6035	6040	6045
Lys Ser Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser		
6050	6055	6060
Gln Leu Thr His Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp		
6065	6070	6075
Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr Gln Arg Ser Ser Val		
6080	6085	6090
Pro Thr Thr Ser Ile Pro Gly Thr Pro Thr Val Asp Leu Gly Thr		
6095	6100	6105
Ser Gly Thr Pro Val Ser Lys Pro Gly Pro Ser Ala Ala Ser Pro		
6110	6115	6120
Leu Leu Val Leu Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Arg		
6125	6130	6135
Tyr Glu Glu Asn Met Gln His Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr		
6140	6145	6150
Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Arg Ser Leu Phe Lys Ser		
6155	6160	6165
Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu		
6170	6175	6180
Arg Pro Glu Lys Asp Gly Thr Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys		
6185	6190	6195
Thr His His Pro Asp Pro Lys Ser Pro Arg Leu Asp Arg Glu Gln		
6200	6205	6210

305

93875

306

Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Asn Ile Thr Glu Leu		
6215	6220	6225
Gly Pro Tyr Ala Leu Asp Asn Asp Ser Leu Phe Val Asn Gly Phe		
6230	6235	6240
Thr His Arg Ser Ser Val Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Pro		
6245	6250	6255
Thr Val Tyr Leu Gly Ala Ser Lys Thr Pro Ala Ser Ile Phe Gly		
6260	6265	6270
Pro Ser Ala Ala Ser His Leu Leu Ile Leu Phe Thr Leu Asn Phe		
6275	6280	6285
Thr Ile Thr Asn Leu Arg Tyr Glu Glu Asn Met Trp Pro Gly Ser		
6290	6295	6300
Arg Lys Phe Asn Thr Thr Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Arg		
6305	6310	6315
Pro Leu Phe Lys Asn Thr Ser Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys		
6320	6325	6330
Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Glu Ala Thr Gly		
6335	6340	6345
Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg Pro Asp Pro Thr Gly Pro Gly		
6350	6355	6360
Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Thr His		
6365	6370	6375
Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu		
6380	6385	6390
Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Val Pro Thr Thr Ser		
6395	6400	6405
Thr Gly Val Val Ser Glu Glu Pro Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile		
6410	6415	6420
Asn Asn Leu Arg Tyr Met Ala Asp Met Gly Gln Pro Gly Ser Leu		
6425	6430	6435

307

93875

308

Lys Phe Asn Ile Thr Asp Asn Val Met Gln His Leu Leu Ser Pro		
6440	6445	6450
Leu Phe Gln Arg Ser Ser Leu Gly Ala Arg Tyr Thr Gly Cys Arg		
6455	6460	6465
Val Ile Ala Leu Arg Ser Val Lys Asn Gly Ala Glu Thr Arg Val		
6470	6475	6480
Asp Leu Leu Cys Thr Tyr Leu Gln Pro Leu Ser Gly Pro Gly Leu		
6485	6490	6495
Pro Ile Lys Gln Val Phe His Glu Leu Ser Gln Gln Thr His Gly		
6500	6505	6510
Ile Thr Arg Leu Gly Pro Tyr Ser Leu Asp Lys Asp Ser Leu Tyr		
6515	6520	6525
Leu Asn Gly Tyr Asn Glu Pro Gly Pro Asp Glu Pro Pro Thr Thr		
6530	6535	6540
Pro Lys Pro Ala Thr Thr Phe Leu Pro Pro Leu Ser Glu Ala Thr		
6545	6550	6555
Thr Ala Met Gly Tyr His Leu Lys Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr		
6560	6565	6570
Ile Ser Asn Leu Gln Tyr Ser Pro Asp Met Gly Lys Gly Ser Ala		
6575	6580	6585
Thr Phe Asn Ser Thr Glu Gly Val Leu Gln His Leu Leu Arg Pro		
6590	6595	6600
Leu Phe Gln Lys Ser Ser Met Gly Pro Phe Tyr Leu Gly Cys Gln		
6605	6610	6615
Leu Ile Ser Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala Ala Thr Gly Val		
6620	6625	6630
Asp Thr Thr Cys Thr Tyr His Pro Asp Pro Val Gly Pro Gly Leu		
6635	6640	6645
Asp Ile Gln Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr His Gly		
6650	6655	6660
Val Thr Gln Leu Gly Phe Tyr Val Leu Asp Arg Asp Ser Leu Phe		
6665	6670	6675



309

93875

310

Ile Asn Gly Tyr Ala Pro Gln Asn Leu Ser Ile Arg Gly Glu Tyr		
6680	6685	6690
Gln Ile Asn Phe His Ile Val Asn Trp Asn Leu Ser Asn Pro Asp		
6695	6700	6705
Pro Thr Ser Ser Glu Tyr Ile Thr Leu Leu Arg Asp Ile Gln Asp		
6710	6715	6720
Lys Val Thr Thr Leu Tyr Lys Gly Ser Gln Leu His Asp Thr Phe		
6725	6730	6735
Arg Phe Cys Leu Val Thr Asn Leu Thr Met Asp Ser Val Leu Val		
6740	6745	6750
Thr Val Lys Ala Leu Phe Ser Ser Asn Leu Asp Pro Ser Leu Val		
6755	6760	6765
Glu Gln Val Phe Leu Asp Lys Thr Leu Asn Ala Ser Phe His Trp		
6770	6775	6780
Leu Gly Ser Thr Tyr Gln Leu Val Asp Ile His Val Thr Glu Met		
6785	6790	6795
Glu Ser Ser Val Tyr Gln Pro Thr Ser Ser Ser Ser Thr Gln His		
6800	6805	6810
Phe Tyr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Pro Tyr Ser Gln Asp		
6815	6820	6825
Lys Ala Gln Pro Gly Thr Thr Asn Tyr Gln Arg Asn Lys Arg Asn		
6830	6835	6840
Ile Glu Asp Ala Leu Asn Gln Leu Phe Arg Asn Ser Ser Ile Lys		
6845	6850	6855
Ser Tyr Phe Ser Asp Cys Gln Val Ser Thr Phe Arg Ser Val Pro		
6860	6865	6870
Asn Arg His His Thr Gly Val Asp Ser Leu Cys Asn Phe Ser Pro		
6875	6880	6885
Leu Ala Arg Arg Val Asp Arg Val Ala Ile Tyr Glu Glu Phe Leu		
6890	6895	6900

311

93875

312

```

Arg Met Thr Arg Asn Gly Thr Gln Leu Gln Asn Phe Thr Leu Asp
      6905                      6910                      6915

Arg Ser Ser Val Leu Val Asp Gly Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Glu
      6920                      6925                      6930

Pro Leu Thr Gly Asn Ser Asp Leu Pro Phe Trp Ala Val Ile Leu
      6935                      6940                      6945

Ile Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Leu Ile Thr Cys Leu Ile Cys
      6950                      6955                      6960

Gly Val Leu Val Thr Thr Arg Arg Arg Lys Lys Glu Gly Glu Tyr
      6965                      6970                      6975

Asn Val Gln Gln Gln Cys Pro Gly Tyr Tyr Gln Ser His Leu Asp
      6980                      6985                      6990

Leu Glu Asp Leu Gln
      6995

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

```

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

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

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

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
      50              55              60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
      65              70              75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
      80              85              90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
      95              100             105

```

313

93875

314

Ile Lys Arg

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 109

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

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

Gly	Glu	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser
				20					25					30

Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro
				35					40					45

Lys	Leu	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
				50					55					60

Gly	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr
				65					70					75

Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His
				80					85					90

Gln	Tyr	His	Arg	Ser	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val
				95					100					105

Glu Ile Lys Arg

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 109

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

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

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser
				20					25					30

315

93875

316

Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75  
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His  
 80 85 90  
 Gln Tyr His Arg Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
 95 100 105  
 Glu Ile Lys Arg

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

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

317

93875

318

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

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

Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys
				20					25					30

Asp	Thr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu
				35					40					45

Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Val	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr
				50					55					60

Asp	Pro	Lys	Phe	Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser
				65					70					75

Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp
				80					85					90

Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Val	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Gly	His	Thr	Tyr
				95					100					105

Gly	Phe	Ala	Phe	Cys	Asp	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ala
				110					115					120

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

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

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys
				20					25					30

Asp	Thr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45

319

93875

320

Glu	Trp	Val	Gly	Arg	Val	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr
				50					55					60
Asp	Pro	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Gly	His	Thr	Tyr
				95					100					105
Gly	Phe	Ala	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				110					115					120

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

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

Ile Lys

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 108

321

93875

322

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

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

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 11

Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Asn	Pro	Ser
1				5					10					15
Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr
				20					25					30
Asn	Asp	Tyr	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys
				35					40					45
Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Tyr	Ile	Asn	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Thr	Tyr
				50					55					60

323

93875

324

Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Gln	Phe	Phe	Leu	His	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Asp	Gly	Gly	Leu	Thr	Tyr
				95					100					105
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala				
				110					115					

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 12

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

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens



325

93875

326

&lt;400&gt; 13

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
 20 25 30

Asn Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 35 40 45

Leu Glu Trp Val Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr  
 50 55 60

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
 65 70 75

Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Gly Gly Leu Thr Tyr  
 95 100 105

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 110 115

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His  
 5 10

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 15

Thr Gln Arg Thr Ser Val Lys Arg Ser Tyr Ile Ser  
 5 10

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 16

Thr Pro Arg Gly Arg Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ser  
5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> не гарантована кількість

<222> 4

<223> невідома амінокислота

<400> 17

Pro Glu Cys Xaa Ser Leu Gly Thr Ile Tyr Leu His  
5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Ser Thr Tyr Leu His  
5 10

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Thr Ala Ser Thr Ala Val Gly Ser Ser Tyr Leu His  
5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Asn Ser Arg Ser Val Ser Thr Arg Tyr Leu His  
5 10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 21  
Asn Thr Thr Arg Ser Val Ser Thr Gly Tyr Leu His  
5 10

<210> 22  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 22  
Thr Ala Ser Ser Arg Val Thr Ser Thr Tyr Leu His  
5 10

<210> 23  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 23  
Asn Thr Pro Thr Gly Val Asn Pro Val Tyr Leu His  
5 10

<210> 24  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 24  
Ala Ala Ser Ser Asp Val Ile Gly Ser Tyr Val His  
5 10

<210> 25  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 25  
Gly Leu Ser Thr Ser Val Asn Ser Ser Tyr Met His  
5 10

<210> 26  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> Unsure  
<222> 10  
<223> Unknown amino acid

<400> 26  
Asn Ala Lys Ser Gly Val Arg Ser Ser Xaa Val His  
                          5                          10

<210> 27  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 27  
Asn Ser Asn Gly Ser Val Ser Ser Lys Tyr Ile His  
                          5                          10

<210> 28  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 28  
Thr Pro Ser Arg Ile Val Ser Gly Ser Tyr Leu Ser  
                          5                          10

<210> 29  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 29  
Asn Pro Ser Arg Arg Val Thr Gly His Tyr Val Ser  
                          5                          10

<210> 30  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 30  
Thr Ser Ser Ser Ala Val Ser Gly Ser Tyr Val Ser  
                          5                          10

<210> 31

333

93875

334

<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 31  
Thr Ser Thr Thr Ile Val Arg Gly Arg Tyr Val Ser  
5 10

<210> 32  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 32  
Thr Ala Ser Ser Thr Leu Ser Ser Asn Tyr Leu Thr  
5 10

<210> 33  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 33  
Thr Pro Thr Gly Ser Ile Ser Arg Arg Tyr Leu Ser  
5 10

<210> 34  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 34  
Thr Ala Gly Ser Lys Ala Asn Ser Ser Tyr Ile His  
5 10

<210> 35  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 35  
Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
5

<210> 36  
<211> 8  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Tyr Ser Thr Ser His Phe Ala Ser  
5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Tyr Ser Ala Ser Asn Val Pro Ser  
5

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Tyr Ser Thr Ile Asn Leu Ala Thr  
5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Tyr Ser Thr Ser Lys Val Ala Asn  
5

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Tyr Ser Thr Thr Asn Leu Ala Ser  
5

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41  
Tyr Ser Thr Asn His Leu Ala Ser  
5

<210> 42  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 42  
Tyr Ser Thr Asn Asn Leu Ala Ser  
5

<210> 43  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 43  
Tyr Ser Thr Ile His Pro Ala Ser  
5

<210> 44  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 44  
Tyr Ser Thr Ser His Leu Ser Tyr  
5

<210> 45  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 45  
Tyr Ser Thr Arg Thr Met Ala Ser  
5

<210> 46  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> не гарантована кількість

<222> 5  
<223> невідома амінокислота

<400> 46  
Tyr Ser Thr Ser Xaa Leu Phe Ser  
5

<210> 47  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 47  
Tyr Asn Thr Ser Asn Arg Ala Ser  
5

<210> 48  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Rana catesbeiana

<400> 48  
Tyr Gly Thr Ser His Leu Ala Ser  
5

<210> 49  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 49  
Tyr Gly Thr Gly Ser Pro Ala Ser  
5

<210> 50  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 50  
Tyr Ser Thr Asn Lys Leu Ala Arg  
5

<210> 51  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens



<400> 51  
Tyr Ser Thr Ser Gln Leu Gly Arg  
5

<210> 52  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 52  
Tyr Ser Thr Ser Asn Val Pro Gln  
5

<210> 53  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 53  
Tyr Gly Thr Tyr Asn Leu Pro Ile  
5

<210> 54  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 54  
Tyr Gly Ser Asn Asn Arg Ala Tyr  
5

<210> 55  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> не гарантована кількість  
<222> 7  
<223> невідома амінокислота

<400> 55  
Tyr Ser Ser Ser Asn Thr Xaa Ser  
5

<210> 56

<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 56  
Tyr Ser Ala Asn Lys Leu Ala Ser  
5

<210> 57  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 57  
Tyr Ser Ala Thr Arg Arg Ala Ser  
5

<210> 58  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 58  
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Ala Arg  
5

<210> 59  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 59  
His Gln Tyr His Arg Ser Pro Tyr Thr  
5

<210> 60  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 60  
His Gln Tyr His Arg Ser Pro Tyr Lys  
5

<210> 61  
<211> 9  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

His Gln Tyr His Arg Thr Pro Tyr Lys  
5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Tyr Gly  
5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Tyr Asn  
5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Tyr Ser  
5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

His Gln Tyr Tyr Arg Ser Pro Tyr Thr  
5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66  
His Gln Tyr Tyr Arg Thr Pro Tyr Ser  
5

<210> 67  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 67  
His Gln Tyr Gln Arg Ser Pro Tyr Thr  
5

<210> 68  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 68  
His Gln Tyr Gln Arg Ser Pro Tyr Arg  
5

<210> 69  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 69  
His Gln Tyr Asn Arg Ser Pro Tyr Ala  
5

<210> 70  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 70  
His Gln Tyr His Arg Thr Pro Tyr Thr  
5

<210> 71  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 71  
His Gln Tyr His Arg Ser Pro Tyr Ile  
5

<210> 72  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 72  
His Gln Tyr His Arg Arg Pro Tyr Arg  
5

<210> 73  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 73  
His Gln Tyr His Arg Asn Pro Tyr Ile  
5

<210> 74  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 74  
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His  
5 10

<210> 75  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 75  
Ala Phe Asn Ile Ala Asp Thr Tyr Ile His  
5 10

<210> 76  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 76  
Arg Phe Arg Ile Lys Asp Thr Tyr Val His  
5 10

<210> 77

<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 77  
Arg Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His  
                          5                          10

<210> 78  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 78  
Ser Phe Gln Ile Asn Asp Thr Tyr Ile His  
                          5                          10

<210> 79  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 79  
Ser Phe Gln Met Ser Asp Thr Tyr Val His  
                          5                          10

<210> 80  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 80  
Asp Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His  
                          5                          10

<210> 81  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 81  
Gly Phe Asn Ile Ile Asp Thr Tyr Ile His  
                          5                          10

<210> 82  
<211> 10  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Gly Leu Gln Ile Val Asp Thr Tyr Ile His  
5 10

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Leu His  
5 10

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Gly Phe Asn Ile Gln Asp Leu Tyr Leu His  
5 10

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Gly Phe Asn Ile Ile Asp Thr Tyr Met His  
5 10

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Gly Trp Lys Met Thr Asp Thr Tyr Met His  
5 10

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 87

Glu Phe Lys Ile Lys Asp Thr Tyr Val His  
5 10

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 88

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Val His  
5 10

&lt;210&gt; 89

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 89

Gly Phe Tyr Ile Ser Asn Thr Tyr Ile His  
5 10

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 90

Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr Tyr Leu His  
5 10

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 91

Gly Phe Ser Ile Glu Asn Thr Tyr Met His  
5 10

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 92

Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr Tyr Met His  
5 10



357

93875

358

<210> 93  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 93  
Asp Phe Lys Ile Glu Asn Thr Tyr Val His  
                          5                          10

<210> 94  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 94  
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys  
      1                          5                          10                          15

Phe Gln Gly

<210> 95  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 95  
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Ser Asp Pro Lys  
      1                          5                          10                          15

Val Arg Gly

<210> 96  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 96  
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Leu Thr Lys Tyr Asp Pro Lys  
      1                          5                          10                          15

Phe Gln Gly

<210> 97

359

93875

360

<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 97  
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Glu Ile Lys Ser His Pro Ile  
1 5 10 15  
  
Phe Gln Gly

<210> 98  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 98  
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Glu Asp Arg Gln  
1 5 10 15  
  
Phe Gln Gly

<210> 99  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 99  
Gly Arg Val Asp Pro Glu Tyr Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys  
1 5 10 15  
  
Phe Gln Gly

<210> 100  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 100  
Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys  
1 5 10 15  
  
Phe Gln Gly

361

93875

362

<210> 101  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 101  
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys  
1 5 10 15  
  
Phe Gln Gly

<210> 102  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 102  
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Lys Thr Lys Tyr Asp Pro Lys  
1 5 10 15  
  
Phe Gln Gly

<210> 103  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 103  
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Leu Thr Lys Tyr Asn Pro Lys  
1 5 10 15  
  
Phe Gln Gly

<210> 104  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 104  
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Pro Lys  
1 5 10 15  
  
Phe Gln Gly

363

93875

364

<210> 105  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 105  
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp Pro Lys  
1 5 10 15  
  
Phe Gln Gly

<210> 106  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 106  
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Tyr Lys Tyr Asp Pro Lys  
1 5 10 15  
  
Phe Gln Gly

<210> 107  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 107  
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Asp Pro Lys  
1 5 10 15  
  
Phe Gln Gly

<210> 108  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 108  
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp His Arg  
1 5 10 15  
  
Phe Gln Gly

365

93875

366

<210> 109  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 109  
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys  
1 5 10 15  
  
Phe Arg Gly

<210> 110  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 110  
Gly Arg Val Asp Pro Ser Asn Gly Asn Thr Lys Ser Asp Gly Lys  
1 5 10 15  
  
Phe Asn Gly

<210> 111  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 111  
Gly Arg Val Asp Pro Val Asp Gly Lys Thr Lys Tyr Asn Pro Gln  
1 5 10 15  
  
Ile Gln Gly

<210> 112  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 112  
Gly Arg Val Asp Pro Ala His Gly Asn Ile Lys Tyr Asp Pro Gln  
1 5 10 15  
  
Ile Met Gly

367

93875

368

<210> 113  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 113  
Val Arg Asp Tyr Tyr Gly His Thr Tyr Gly Phe Ala Phe  
5 10

<210> 114  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 114  
Val Arg Asp Tyr Tyr Gly His Thr Tyr Gly Phe Gln Pro  
5 10

<210> 115  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 115  
Ala Arg Asp Asn Tyr Gly His Thr Tyr Gly Phe Gly Phe  
5 10

<210> 116  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 116  
Val Arg Asp Thr Tyr Gly His Thr Tyr Gly Phe Ala Tyr  
5 10

<210> 117  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 117  
Val Arg Asp Tyr Tyr Gly His Thr Tyr Gly Phe Gly Tyr  
5 10

<210> 118

369

93875

370

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Val Arg Asp Tyr Tyr Gly His Thr Tyr Gly Phe Gly Val  
5 10

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Lys Ala Ser Asp Leu Ile His Asn Trp Leu Ala  
5 10

<210> 120

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr  
5

<210> 121

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr  
5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Phe Thr  
5

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

371

93875

372

<213> Homo sapiens

<400> 123

Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Asp Tyr Ala Trp Asn  
5 10

<210> 124

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu  
1 5 10 15

Lys Ser

<210> 125

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu  
1 5 10 15

Lys Ser

<210> 126

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Gly Tyr Ile Asn Tyr Ala Gly Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu  
1 5 10 15

Lys Ser

<210> 127

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens



373

93875

374

<400> 127

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ala Gly Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu  
1 5 10 15

Lys Ser

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Ala Arg Trp Asp Gly Gly Leu Thr Tyr  
5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Ala Arg Trp Ala Ala Gly Leu Thr Asn  
5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Ala Arg Trp Asp Ala Gly Leu Ser Tyr  
5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Ala Arg Trp Asp Ala Gly Leu Thr Tyr  
5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

375

93875

376

<400> 132  
Ala Arg Trp Glu Ala Gly Leu Asn His  
5

<210> 133  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 133  
Ala Arg Trp Glu Ala Gly Leu Asn Tyr  
5

<210> 134  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 134  
Ala Arg Trp Met Ala Gly Leu Ser Asp  
5

<210> 135  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 135  
Ala Arg Trp Ser Ala Gly Leu Asp His  
5

<210> 136  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 136  
Ala Arg Trp Thr Ala Gly Leu Asp Tyr  
5

<210> 137  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 137  
Ala Arg Trp Thr Ala Gly Leu Thr His  
5

<210> 138  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 138  
Ala Arg Trp Val Ala Gly Leu Thr Asn  
5

<210> 139  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 139  
Ala Arg Trp Ala Gly Gly Leu Glu Asn  
5

<210> 140  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 140  
Ala Arg Trp Asp Gly Gly Leu Ser Tyr  
5

<210> 141  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 141  
Ala Arg Trp Asp Arg Gly Leu Thr Tyr  
5

<210> 142  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 142  
Ala Arg Trp Ala Ser Gly Leu Ser His  
5

<210> 143  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 143  
Ala Arg Trp Ala Ser Gly Leu Ser Asn  
5  
  
<210> 144  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 144  
Ala Arg Trp Ala Ser Gly Leu Ser Tyr  
5  
  
<210> 145  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 145  
Ala Arg Trp Ala Ser Gly Leu Thr His  
5  
  
<210> 146  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 146  
Ala Arg Trp Ala Ser Gly Leu Thr Asn  
5  
  
<210> 147  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 147  
Ala Arg Trp Asp Ser Gly Leu Lys Tyr  
5  
  
<210> 148

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 148  
Ala Arg Trp Asp Ser Gly Leu Asn Tyr  
5

<210> 149  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 149  
Ala Arg Trp Asp Ser Gly Leu Ser Ser  
5

<210> 150  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 150  
Ala Arg Trp Asp Ser Gly Leu Ser Val  
5

<210> 151  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 151  
Ala Arg Trp Asp Ser Gly Leu Ser Tyr  
5

<210> 152  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 152  
Ala Arg Trp Asp Ser Gly Leu Thr Tyr  
5

<210> 153  
<211> 9  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

Ala Arg Trp Glu Ser Gly Leu Ser His  
5

<210> 154

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 154

Ala Arg Trp Glu Ser Gly Leu Ser Val  
5

<210> 155

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 155

Ala Arg Trp Lys Ser Gly Leu Asp Ser  
5

<210> 156

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

Ala Arg Trp Lys Ser Gly Leu Glu Tyr  
5

<210> 157

<211> 9

<212> PRT

<213> Rana catesbeiana

<400> 157

Ala Arg Trp Leu Ser Gly Leu Asp Phe  
5

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 158  
Ala Arg Trp Leu Ser Gly Leu Asp Ser  
5

<210> 159  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 159  
Ala Arg Trp Leu Ser Gly Leu Glu Ser  
5

<210> 160  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 160  
Ala Arg Trp Leu Ser Gly Leu Ser Asp  
5

<210> 161  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 161  
Ala Arg Trp Arg Ser Gly Leu Glu His  
5

<210> 162  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 162  
Ala Arg Trp Ser Ser Gly Leu Asn Tyr  
5

<210> 163  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 163  
Ala Arg Trp Ser Ser Gly Leu Thr Tyr  
5

<210> 164  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 164  
Ala Arg Trp Thr Ser Gly Met Asp Ser  
5

<210> 165  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 165  
Ala Arg Trp Thr Ser Gly Leu Thr Tyr  
5

<210> 166  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 166  
Ala Arg Trp Asp Thr Gly Leu Thr Tyr  
5

<210> 167  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 167  
Ala Arg Trp Ala Ala Gly Leu Asp His  
5

<210> 168  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 168  
Ala Arg Trp Ala Ala Gly Leu Asp Ser  
5

<210> 169



<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 169  
Ala Arg Trp Leu Ala Gly Leu Ser Asn  
5

<210> 170  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 170  
Ala Arg Trp Thr Ala Gly Leu Asp Gln  
5

<210> 171  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 171  
Ala Arg Trp Ala Ser Gly Leu Asp His  
5

<210> 172  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 172  
Ala Arg Trp Ala Ser Gly Leu Asp Asn  
5

<210> 173  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 173  
Ala Arg Trp Ala Ser Gly Leu Asp Ser  
5

<210> 174  
<211> 9  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 174

Ala Arg Trp Ala Ser Gly Leu Asp Tyr  
5

<210> 175

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 175

Ala Arg Trp Lys Ser Gly Leu Asp Thr  
5

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

<213> Rana catesbeiana

<400> 176

Ala Arg Trp Lys Ser Gly Leu Gly Pro  
5

<210> 177

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 177

Ala Arg Trp Met Ser Gly Leu Asp Ser  
5

<210> 178

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 178

Ala Arg Trp Arg Ser Gly Leu Glu Ser  
5

<210> 179

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

393

93875

394

&lt;400&gt; 179

Ala Arg Trp Arg Ser Gly Leu Glu Tyr

5

&lt;210&gt; 180

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 180

Ala Arg Trp Thr Ser Gly Leu Asp Ser

5

&lt;210&gt; 181

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 181

Ala Arg Trp Thr Ser Gly Leu Asp Thr

5

&lt;210&gt; 182

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 182

Ala Arg Trp Thr Ser Gly Leu Asp Val

5

&lt;210&gt; 183

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 183

Ala Arg Trp Thr Ser Gly Leu Asp Tyr

5

&lt;210&gt; 184

&lt;211&gt; 87

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 184

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly

1

5

10

15

395

93875

396

Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
				20						25				30
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Arg
				35						40				45
Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
				50						55				60
Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				65						70				75
Arg	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
				80						85				

&lt;210&gt; 185

&lt;211&gt; 81

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 185

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

&lt;210&gt; 186

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 186

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

397

93875

398

Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala
				20					25				30	
Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp
				35					40				45	
Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser
				50					55				60	
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				65					70				75	
Val	Thr	Val	Ser	Ser										
				80										

&lt;210&gt; 187

&lt;211&gt; 79

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 187

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

&lt;210&gt; 188

&lt;211&gt; 87

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 188

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

399

93875

400

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser  
 20 25 30  
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg  
 35 40 45  
 Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 65 70 75  
 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 80 85

<210> 189  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 189  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro  
 20 25 30  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp  
 35 40 45  
 Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
 50 55 60  
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr  
 65 70 75  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 80

<210> 190  
 <211> 80  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 190  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
 1 5 10 15

401

93875

402

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro  
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp  
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser  
80

<210> 191  
<211> 79  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 191  
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro  
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp  
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 192  
<211> 79  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 192  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
1 5 10 15

403

93875

404

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala  
 20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 35 40 45

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
 50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 193

<211> 79

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 193

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala  
 20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 35 40 45

Asn Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
 50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 194

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 194

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



406

[illegible]

```
<210> 195
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```

<400> 195
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
  1                      5                      10                      15

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
          20                      25                      30

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
          35                      40                      45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
          50                      55                      60

Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
          65                      70                      75

Lys Val Glu Ile Lys
          80

```

```
<210> 196
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 196

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro  
1 5 10 15

408

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

409

93875

410

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

&lt;210&gt; 199

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 199

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

412

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115

<213> Homo sapiens

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
20 25 30

Asn Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
35 40 45

Leu Glu Trp Val Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr  
50 55 60

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser  
65 70 75

Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Ala Ser Gly Leu Ser Tyr  
95 100 105

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115

<213> Homo sapiens

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
20 25 30

413

93875

414

```

Asn Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
      35                      40                      45

Leu Glu Trp Val Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr
      50                      55                      60

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser
      65                      70                      75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
      80                      85                      90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Thr Ser Gly Leu Asp Tyr
      95                      100                     105

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      110                     115

```

&lt;210&gt; 202

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 202

```

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
      20                      25                      30

Asn Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
      35                      40                      45

Leu Glu Trp Val Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr
      50                      55                      60

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser
      65                      70                      75

Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
      80                      85                      90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Ala Gly Leu Thr Tyr
      95                      100                     105

```

415

93875

416

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 110 115

<210> 203  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 203  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
 20 25 30  
 Asn Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 35 40 45  
 Leu Glu Trp Val Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr  
 50 55 60  
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser  
 65 70 75  
 Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 80 85 90  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Ser Gly Leu Thr Tyr  
 95 100 105  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 110 115

<210> 204  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 204  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
 20 25 30  
 Asn Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 35 40 45

417

93875

418

Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Tyr	Ile	Asn	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Thr	Tyr
				50					55					60
Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Lys	Ser	Gly	Leu	Asp	Ser
				95					100					105
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
				110					115					

&lt;210&gt; 205

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 205

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

&lt;210&gt; 206

419

93875

420

<211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 206

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

<210> 207  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 207

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr
				20					25					30
Asn	Asp	Tyr	Ala	Trp	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly
				35					40					45
Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Tyr	Ile	Asn	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Thr	Thr	Tyr
				50					55					60



421

93875

422

Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Ala	Ser	Gly	Leu	Asp	Tyr
				95					100					105
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
				110					115					

&lt;210&gt; 208

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 208

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

&lt;210&gt; 209

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

423

93875

424

&lt;400&gt; 209

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

&lt;210&gt; 210

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 210

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

425

93875

426

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
80 85 90

Tyr Trp Thr Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 211

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 211

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp Leu Ile His  
20 25 30

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

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
80 85 90

Tyr Trp Thr Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
95 100 105

Ile Lys Arg

[illegible]

## Fig. 1B

ACAGAAATAATGTCCTCTAATAGAACACATCCCTGACTCTGATCAGTCCACGATGTCTCCAGACATCATCACTGA  
 AGTGATCACCAGGCTCTCTTCTCATCCATGATGTCAGAAATCAACACAAATGACCATCACCACCCAAAAAAGTTCTC  
 CTGGGGCTACAGCACAGAGTACTCTTACCTTGGCCACAACAACAGCCCCCTTGGCAAGGACCCACTCAACTGTTCCT  
 CTTAGATTTTTACACTCAGAGATGACAACTCTTATGAGTAGGAGTCTGAAAATCCATCATGGAAGAGCTCTCCCTT  
 TGTGGAAAAAAGTACTGCTCTTCTCTCTGTTGTCCTTACCTGTACAGACCTCACCTTCTGTTTCTTCCACATTAC  
 CGCAGAGTATCCCTTCTCTCTTTTTCTGTGACTTCACTCCTCAGCCAGGCATGGTGAAGACTACAGACACAAGC  
 ACAGAACCTGGAACCAAGTTTATCTCCAATCTGAGTGGCACCCTCAGTTGAAATACTGGCTGCCCTCTGAAGTCAACAC  
 AGATACAGAGAAAAATTCATCCTTCTTCAAGCATGGCAGTGACCAATGTGGGAACCAACAGTTCTGGACATGAACATAT  
 ATTCTCTGTGTTTCAATCCACTCGGAGCCATCCAAGGCTACATACCCAGTGGGTACTCCCTCTTCATGGCTGAAACC  
 TCTATTTCCACATCAATGCCTGCTAATTTTGGAGCCACAGGATTTGAGGCTGAGCCATTTTCTCATTTGACTTCTGG  
 ACTTAGGAAGACCAACATGTCCCTGGACACCAGCTCAGTCAACCAACAAATACACCTTCTTCTCCTGGGTCCACTC  
 ACCTTTTACAGAGTTCCAAGACTGATTTTCACTCTTCTGCAAAAACATCATCCCCAGACTGGCCTCCAGCCTCACAG  
 TATACTGAAATTCAGTGGACATAATCAGCCCCCTTAAATGCTTCTCCATCTATTACGGAGTCCACTGGGATAACCTC  
 CTTCCAGAAATCCAGGTTTACTATGTCTGTAAACAGAAAGTACTCATCATCTGAGTACAGATTTGCTGCCCTTCACTG  
 AGACTATTTCCACTGGCACAGTGATGCCTTCTCTATCAGAGGCCATGACTTCAATTTGCCACCACTGGAGTTCCACGA  
 GCCATCTCAGTTTCAAGTAGTCCATTTCTTAGGACAGAGTCAAGCCCTGGGGATGCTACTCTGTCCACCATTTGACGA  
 GAGCCTGCCTTCACTCCACTCCTGTGCCATTTCTTCAACCTTCACTACCACTGATTTTCAACCATCCAGCCCC  
 TCCATGAGATAAATCTCTCTCAGTACCCCATATAGAGTGGACACCAGTCTTGGGACAGAGAGCAGCACTGAA  
 GGACGCTTGGTTATGGTCAGTACTTTGGACACTTCAAGCCAACAGGAGGACATCTTCATCACCCTTTTGGATAC  
 CAGAAATGACAGAGAGCGTTGAGCTGGGAACAGTGACAAGTGCTTATCAAGTTCTTCACTCTCAACACGGTTGACAA  
 GAATCTGAGGATTTATGGAAACATCACAAAAATACCCAAATGAAGCAGCACACAGAGGTACCATAAGACCACTCAAA  
 GGCCCTCAGACATCCACTTGCCTGCCAGTCTTAAAGGACTACACACAGGAGGACAAAAAGAAATGGAGACCAACAC  
 CACAGCTCTGAAGACCACCAACACAGCTCTGAAGACCCTTCCAGAGCCACTTGACCACCACTGTCTATACTCCCA  
 CTTTGGGAACACTGACTCCCTCAATGCATCAATGCAAAATGGCCAGCAAAATCCCAACAGAAATGATGATCACAAAC  
 CCATATGTTTTCCCTGATGTTCCAGAAACGACATCCTCATTTGGCTACCAGCCTGGGAGCAGAAACAGCACAGCTCT  
 TCCCAGGACAAACCATCTGTTTTCAATAGAGAATCAGAGACCACAGCCTCACTGGTCTCTCGTTCTGGGGCAGAGA  
 GAAGTCCGGTTATTTCAAACCTAGATGTTTTCTTCTAGTGAGCCAGATACAACAGCTTATGGGTTATGCCATCCTGCA  
 GAGACCATCCCAACTGTTTTCAAGACAACCCCCAATTTTTTCCACAGTGAATTAGACACTGTATCTTCCACAGCCAC  
 CAGTCTAGGGGACAGAGTCACTGCTCAGCCATTTCAACAAATATCTACCTAGTGAAGTATGACTGACTGACCCCACTGG  
 TCACTATTTTGGGGACAGATACTAGTACAACATTTCCCAACACTGACTAAGTCCCAACATGAACACAGACAAAGAAC  
 ACATGGCTCACTCATCTCTGCAGAGACCAGTCACTATTTCCAGAAACAAATCCCAATTTTTTCTCATCATGAATCAGA  
 TGCCACACCTTCAATAGCCACCAGTCTGGGGCAGAAACAGTTCAGTATTTCAATATGACTGTCTCACTGGGTG  
 CAGAAGATCTGGTGACCTCACAGGTCAGTCTTGGCACAGACAGAAATATGACTATTTCAACTTTGACTCTTTCT  
 CCTGGTGAACCAAGACCATAGCCCTCATTAGTCAACCATCTGAAAGCAGACAGAAAGTCTGGCCATTTCAACTCAAC  
 TATCTGCCTGCTGTATCAGCGTTGGTGACCTCAATGGTCAACAGTTTGGCGGCAAGACAACTAATACTCAGAG  
 CTCTGACAAACTCCCTGGTGAACCACTACAACAGTTTCAATGGTCAACGATTTCTGCACAGACCAGCCCAACAGTT  
 CCCTGGGAAAGAACGAGTTCTGCTATTTCCAACTCAACTGTTTCACTGGGGTACCAGGAGTGGTGACCTCTCTGGT  
 CACTAGTTCTAGGGCAGTACTAGTACAACATTTCAATTTCTGACTTTTTCTCTTGGTGAACCAAGACCAACCTT  
 CAATGGCCACCAGTCATGGGACAGAAGCTGGCTCAGCTGTTTCAACTGTTTTTACCTGAGGTACCAGGAATGGTGACC  
 TCTCTGTTTGTCTAGTTCTAGGGCAGTAACCACTCAACTCTTCCAACTCTGACTCTTTCTCCTGGTGAAACAGAGAC  
 CACACCTTCAATGGCCACCAGTCATGGGGCAGAAGCCAGCTCAACTGTTTCAACTGTTTCACTGAGGTACCAGGAG  
 TGGTGACCTCTCTGGTCACTAGTTCTAGTGGAGTAAACAGTACAAGTATTTCAACTCTGATTTCTTCTCCTGGTGAA  
 CTAGAAACCAACCTTCAATGGCCACCAGTCATGGGGCAGAAGCCAGCTCAGCTGTTTCAACTCCAACCTGTTTCAAC  
 TCTGACTATTTCTTCTGATGAACCAAGACCAACACTTCAATGGTCAACCATTTCTGAGGCAAGATGATTTAGCCA  
 TTCCAACCTTTAGGTGTCTCCCTACTGTACAAGGCTGGTGACTTCACTGGTCACTAGTTCTGGGTGAGAGACCACT  
 GCGTTTTCAATTAAGTGTGCTTCAAGTCAACCAAGAGACCATAGACTCATGGGTGCTCATCTCTGGGACAGAAGC  
 AAGTTCTGTTTCAACTTTGACTGTCTCCACTGGTGAGCCGTTTACAAATATCTCATTTGGTCAACCATCTCTGCAG  
 AGAGTAGCTCAACTCTTCCAGGACAACCTCAAGGTTTTCCACAGTGAATTAGACATATGCCTTCTACAGTCAAC  
 AGTCTGAGGACAGAAATCCAGCTCAGCCATTTCAACAACTATTTCACTGGTATACCAGGTGTGCTGACATCACTGGT  
 CACTAGCTCTGGGAGAGACATCAGTGCACTTTTCCAAACAGTGCCTGAGTCCCCACATGAATCAGAGGCAACAGCCT  
 CATGGGTTACTCATCTGCAGTCAACAGCAACAGTTCCAGGACAACCCCTAATTATTTCTCATAGTGAACCAAGAC  
 ACCACACCATCAATAGCCACCAGTCTGGGGCAGAAGCCACTTCAGATTTTCCAAACAACTGCTCTCACTGTATGT  
 ACCAGATATGGTAACTTCAAGGTCAGTGTCTGGGACAGACACCACTATTAATCTCAACTCTGACTCTTTCTT  
 CTGGTGAGCCAGAGACCACAACCTCATTTTCACTATTTCTGAGACACATACAAGTTCAAGCTTCAAGCTTCTCCCT  
 GTCTCCCTGATGCATCAAGATGCTGACCTCACTGGTCACTAGTTCTGGGACAGACAGCACTACAACCTTTCCCAAC  
 ACTGACGGAGACCCCATATGAACCAAGAGACAACAGCCATACAGCTCATTTCTGAGAGACCAACCAATGGTTT  
 CCAGGACAACCTCCAAGTTTTTCCATAGTAAGTCAAGACCACTCCAGTAGCCATCACCAGTCTGGGCCAGAA

## Φir. 1B

GCCAGTTGAGCTGTTTTCAACGACAACCTATCTCACCTGATATGTGAGATCTGGTGACCTCACTGGTCCCTAGTTCTGG  
 GACAGACACCACTACAACTTCCCAACATTGAGTGAGACCCCATATGAACCAGAGACTACAGCCACGTGGCTCACTC  
 ATCCTGCAGAAACAGCACAAACGGTTTCTGGGACAATTTCCCACTTTTCCCATAGGGGATCAGACACTGCACCCCTCA  
 ATGGTCACCACTCCTGGAGTAGACACGAGGTGAGGTGTTCCAACTACAACTATCCCACTCAGTATACCAAGGGTAGT  
 GACCTCAGAGTCACTAGTTCTGCAACAGACACTAGTACAGCTATTCCAACTTTGACTCCTTCTCCTGGTGAACAG  
 AGACCACAGCCTCATCAGTACCCATCCTGGGACACAGACTGGCTTCACTGTTCCAAATTCGGACTGTTCCCTCTAGT  
 GAGCCAGATACAATGGCTTCTGGGTCACTCATCTCCACAGACCAGCACACCTGTTTCCAGAACAACTCCAGTTT  
 TTCCCATAGTAGTCCAGATGCCACACCTGTAATGGCCACCACTCCTAGGACAGAAGCCAGTTCACTGTACTGACAA  
 CAATCTCACCTGGTGACCAAGAGATGGTGACTTCACAGATCACTAGTTCTGGGCGAGCAACCACTACAACTGTTCCA  
 ACTTTGACTCATTTCTCTGGTATGCCAGAGACCACAGCCTTATTGAGCACCCATCCCAGAACAGAGACAAGTAAAC  
 ATTTCTGCTTCAACTGTGTTTCTCAAGTATCAGAGACCACAGCCTCACTCACCATTAGACCTGGTGCAGAGACTA  
 GCACAGCTCTCCAACTCAGACAACATCTCTCTCTTCACTTCACTTGAAGTGAACCACTGATAGCTAAGT  
 CCAACTGCTTCACTGGTGTCTGCAAAAACAGCCCCACTTTCCACCCATCCAGGGACAGAAACAGCACAAATGAT  
 TCCAACTTCAACTCTTTCCCTTGGTTTACTAGAGACTACAGGCTTACTGGCCACCACTCTTCAAGAGAGACAGCA  
 CGAGTACTCTAACTCTGACTGTTTCCCTGCTGCTCTGCTGGCTTCCAGTGCCTCTATAACAACCTGATAAGCCCCAA  
 ACTGTGACCTCCTGGAACACAGAAACCTCACCATCTGTAACCTCAGTTGGACCCCCAGAAATTTCCAGGACTGTAC  
 AGGCACCACTATGACCTTGATACCATCAGAGATGCCAACACCACTAAACCACTCATGGAGAGAGTGAAGTCCAA  
 CCACTATCTTGAGAACTACAATGGTTGAAGCCACTAATTTAGTACCACAGGTTCCAGTCCCACTGTGGCCAAAGACA  
 ACAACCACTTCAATACACTGGCTGGAAGCCTCTTACTCTCTGACCAACCTGGGATGTCCACCTTGGCTCTGGA  
 GAGTGTGACCTCAAGAACAAAGTTATAACCATCGGTCTCTGGATCTCCACCACTCAGAGTATAAACCCTGGTACTGGA  
 CCCCTGCCACCACTCAGTGAATTTCTACATTTCTCCCCAGGGATTTCCACATCCTCCATCCCCAGCTCCACAGCA  
 GCCACAGTCCCATTCATGGTGCCATTCACCTCACTTCACTCACCACCACTGCAGTACGAGGAGGACATGCGGCA  
 CCTGGTTCAAGGAAGTTCAACGCCACAGAGAGAACTGCAGGGTCTGCTCAAACCTTGTTCAGGAATAGCAGTC  
 TGGAAATACCTCTATTCAGGCTGCAGACTAGCCTCACTCAGGCCAGAGAGGATAGCTCAGCCACGGCAGTGGATGCC  
 ATCTGCACACATCGCCCTGACCTGAAGACCTCGGACTGGACAGAGAGGACTGTACTGGGAGCTGAGCAATCTGAC  
 AATGGCATCCAGGAGCTGGGCCCTTACACCTGGACCGGAACAGTCTCTATGTCAATGGTTTCAACCATCGAAGCT  
 CTATGCCACCAACCACTGCTGGGACCTCCACAGTGTGTTGGAACCTCAGGGACTCCATCTCCAGCCCACTGAGC  
 CCCACGACTGCTGGCCCTCTCTGATGCGCTTCACTTCACTTCACTCACCATCACCACCTGCAGTACGAGGAGGACAT  
 GCGTCGCACTGGCTCCAGGAAGTTCAACACCATGGAGAGTGTCTGCAAGGCTCTGCTCAAGCCATTTGTTCAAGAACA  
 CCAGTGTGGCCCTTTGTACTCTGGCTGCAGATTGACCTTGTCTAGGCCCGAGAAAGATGGGGCAGCCACTGGAGTG  
 GATGCCATCTGCACCACTCGCTTGACCCCAAAAGCCCTGGACTCAACAGGGAGCAGTGTACTGGGAGCTAAGCAA  
 ACTGACCAATGACATTGAAGAGCTGGGCCCTTACACCTGGACAGGAACAGTCTCTATGTCAATGGTTTCAACCAT  
 AGAGCTCTGTGTTCCACCACTGACACTCCTGGGACCTCCACAGTGGATCTCAGAACCTCAGGGACTCCATCTCCCTC  
 TCCAGCCCCACAATTATGGCTGCTGGCCCTCTCTGGTACCATTCACTTCACTTCACTCACCATCACCACCTGCAGTA  
 TGGGAGGAGCATGGGTCACTGGCTCCAGGAAGTTCAACACCACTCAGAGAGGCTCCTGCAGGCTGTGCTTGGTCCCA  
 TATTCAGAAACCACTGTTGGCCCTCTGTACTCTGGCTGCACTGACCTCTCTCAGTCCGAGAGGATGGAGCA  
 GCCACTGGAGTGGATGCCATCTGCATCCATCATCTTGACCCCAAAAGCCCTGGACTCAACAGAGAGCGGCTGTACTG  
 GGAGCTGAGGCAACTGACCAATGGCATCAAAGAGCTGGGCCCTTACACCTGGACAGGAACAGTCTCTATGTCAATG  
 GTTTCACCACTCGGACCTCTGTGCCCACCACTGACCTCTGGGACCTCCACAGTGGACCTTGGAGAGGATGGAGCA  
 CCATTTCTCCCTCCCAAGCCCGCACTGCTGGCCCTCTCTGGTGTGCTTTCACCTCACTTCACTTCACTCACCACCT  
 GAAGTATGAGGAGGACATGCATCGCCCTGGCTCCAGGAAGTTCAACACCACTGAGAGGCTCCTGCAGACCTGGTGTG  
 GTCCTATGTTCAAGAACCACTGTTGGCTTCTGTACTCTGGCTGCAGACTGACCTTGTCTCAGGTCGAGAGGAT  
 GGACAGCCACTGGAGTGGATGCCATCTGCACCACTGCTTGAACCCCAAAAGCCCTGGAGTGGACAGGAGCAGCT  
 ATACTGGGAGCTGAGCAACTGACCAATGGCATCAAAGAGCTGGGCCCTTACACCTGGACAGGAACAGTCTCTATG  
 TCAATGGTTTCAACCATTTGATCCCTGTGCCCACCACTGACCCCTGGGACCTCCACAGTGGACCTTGGGTCAAGG  
 ACTCCATCTCCCTCCCAAGCCCACTGCTACTGCTGGCCCTCTCTGGTGGCTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACT  
 CACCAACCTGAAGTACGAGGAGGACATGCATTGCCCTGGCTCCAGGAAGTTCAACACCACTCAGAGAGTCTCTGAGA  
 GTCTGCTTGGTCCCATGTTCAAGAACCACTGTTGGCCCTCTGTACTCTGGCTGCAGACTGACCTTGTCTCAGGTCC  
 GAGAAGGATGGAGCAGCCACTGGAGTGGATGCCATCTGCACCACTGCTTGAACCCCAAAAGCCCTGGAGTGGACAG  
 GGAGCAGCTATACTGGGAGCTGAGCCAGCTGACCAATGGCATCAAAGAGCTGGGTCCCTACACCTGGACAGAAACA  
 GTCTCTATGTCAATGGTTTCAACCATCAGACCTCTGCGCCCAACCACTGACCTCCTGGGACCTCCACAGTGGACCTT  
 GGGACCTCAGGGACTCCATCTCCCTCCCAAGCCCTACATCTGCTGGCCCTCTCTGGTGGCTTCACTTCACTTCACTT  
 CACCATCACCACCTGCAGTACGAGGAGGACATGCATCACCAGGCTCCAGGAAGTTCAACACCACTGAGGAGCGGCTCC  
 TGCAGGCTGTGCTTGGTCCCATGTTCAAGAACCACTGTCGGCCTTCTGTACTCTGGCTGCAGACTGACCTTGTCT  
 AGGCTGAGAAGAATGGGGCAGCCACTGGAATGGATGCCATCTGCAGCCACCTGTTGACCCCAAAAGCCCTGGACT  
 CAACAGAGAGCAGCTGTACTGGGAGCTGAGCCAGCTGACCCATGGCATCAAAGAGCTGGGCCCTTACACCTGGACA  
 GGAACAGTCTCTATGTCAATGGTTTCAACCATCGGAGCTCTGTGGCCCACTCAGGACTCCTGGGACCTCCACAGTG  
 GACCTTGGGACCTCAGGGACTCCATCTCCCTCCCAAGCCCTACATCTGCTGGCCCTCTCTGGTGGCTTCACTTCACTT  
 CACTTTACCATCACCATCTGCAGTATGGGAGGACATGCGTCACTTGGCTCCAGGAAGTTCAACACCACTGAGAGA  
 GGGTCTGCAAGGCTGTGCTTGGTCCCTTGTCAAGAACCACTGTCGGCCCTCTGTACTCTGGCTGCAGACTGATC  
 TCTCTCAGGCTGTGAGAAGGATGGGGCAGCCACTGGAGTGGATGCCATCTGCACCACTGACCAATGGCATCAAAGAGCTGGGCCCTTACACCT  
 TGGACTGGACAGGGAGCAGCTGTACTGGCAGCTGAGCCAGATGACCAATGGCATCAAAGAGCTGGGCCCTTACACCT  
 TGGACCGGAACAGTCTCTACGTCAATGGTTTCACTTCACTCGGAGCTCTGGGCTCACCACCACTCCTTGGACTTCC  
 ACAGTTGACCTTGAACCTCAGGGACTCCATCCCCGTCCCAAGCCCACTGCTGGCCCTCTCTGGTGGCTTCC

## Φir. 1Γ

CACCCTAAACTTCACCATCACCAACCTGCAGTATGAGGAGACATGCATCGCCCTGGATCTAGGAAGTTCAACGCCA  
 CAGAGAGGGTCTGCAGGGTCTGCTTAGTCCCATTATCAAGAACTCCAGTGTGGCCCTCTGTACTCTGGCTGCAGA  
 CTGACCTCTCTCAGGCCCCGAGAAGGATGGGGCAGCAACTGGAATGGATGCTGTCTGCCCTTACCACCCTAATCCCAA  
 AAGACCTGGGCTGGACAGAGAGCAGCTGTACTGGAGCTAAGCCAGCTGACCCACAACATCACTGAGCTGGGCCCCCT  
 ACAGCCTGGACAGGGACAGTCTCTATGTCAATGGTTTACCCATCAGAACTCTGTGCCACCACCAGTACTCTGGG  
 ACCTCCACAGTGTACTGGGCAACCACTGGGACTCCATCCTCTCCCGGCCACACAGAGCCTGGCCCTCTCTGTAT  
 ACCATTCACTTTCAACTTTACCATCACCAACCTGCATTATGAGGAAAACATGCAACACCCCTGGTTCCAGGAAGTTCA  
 ACACCACGGAGAGGGTTCTGCAGGGTCTGCTCAAGCCCTTGTTCAGAAACACCACTGTGGCCCTCTGTACTCTGGC  
 TGCAGACTGACCTTGCTCAGACCTGAGAAGCAGGAGGCCAGCCACTGGAGTGGACACCATCTGTACCCACCGCTTGA  
 TCCCATCGGACCTGGACTGGACAGAGAGCGGCTATACTGGGAGCTGAGCCAGCTGACCAACAGCATCACAGAGCTGG  
 GACCCCTACACCTGGATAGGGACAGTCTCTATGTCAATGGCTTCAACCCCTGGAGCTCTGTGCCAACACACAGCACT  
 CCTGGGACCTCCACAGTGCACCTGGCAACCTCTGGGACTCCATCCTCCCTGCCCTGGCCACACAGCCCTGTCCCTCT  
 CTTGATACCACTTACCCCTCAACTTTACCATCACCAACCTGCATTATGAAGAAAACATGCAACACCCCTGGTTCCAGGA  
 AGTTCAACACACCGGAGAGGGTTCTGCAGGGTCTGCTCAGCCCTTGTTCAGAGCACCAGCGTTGGCCCTCTGTAT  
 TCTGGCTGCAGACTGACCTTGCTCAGACCTGAGAAACATGGGGCAGCCACTGGAGTGGACGCCATCTGCACCTCCG  
 CCTTGATCCCCTGGTCTGGACTGGACAGAGAGCGGCTATACTGGGAGCTGAGCCAGCTGACCAACAGCGTTACAG  
 AGCTGGGCCCTTACACCTGGACAGGGACAGTCTCTATGTCAATGGCTTCAACCATCGGAGCTGTGTGCCAACCAAC  
 AGTATTCTGGGACCTCTGCAGTGCACCTGGAAACCTCTGGGACTCCAGCCTCCCTCCCTGGCCACACAGCCCTGG  
 CCCTCTCTCTGGTGCATTCACCCCTCAACTTCACTATCACCAACCTGCAGTATGAGGAGGACATGCGTACCCCTGGTT  
 CCAGGAAGTTCAACACACCGGAGAGAGTCTGCTCAGGGTCTGCTCAAGCCCTTGTTCAGAGCACCAGTGTGGCCCT  
 CTGTACTCTGGCTGCAGACTGACCTTGCTCAGGCCGAAAAACGTGGGGCAGCCACCGGCTGGACACCATCTGCAC  
 TCACCGCCTTGACCCCTTAAACCTGGACTGGACAGAGAGCAGTATACTGGGAGCTGAGCAACTGACCCCTGGCA  
 TCATCGAGCTGGGCCCTTACCTCTGGACAGAGGAGTCTCTATGTCAATGGTTTACCCATCGGAACCTTTGTGCC  
 ATCACAGCACTCTGGGACCTCCACAGTACACCTAGGAACCTTGAAACTCCATCCTCCCTACCTAGACCCATAGT  
 GCTTGGCCCTCTCTGGTGCATTCACCCCTCAACTTCACTATCACCAACCTGCAGTATGAGGAGGCCATGCGACACC  
 CTGGCTCCAGGAAGTTCAATACACCGGAGAGGGTCTTACAGGGTCTGCTCAGGCCCTTGTTCAGAAATACAGTATC  
 GGCCCTCTGTACTCCAGCTGCAGACTGACCTTGCTCAGGCCAGAGAAGGACAAGGCAGCCACAGAGTGGATGCCAT  
 CTGTACCCACCACCTGACCTCAAAGCCCTGGACTGAACAGAGAGCAGCTGTACTGGGAGCTGAGCCAGCTGACCC  
 ACGGCATCACTGAGCTGGGCCCTTACACCTGGACAGGGACAGTCTCTATGTGATGGTTTCACTCATTTGGAGCCCC  
 ATACCAACACCCAGCACTCTGGGACCTCCATAGTGAACCTGGGAACCTCTGGGATCCACCTTCCCTGCTGAAAC  
 TACAGCCACCGGCCCTCTCTGGTGCATTCACACTCAACTTCACTATCACTAACCTACAGTATGAGGAGAACATGG  
 GTCACCCCTGGCTCCAGGAAGTTCAACATCACGGAGAGTGTCTGCAGGGTCTGCTCAAGCCCTTGTTCAGAGCACC  
 AGTGTGGCCCTCTGTATTCTGGCTGCAGACTGACCTTGCTCAGGCCTGAGAAGGACGAGTAGCCACACAGAGTGA  
 CGCCATCTGCACCCACCGCCCTGACCCCAAAATCCTGGGCTAGACAGACAGCAGTATACTGGGAGCTGAGCGAGC  
 TGACCCACAGCATCACTGAGCTGGGACCTTACACCTGGATAGGGACAGTCTCTATGTCAATGGTTTACCCAGCGG  
 AGCTCTGTGCCACACACAGCACTCTGGGACTTTCACAGTACAGCCGAAACCTCTGAGACTCCATCATCCTCTCC  
 AGTGGATGCTGTCTGCACCCATCGTCTGACCCCAAAAGCCCTGGACTGGACAGAGAGCGGCTGTACTGGAAGAGG  
 ACATGATCGCCCTGGCTCCAGGAAGTTCAACACACGAGAGAGGGTCTTCAAGGCTGCTTATGCCCTTGTCAAG  
 AACACAGTGTCACTCTCTGTACTCTGGTTGCAGACTGACCTTGCTCAGGCCCTGAGAAGGATGGGGCAGCCACAG  
 AGTGGATGCTGTCTGCACCCATCGTCTGACCCCAAAAGCCCTGGACTGGACAGAGAGCGGCTGTACTGGAAGAGG  
 GCCAGCTGACCCACGGCATCACTGAGCTGGGCCCTTACACCTGGACAGGCACAGTCTCTATGTCAATGGTTTCAAC  
 CATCAGAGCTCTATGACGACCACGAGAACCTCTGATACCTCCACAATGCACCTGGCAACCTCGAGAATCCAGCCTC  
 CCTGTCTGGACCTACGACCGCCAGCCCTCTCTGGTGCTATTCACAATTAACCTTACCATCACTAACCTGCGGTATG  
 AGGAGAACATGCATCACCCCTGGCTCTAGAAAGTTTAAACACACGGAGAGAGTCTTCAAGGCTCTGCTCAGGCCCTG  
 TTCAAGAACACAGTGTGGCCCTCTGTACTCTGGCTGCAGACTGACCTTGCTCAGGCCCAAGAGGATGGGGCAGC  
 CACCAAGTGGATGCCATCTGCACCTACCGCCCTGATCCCAAAAGCCCTGGACTGGACAGAGAGCAGTATACTGGG  
 AGCTGAGCCAGCTAACCCACAGCATCACTGAGCTGGGCCCTTACACCTGGACAGGGACAGTCTCTATGTCAATGGT  
 TTCACACAGCGGAGCTCTGTGCCACCACCTAGCACTTCTGGGACCCCAAGTGGACCTGGGAACATCTGGGACTCC  
 AGTTTCTAAACCTGGTCCCTCGGCTGCAGCCCTCTCTGGTGCTATTCACAATTAACCTTACCATCACTAACCTGCGGTATG  
 GGTATGAGGAGAACATGCAGACCCCTGGCTCCAGGAAGTTCAACACACGGAGAGGGTCTTCAAGGCTGCTCAGG  
 TCCCTGTTCAAGAGCACCAGTGTGGCCCTCTGTACTCTGGCTGCAGACTGACTTGTCTCAGGCCCTGAAAAGGATGG  
 GACAGCCACTGGAGTGGATGCCATCTGCACCCACACCTGACCCCAAAAGCCCTAGGCTGGACAGAGAGCAGCTGT  
 ATTGGGAGCTGAGCCAGCTGACCCACAATATCACTGAGCTGGGCCCTTATGCCCTGGACAACGACAGGCTCTTGTG  
 AATGGTTTCACTCATCGAGCTCTGTGTCCACCACAGCACTCTGGGACCCCAAGTGTATCTGGGAGCATCTAA  
 GACTCCAGCCTCGATATTGGGCCCTTCACTGCCAGCCATCTCTGATACTATTACCCCTCAACTTACCATCACTA  
 ACCTGCGGTATGAGGAGAACATGTGGCCTGGCTCCAGGAAGTTCAACACTACAGAGAGGGTCTTCAAGGCTGCTA  
 AGGCCCTTGTTCAGAACACAGTGTGGCCCTCTGTACTCTGGCTGCAGGCTGACCTTGCTCAGGCCAGAGAAAGA  
 TGGGGAAGCCACCGGAGTGGATGCCATCTGCACCCACCGCCCTGACCCCAAGGCCCTGGGCTGGACAGAGAGCAGC  
 TGTATTGGAGCTGAGCCAGCTGACCCACAGCATCACTGAGCTGGGCCCTTACACTGGACAGGACAGTCTCTAT  
 GTCAATGGTTTACCCATCGGAGCTCTGTATCCACACACAGCAGCCGGGTGGTCAGCGAGGAGCCATTCACTGAA  
 CTTACCATCAACAACCTGCGCTACATGGCGGACATGGGCCAACCCGGCTCCCTCAAGTTCAACATCACAGACAACG  
 TCATGACGACCTGTCTAGTCTTTGTTCCAGAGGAGCAGCTGGGTGCACGGTACACAGGCTGACGGGTCTATCGCA  
 CTAAGGTCTGTGAAGAACGGTGTGAGACAGGGTGGACCTCTCTGCACCTACCTGCAGCCCTCAGCGGCCAGG  
 TCTGCCTATCAAGCAGGTGTTCCATGAGCTGAGCCAGCAGACCATGGCATCACCCGGCTGGGCCCTACTCTCTGG

## Фиг. 1Д

ACAAAGACAGCCTCTACCTTAACGGTTACAATGAACCTGGTCCAGATGAGCCTCCTACAACCTCCCAAGCCAGCCACC  
ACATTCCTGCCTCCTCTGTGAGAGCCACAACAGCCATGGGGTACCACCTGAAGACCTCACACTCAACTTCACCAT  
CTCCAATCTCCAGTATTCACCAGATATGGGCAAGGGCTCAGCTACATTCAACTCCACCGAGGGGGTCTTCAGCACC  
TGCTCAGACCCCTGTTCCAGAAGAGCAGCATGGGCCCCCTTCTACTTGGGTTGCCAACTGATCTCCCTCAGGCCTGAG  
AAGGATGGGGCAGCCACTGGTGTGGACACCACCTGCACCTACCACCTGACCTGTGGGCCCCGGGCTGGACATACA  
GCAGCTTACTGGGAGCTGAGTCAGCTGACCCATGGTGTCAACCACTGGGCTTCTATGTCTGGACAGGGATAGCC  
TCTTCATCAATGGCTATGCACCCAGAATTTATCAATCCGGGGCGAGTACCAGATAAATTTCCACATTGTCAACTGG  
AACCTCAGTAATCCAGACCCACATCCTCAGAGTACATCACCTGCTGAGGGACATCCAGGACAAGGTCACCACACT  
CTACAAGGCAGTCAACTACATGACACATTCCGCTTCTGCCTGGTCACCAACTTGACGATGGACTCCGTGTTGGTCA  
CTGTCAAGGCATTGTTCTCCTCCAATTTGGACCCAGCCTGGTGGAGCAAGTCTTTCTAGATAAGACCCTGAATGCC  
TCATTCATTGGCTGGGCTCCACCTACCAGTTGGTGGACATCCATGTGACAGAAATGGAGTCATCAGTTTATCAACC  
AACAAGCAGCTCCAGCACCCAGCACTTCTACCTGAATTTACCATCACCAACCTACCATATTTCCAGGACAAAGCCC  
AGCCAGGCACCACCAATTACCAGAGGAACAAAAGGAATATGAGGATGCGCTCAACCAACTCTTCCGAAACAGCAGC  
ATCAAGAGTTATTTTTCTGACTGTCAAGTTTCAACATTCAAGTCTGTCCCCAACAGGCACCACACCGGGGTGGACTC  
CCTGTGTAACCTCTCGCCACTGGCTCGGAGAGTAGACAGAGTTGCCATCTATGAGGAATTTCTGCGGATGACCCGGA  
ATGGTACCCAGCTGCAGAACTTCAACCTGGACAGGAGCAGTGTCTTGTGGATGGGTATTCTCCCAACAGAAATGAG  
CCCTTAACCTGGGAATTTGACCTTCCCTTCTGGGCTGTCTATCCTCATCGGCTTGGCAGGACTCCTGGGACTCATCAC  
ATGCCTGATCTGCGGTGTCTGGTGACACCCCGCGGGAAGAAGGAAGGAGAATACAACGTCCAGCAACAGTGCC  
CAGGCTACTACCAGTCACACCTAGACCTGGAGGATCTGCAATGACTGGAACTTGCCGGTGCCTGGGGTGCCTTTCCC  
CCAGCCAGGGTCCAAAGAAGCTTGGCTGGGGCAGAAATAAACCATATTGGTCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAA



## Φir. 2A

PVTSLTTPGLVITTRDMGISREPGTSSTSNLSSTSHERLTTLEDTVDTTEAMQPSTHTAVTNVRTSISGHESQSSVLS  
 DSETPKATSPMGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRQIEPTSSLTSGLRETSSSERISSATEGSTVLSEVPSPGATTEV  
 SRTEVSSRGTSMSPGPDQFTISPDISTEAITRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGATSEGLTLDSTTTFWSGTHS  
 TASPFGSHSEMTTLMSTRTPGDVPWPSLPSVVEEASSVSSSLSPAMTSTSTFFSTLPESISSSPHEVTALLTLGPVKTT  
 DMLRTSSEPETSSPPNLSSTSAEILATSEVTKDREKIHPPSSNTPVVNVGTVIYKHLSPSSVLADLVTTKPTSPMATT  
 STLGNSTSVSTSTPAFPETMMTQPTSSLTSGLEISTSQETSSATERSASLSGMTGATTKVSRTEALSLGRTSTPGP  
 AQSTISPEISTETITRISTPLTTTGAEMTITPKTGHSGASSQGTFTLDTSSRASWPGTHSAATHRSPhSGMTTPMS  
 RGFEDVSWSPRSPVEKTSPPSSVLVSLAVTSPSPLYSTPSESSHSSPLRVTSLFTPVMKTTDMLDTSLEPVTTSPP  
 SMNITDESLSATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTISARQEFYSSYPGLPEPSKVTSPPVTSSTIKDVLSTTIPASS  
 EITRIEMESTSTLPTPRETSTSQEIHSAKTPSTVPYKALTSATIEDSMTQVMSSSRGSPSDQSTMSQDISTEVITR  
 LSTSPIKTESTEMTITTTQGTSPGATSRGTLTLDSTTFMSGTHSTASQGFSHSQMTALMSRTPGEVFWLSHPSSVEEA  
 SSASFSLSSPVMTSSSPVSTLPLDSIHSSSLPVTSLLTSGLVKTELLGTSSEFETSSPPNLSSTSAEILATEVT  
 DTEKLEMTNVVTSYGTSHESPSSVLADSVTTKATSSMGITYPTGDTNVLTSTPAFSDTSRIQTKSKLSLTPGLMETSI  
 SEETSSATEKSTVLSSVPTGATTEVSRTEAIISSRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRKESTDMAITPKTG  
 PSGATSQGTFTLDDSSSTASWPGTHSATTQRFPRSVVTPMSRGPEDVSWSPSPLSVEKNSPPSSVLSSSVTSPPSPLY  
 STPSSGSHSSPVVPTSLFTSMMKATDMLDASLEPETTSAPNMNITSDESLSAASKATTETEAHVFENTTAASHVETT  
 SATEELYSSSPGSEPTKVISPVVTSSSIRDNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPGLRETRTSQDITSSSTETSTV  
 LYKMPSPGATPEVSRTEVMPSSRTSIPGPAQSTMSLDISDEVVTRLSTSPIMTESAEITITTTQGYSLATSQVTLPLG  
 TSMTFLSGTHSTMSQGLSHSEMTNLMRGPESLWTSRPFVETTRSSSSLTSLPLTSLSPVSSLTLLDSSPSSPLPV  
 TSLILPGLVKTEVLDTSSEPKTSSPNLSSTVEIPATSEIMTDEKIHPPSSNTAVAKVRTSSSVHESHSSVLADS  
 ETTITIPSMGITSAVEDTTVFTSNPAFSETRRIPEPTFSLTPGFRSTSEETTSITETSALVFGVPTSATTEVSM  
 TEIMSSNRTHIPDSQSTMSPDII TEVITRLSSSSMMSESTQMTITTKSSPGATAQSTLTLLATTTAPLARHSTVP  
 PRFLHSEMTTLMRSRPENPSWKSSPFVEKTSSSSSLLSLPVTTSPSVSSTLPQSIPISSSSFSVTSLLTPGMVKTTDTS  
 TEPGTSLSPNLSGTSEVILAASEVTTDEKIHPPSSMAVTNVGTTSSGHELYSSVSIHSEPSKATYPVGTSPSSMAET  
 SISTMNPANFETTGFEAEFPFSLTSGLRKTNMSLDTSSVTPNTPPSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSSPDWPPASQ  
 YTEIPVDIIPTFNASPSITESTGITSFPESTRFTMSVTESTHLLSTDLLPSAETISTGTVMPSLSEAMTSFATTGVPR  
 AISGSGSPFRSTESGPGDALTSTIAESLPSSTPVFSSSTFTTDSSTIPALHEITSSSATPYRVDTSLGTESSTTE  
 GRLVMVSTLDTSSQPGRTSSSPILDTRMTESVELGTVTSAYQVPSLSTRLTRDIMEHITKIPNEAAHRTIRPVK  
 GPQTSSTSPASPKGLHTGGTKRMETTTTALKTTTALKTTSRATLTTSVYTPTLGLTLPNLSMOMQMASTIPTEMMIT  
 PYVFPDVPETSSSLATSLGAETSTALPRTTSPSVFNRESETTASLVSRSGAERSPVIOQLDVSSEPTTASWVIHPA  
 ETIPTVSKTTPNFFHSELDTVSSTATSHGADVSSAIPTNISPELDAITPLVTISGDTSTTFTPLTKSPHETETRT  
 TWLTHPAETSTTIPRTIPNFSSHESDATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVTSQVTSSTGDRNMTIPTLTL  
 GPETKTIASLVTHPEAQTSIAIPTSTISPAVSRLVTSMTVSLAAKTSTNRLTNSPGEPTTVSLVTHSAQTSPTV  
 PWTTSIFFHKSDDTTPSMTSHGAESSAVPTPTVSTEVPGVVTPLVTSRRAVISTTIPILTLSPGEPETTPSMATS  
 HGEEASSAIPPTVSPGVPGVVTSVLTSSRAVSTTIPILTLFSGEPETTPSMATSHGTEAGSAVPTVLPVPGMVT  
 SLVASSRAVSTTTLPTLTLSPGEPETTPSMATSHGAESSAVPTVSPVPGVVTSVLTSSSGVNSTSIPTLILSPGE  
 LETTPSMATSHGAESSAVPTPTVSPGVGVVTPLVTSRAVSTTIPILTLSSPEPETTPSMATSHGVEASSAVLT  
 VSPVPGMVTFLVTSRAVSTTIPTLTSSDEPETTTSLVTHSEAKMISAIPTLGVSPVQGLVTSVLTSSGSETS  
 AFSNLTVAASSQPETIDSWVAHPGTEASSVPTLTVSTGEFFTNISLVTHPAESSSTLPRTTSRFSHSELDTMPSTVT  
 SPEAESSAISTTISPGIPGVLTSLVTSRGDISATFPTVPESPHSEATASWVTHPAVTSTVPRTPPNYSHSEPD  
 TTPSIATSPGAETSDFTITVSPDVDPMTVSQVTSSTGDTSTIPTLTLSSGEPETTTSTFTYSETHSSAIPTL  
 VSPDASKMLTSLVSSSGTDTSTTFTPLTETPYEPETTAIQLIHPAETNTMVRPTPKFSSHKSDDTLTPVAITSPPGE  
 ASSAVSTTTISPDMSDLVTSVLPSSGDTSTTFTPLSETPYEPETTATWLTHPAETSTTVSGTIIPNFHSHRGSDTAPS  
 MVTSPGVDRSGVPTTTIPPSIPGVVTSQVTSSTADTSTAIPTLTPSPGEPETTASSATHPGTGTGTVPIRTVPSS  
 EPDTMASWVTHPPQTSTPVSRTTSSFSHSSPDATPVMTSPRTEASSAVLTISPAGPEMVTSQITSSGAATSTTV  
 TLTTHSPGMPETTALLSTHPRTESTKTFPASTVFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTSSSLFTLLVTGTSRVDS  
 PTASPGVSAKTAPLSTHPTETSTMIPTSTLSLGLLETGLLATSSSAETSTSTLTTLTVSPAVSGLSSASITDKPK  
 TVTSWNTETSPSVTSVGPEFSRTVTGTTMTLIPSEMPTPPKTSHGEGVSPPTILRTMVEATNLATGSSPTVAKT  
 TTTFTNLAGSLFTPLTTPGMSTLASESVTSRTSYNHRWSITSSSYNRRYWTATSTPVTSTFSPGISTSSIPSSSTA  
 ATVPFMPVFTLNFTITNLQYEDMRHPGSRKFNATERELQGLLKPLFRNSSLEYLYSGCRLASLRPEKDSSATAVDA  
 ICTHRDPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPS  
 PTTAGPLLMFPTLNFTITNLQYEDMRRTGSRKFNMTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLRPEKDGAATGV  
 DAICTHRLDPKSPGLNREQLYWELSKLTNDIEELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSSVSTSTPGTSTVDLRTSGTPSSL  
 SSPTIMAAGPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMGHPGSRKFNTERVLQGLLGPIFKNTSVGPLYSGCRLTLRSEKDGA  
 ATGVDAICIHHLDPKSPGLNRERLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRTSVPTTSTPGTSTVDLGTSGT  
 PFSLPSPATAGPLLVLFTLNFTITNLQYEDMRHPGSRKFNTERVLQTLVGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLRSEKD  
 GAATGVDAICTHRLDPKSPGVDRQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHWIPVPTSSSTPGTSTVDLGSG  
 TPSSLPSPSTAGPLLVPFTLNFTITNLQYEDMHCPGSRKFNTERVLQSLGPMFKNTSVGPLYSGCRLTLRSL  
 EKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDRQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHQTSAPNTSTPGTSTVDL  
 GTSGTPSSLPSPSTAGPLLVPFTLNFTITNLQYEDMHCPGSRKFNTERVLQGLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLR  
 RPEKNGAATGVDAICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTHGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSVAPTSTPGTSTV  
 DLGTSGTPSSLPSPSTAVPLLVPFTLNFTITNLQYEDMRHPGSRKFNTERVLQGLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLI  
 SLRSEKDGAATGVDAICTHHLNPQSPGLDREQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSGLTTSTPWT

## Фир. 2Б

TVDLGTSGETSPSPVPTTAGPLLVPFTLNFTITNLQYEEEDMHRPGSRKFNATERVLQGLLSPIFKNSSVGPPLYSGCR  
 LTLRLPEKDGAAATGMDAVCLYHPNPKRPGLDREQLYWELSQLTHNITELGPYSLDRDSLYVNGFTHQNSVPTTSTPG  
 TSTVYWATTGTPSSFPGHTEPGPLLPFTNFNTITNLHYEENMQHPGSRKFNTERVLQGLLKPLFKNTSVGPPLYSG  
 CRLTLRLPEKQEAATGVDITCTHRVDPIGPGLDREQLYWELSQLTNSITELGPYTLDRDSLYVNGFNPWSSVPTTST  
 PGTSTVHLATSGTPSSLPGHATAPVPLLPFTLNFTITNLHYEENMQHPGSRKFNTERVLQGLLKPLFKNTSVGPPLY  
 SGCRLTLLRPEKHGAATGVDAICTLRDPTGPGLDREQLYWELSQLTNSVTELGPYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTT  
 SIPGTSVAHLETSGTPASLPGHATAPGPLLVPFTLNFTITNLQYEEEDMHRPGSRKFNTERVLQGLLKPLFKNTSVGP  
 LYSGCRLTLRLPEKGAATGVDITCTHRDPLNPGLDREQLYWELSKLTRGIIELGPYLLDRGSLYVNGFTHRNFPV  
 ITSTPGTSTVHLGTSETPSSLPPIVPGLLPFTLNFTITNLQYEEAMRHPGSRKFNTERVLQGLLRPLFKNTSI  
 GPLYSSCRLTLRLPEKDKAATRVDAICTHHPDPQSPGLNREQLYWELSQLTHGITELGPYTLDRDSLYVDGFTHWSP  
 IPTTSTPGTSIVNLGTSGIPPSLPETTATGPLLVPFTLNFTITNLQYEEENMGHPGSRKFNITESVQLGLLKPLFKST  
 SVGPPLYSGCRLTLRLPEKDGAVATRVDAICTHRDPKIPGLDRQQLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTQR  
 SSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGPPTATGPVLLPFTLNFTIINLQYEEEDMHRPGSRKFNTERVLQGLMLPLFK  
 NTSVSSLYSGCRLTLRLPEKDGAAATRVDAVCTHRDPKSPGLDRERLYWKLSQLTHGITELGPYTLDRHSLYVNGFT  
 HQSSMTTTRTPDTSTMHLSRTASLSGPTTASPLLVFTINFTITNLRYEENMHHPGSRKFNTERVLQGLLRPV  
 FKNTSVGPPLYSGCRLTLRLPKKDGAAATKVDICTYRPDPKSPGLDRQQLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNG  
 FTQRSSVPTTIPGTPTVDLGTSGTPVSKPGPSAASPLLVFTLNFTITNLRYEENMQHPGSRKFNTERVLQGLLR  
 SLFKSTSVGPPLYSGCRLTLRLPEKDGATGVDAICTHHPDPKSPRLDRQQLYWELSQLTHNITELGPYALDNDLSLV  
 NGFTHRSSVPTTSTPGTPTVYLGAKTASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMWPGSRKFNTERVLQGLL  
 RPLFKNTSVGPPLYSGCRLTLRLPEKDGATGVDAICTHRDPDTPGGLDRQQLYELSQLTHSITELGPYTLDRDSLY  
 VNGFTHRSSVPTTSTGTVSEEPFTLNFTINNLRYMADMQPGSLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTGCRVIA  
 LRSVKNGAETRVDDLCTYLQPLSGPLPIKQVFHELSQLTHGITRGLPYSLDKDSLYLNGYNEPGPDEPPTPKPAT  
 TELPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNLQYSPDMGKGSATFNSTEGVLQHLLRPLFQKSSMGPFYLGQCQLISLRPE  
 KDGAAATGVDITCTYHDPDPVPGGLDIQQLYWELSQLTHGVTQLGFYVLDLDRDSLFIINGYAPQNLISIRGEYQINFHIVNW  
 NLSNPPTSSYITLLRDIQDKVTTLTKGSQLHDTFRFCLVTNLTMDSVLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNA  
 SFHWLGSYQLVDIHVTEMESSVYQPTSSSSTQHFIYLNFTITNLPYSQDKAQPGTTNYQRNKRNIEDALNQLFRNSS  
 IKSIFYSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDLSLNFSPPLARRVDRAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLDGYSPPNRNE  
 PLTGNNDLPFWAVILIGLAGLLGLITCLICGVLVTRRRKKEGEYNVQQQCPGYQQSHLDLEDLQ

Послідовності муцинового повтору:  
 амінокислоти 3765-6397

## Фир. 3

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
huKI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
mul1D10-L	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	L	G	E	R	V	T	M	T	C
11D10-graft	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C

Kabat#	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
huKI	R	A	S	Q							S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P
mul1D10-L	T	A	S	S	S						V	S	S	S	Y	L	H	W	Y	Q	Q	K	P
11D10-graft	T	A	S	S	S						V	S	S	S	Y	L	H	W	Y	Q	Q	K	P

Kabat#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
huKI	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S
mul1D10-L	G	S	S	P	K	L	W	I	Y	S	T	S	N	L	A	S	G	V	P	G	R	F	S
11D10-graft	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	T	S	N	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S

Kabat#	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
huKI	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
mul1D10-L	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	M	E	A	E	D	A	A	T	Y
11D10-graft	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y

Kabat#	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	
huKI	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:3)
mul1D10-L	Y	C	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:4)
11D10-graft	Y	C	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:5)

## Dir 4

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
mu11D10-H	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	T	A	S
11D10-graft	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S

Kabat#	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
hum III	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S		W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S
mu11D10-H	G	F	N	I	K	D	T	Y	M	H		W	V	K	Q	R	P	E	Q	G	L	E	W	I	G
11D10-graft	G	F	N	I	K	D	T	Y	M	H		W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G

Kabat#	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
hum III	V	I	S	G			D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R
mu11D10-H	R	V	D	P			A	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	K	A	T	L	T	A
11D10-graft	R	V	D	P			A	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	R	F	T	I	S	A

Kabat#	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93
hum III	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
mu11D10-H	D	T	S	S	N	T	A	Y	L	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	F	C	V
11D10-graft	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	V

Kabat#	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	
hum III	R	G											F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S (SEQ
ID NO:6)																										
mu11D10-H	R	D	Y	Y	G	H	T	Y	G				F	A	F	C	D	Q	G	T	T	L	T	V	S	A (SEQ
ID NO:7)																										
11D10-graft	R	D	Y	Y	G	H	T	Y	G				F	A	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S (SEQ
ID NO:8)																										

## Dir 5

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
huKI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
mu3A5-L	D	I	Q	M	T	Q	S	S	S	F	L	S	V	S	L	G	G	R	V	T	I	T	C
3A5-graft	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C

Kabat#	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
huKI	R	A	S	Q							S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P
mu3A5-L	K	A	S	D	L						I	H	N	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	
3A5-graft	K	A	S	D	L						I	H	N	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	

Kabat#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
huKI	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S
mu3A5-L	G	N	A	P	R	L	L	I	S	G	A	T	S	L	E	T	G	V	P	S	R	F	S
3A5-graft	G	K	A	P	K	L	L	I	S	G	A	T	S	L	E	T	G	V	P	S	R	F	S

Kabat#	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
huKI	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
mu3A5-L	G	S	G	S	G	N	D	Y	T	L	S	I	A	S	L	Q	T	E	D	A	A	T	Y
3A5-graft	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y

Kabat#	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
huKI	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R (SEQ ID NO:3)
mu3A5-L	Y	C	Q	Q	Y	W	T	T	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K	(SEQ ID NO:9)
3A5-graft	Y	C	Q	Q	Y	W	T	T	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R (SEQ ID NO:10)

443

93875

444

## Φir. 6A

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
mu3A5-H	D	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	N	P	S	Q	S	L	S	L	T	C	T	V	T
3A5.L-graft	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
3A5.F-graft	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
Kabat#	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
hum III	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S		W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S
mu3A5-H	G	Y	S	I	T	N	D	Y	A	W	N	W	I	R	Q	F	P	G	N	K	L	E	W	M	G
3A5.L-graft	G	Y	S	I	T	N	D	Y	A	W	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G
3A5.F-graft	G	Y	S	I	T	N	D	Y	A	W	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G
Kabat#	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
hum III	V	I	S	G			D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R
mu3A5-H	Y	I	N	Y				S	G	Y	T	T	Y	N	P	S	L	K	S	R	I	S	I	T	R
3A5.L-graft	Y	I	N	Y				S	G	Y	T	T	Y	N	P	S	L	K	S	R	F	T	I	S	R
3A5.F-graft	Y	I	N	Y				S	G	Y	T	T	Y	N	P	S	L	K	S	R	F	T	I	S	R
Kabat#	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93
hum III	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	V	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
mu3A5-H	D	T	S	K	N	T	F	L	H	L	N	S	V	T	T	E	D	T	A	T	Y	Y	C	A	A
3A5.L-graft	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
3A5.F-graft	D	N	S	K	N	T	F	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A

## Φir. 6B

Kabat#	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
hum III	R	G										F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S (SEQ
ID NO:6)																									
mu3A5-H	R	W	D	G	G							L	T	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A (SEQ
ID NO:11)																									
3A5.L-graft	R	W	D	G	G							L	T	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S (SEQ
ID NO:12)																									
3A5.F-graft	R	W	D	G	G							L	T	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S (SEQ
ID NO:13)																									

## Φir. 7

Kabat#	24	25	26	27	A	28	29	30	31	32	33	34
	T	A	S	S	S	V	S	S	S	Y	L	H (SEQ ID NO:14)
	T	Q	R	T	S	V	K	R	S	Y	I	S (SEQ ID NO:15)
	T	P	R	G	R	V	R	S	S	Y	L	S (SEQ ID NO:16)
	P	E	C	X	S	L	G	T	I	Y	L	H (SEQ ID NO:17)
	S	A	S	S	S	V	N	S	T	Y	L	H (SEQ ID NO:18)
	T	A	S	T	A	V	G	S	S	Y	L	H (SEQ ID NO:19)
	N		S	R	S	V	S	T	R	Y	L	H (SEQ ID NO:20)
	N	T	T	R	S	V	S	T	G	Y	L	H (SEQ ID NO:21)
	T	A	S	S	R	V	T	S	T	Y	L	H (SEQ ID NO:22)
	N	T	P	T	G	V	N	P	V	Y	L	H (SEQ ID NO:23)
	A	A	S	S	D	V	I	G	S	Y	V	H (SEQ ID NO:24)
	G	L	S	T	S	V	N	S	S	Y	M	H (SEQ ID NO:25)
	N	A	K	S	G	V	R	S	S	X	V	H (SEQ ID NO:26)
	N	S	N	G	S	V	S	S	K	Y	I	H (SEQ ID NO:27)
	T	P	S	R	I	V	S	G	S	Y	L	S (SEQ ID NO:28)
	N	P	S	R	R	V	T	G	H	Y	V	S (SEQ ID NO:29)
	T	S	S	S	A	V	S	G	S	Y	V	S (SEQ ID NO:30)
	T	S	T	T	I	V	R	G	R	Y	Y	S (SEQ ID NO:31)
	T	A	S	S	T	L	S	S	N	Y	L	T (SEQ ID NO:32)
	T	P	T	G	S	I	S	R	R	Y	L	S (SEQ ID NO:33)
	T	A	G	S	K	A	N	S	S	Y	I	H (SEQ ID NO:34)

445

93875

446

Φir. 8

Kabat#	49	50	51	52	53	54	55	56	
	Y	S	T	S	N	L	A	S	(SEQ ID NO:35)
	Y	S	T	S	H	F	A	S	(SEQ ID NO:36)
	Y	S	A	S	N	V	P	S	(SEQ ID NO:37)
	Y	S	T	I	N	L	A	T	(SEQ ID NO:38)
	Y	S	T	S	K	V	A	N	(SEQ ID NO:39)
	Y	S	T	T	N	L	A	S	(SEQ ID NO:40)
	Y	S	T	N	H	L	A	S	(SEQ ID NO:41)
	Y	S	T	N	N	L	A	S	(SEQ ID NO:42)
	Y	S	T	I	H	P	A	S	(SEQ ID NO:43)
	Y	S	T	S	H	L	S	Y	(SEQ ID NO:44)
	Y	S	T	R	T	M	A	S	(SEQ ID NO:45)
	Y	S	T	S	X	L	F	S	(SEQ ID NO:46)
	Y	N	T	S	N	R	A	S	(SEQ ID NO:47)
	Y	G	T	S	H	L	A	S	(SEQ ID NO:48)
	Y	G	T	G	S	P	A	S	(SEQ ID NO:49)
	Y	S	T	N	K	L	A	R	(SEQ ID NO:50)
	Y	S	T	S	Q	L	G	R	(SEQ ID NO:51)
	Y	S	T	S	N	V	P	Q	(SEQ ID NO:52)
	Y	G	T	Y	N	L	P	I	(SEQ ID NO:53)
	Y	G	S	N	N	R	A	Y	(SEQ ID NO:54)
	Y	S	S	S	N	T	X	S	(SEQ ID NO:55)
	Y	S	A	N	K	L	A	S	(SEQ ID NO:56)
	Y	S	A	T	R	R	A	S	(SEQ ID NO:57)
	Y	S	A	S	N	R	A	R	(SEQ ID NO:58)

Φir. 9

Kabat#	89	90	91	92	93	94	95	96	97	
	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	T	(SEQ ID NO:59)
	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	K	(SEQ ID NO:60)
	H	Q	Y	H	R	T	P	Y	K	(SEQ ID NO:61)
	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	G	(SEQ ID NO:62)
	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	N	(SEQ ID NO:63)
	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	S	(SEQ ID NO:64)
	H	Q	Y	Y	R	S	P	Y	T	(SEQ ID NO:65)
	H	Q	Y	Y	R	T	P	Y	S	(SEQ ID NO:66)
	H	Q	Y	Q	R	S	P	Y	T	(SEQ ID NO:67)
	H	Q	Y	Q	R	S	P	Y	R	(SEQ ID NO:68)
	H	Q	Y	N	R	S	P	Y	A	(SEQ ID NO:69)
	H	Q	Y	H	R	T	P	Y	T	(SEQ ID NO:70)
	H	Q	Y	H	R	S	P	Y	I	(SEQ ID NO:71)
	H	Q	Y	H	R	R	P	Y	R	(SEQ ID NO:72)
	H	Q	Y	H	R	N	P	Y	I	(SEQ ID NO:73)

Φir. 10

Kabat#	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	
	G	F	N	I	K	D	T	Y	M	H		(SEQ ID NO:74)
	A	F	N	I	A	D	T	Y	I	H		(SEQ ID NO:75)
	R	F	R	I	K	D	T	Y	V	H		(SEQ ID NO:76)
	R	F	N	I	K	D	T	Y	I	H		(SEQ ID NO:77)
	S	F	Q	I	N	D	T	Y	I	H		(SEQ ID NO:78)
	S	F	Q	M	S	D	T	Y	V	H		(SEQ ID NO:79)
	D	F	N	I	K	D	T	Y	I	H		(SEQ ID NO:80)
	G	F	N	I	I	D	T	Y	I	H		(SEQ ID NO:81)
	G	L	Q	I	V	D	T	Y	I	H		(SEQ ID NO:82)
	G	F	N	I	K	D	T	Y	L	H		(SEQ ID NO:83)
	G	F	N	I	Q	D	L	Y	L	H		(SEQ ID NO:84)
	G	F	N	I	I	D	T	Y	M	H		(SEQ ID NO:85)
	G	W	K	M	T	D	T	Y	M	H		(SEQ ID NO:86)
	E	F	K	I	K	D	T	Y	V	H		(SEQ ID NO:87)
	G	F	N	I	K	D	T	Y	V	H		(SEQ ID NO:88)
	G	F	Y	I	S	N	T	Y	I	H		(SEQ ID NO:89)
	G	F	N	I	K	N	T	Y	L	H		(SEQ ID NO:90)
	G	F	S	I	E	N	T	Y	M	H		(SEQ ID NO:91)
	G	F	N	I	K	N	T	Y	M	H		(SEQ ID NO:92)
	D	F	K	I	E	N	T	Y	V	H		(SEQ ID NO:93)

## Φir. 11

Kabat#	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
ID NO:94)	G	R	V	D	P			A	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G (SEQ
ID NO:95)	G	R	V	D	P			A	N	G	N	T	K	S	D	P	K	V	R	G (SEQ
ID NO:96)	G	R	V	D	P			A	N	G	L	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G (SEQ
ID NO:97)	G	R	V	D	P			A	N	G	E	I	K	S	H	P	I	F	Q	G (SEQ
ID NO:98)	G	R	V	D	P			A	N	G	N	T	K	E	D	R	Q	F	Q	G (SEQ
ID NO:99)	G	R	V	D	P			E	Y	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G (SEQ
ID NO:100)	G	R	L	D	P			A	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G (SEQ
ID NO:101)	G	R	V	D	P			A	N	G	D	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G (SEQ
ID NO:102)	G	R	V	D	P			A	N	G	K	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G (SEQ
ID NO:103)	G	R	V	D	P			A	N	G	L	T	K	Y	N	P	K	F	Q	G (SEQ
ID NO:104)	G	R	V	D	P			A	N	G	Y	T	K	Y	N	P	K	F	Q	G (SEQ
ID NO:105)	G	R	V	D	P			A	N	G	Y	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G (SEQ
ID NO:106)	G	R	V	D	P			A	N	G	N	Y	K	Y	D	P	K	F	Q	G (SEQ
ID NO:107)	G	R	V	D	P			A	N	G	N	S	K	Y	D	P	K	F	Q	G (SEQ
ID NO:108)	G	R	V	D	P			A	N	G	N	T	K	Y	D	H	R	F	Q	G (SEQ
ID NO:109)	G	R	V	D	P			A	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	R	G (SEQ
ID NO:110)	G	R	V	D	P			S	N	G	N	T	K	S	D	G	K	F	N	G (SEQ
ID NO:111)	G	R	V	D	P			V	D	G	K	T	K	Y	N	P	Q	I	Q	G (SEQ
ID NO:112)	G	R	V	D	P			A	H	G	N	I	K	Y	D	P	Q	I	M	G (SEQ

## Φir. 12

Kabat#	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	101	102
ID NO:113)	V	R	D	Y	Y	G	H	T	Y	G			F	A	F (SEQ
ID NO:114)	V	R	D	Y	Y	G	H	T	Y	G			F	Q	P (SEQ
ID NO:115)	A	R	D	N	Y	G	H	T	Y	G			F	G	F (SEQ
ID NO:116)	V	R	D	T	Y	G	H	T	Y	G			F	A	Y (SEQ
ID NO:117)	V	R	D	Y	Y	G	H	T	Y	G			F	G	Y (SEQ
ID NO:118)	V	R	D	Y	Y	G	H	T	Y	G			F	G	V (SEQ

## Φir. 13

Kabat#	24	25	26	27	A	28	29	30	31	32	33	34
	K	A	S	D	L		I	H	N	W	L	A (SEQ ID NO:119)

## Φir. 14

Kabat#	49	50	51	52	53	54	55	56
	S	G	A	T	S	L	E	T (SEQ ID NO:120)
	Y	G	A	T	S	L	E	T (SEQ ID NO:121)

## Φir. 15

Kabat#	89	90	91	92	93	94	95	96	97
	Q	Q	Y	W	T	T	P	F	T (SEQ ID NO:122)

449

93875

450

## Φir. 16

Kabat#	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	
	G	Y	S	I	T	N	D	Y	A	W	N	(SEQ ID NO:123)

## Φir. 17

Kabat#	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
ID NO:124)	G	Y	I	N	Y			S	G	Y	T	T	Y	N	P	S	L	K	S	(SEQ	
ID NO:125)	G	Y	I	S	Y			S	G	Y	T	T	Y	N	P	S	L	K	S	(SEQ	
ID NO:126)	G	Y	I	N	Y			A	G	Y	T	T	Y	N	P	S	L	K	S	(SEQ	
ID NO:127)	G	Y	I	S	Y			A	G	Y	T	T	Y	N	P	S	L	K	S	(SEQ	

## Φir. 18A

Kabat#	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	101	102	
ID NO:128)	A	R	W	D	G	G							L	T	Y	(SEQ
ID NO:129)	A	R	W	A	A	G							L	T	N	(SEQ
ID NO:130)	A	R	W	D	A	G							L	S	Y	(SEQ
ID NO:131)	A	R	W	D	A	G							L	T	Y	(SEQ
ID NO:132)	A	R	W	E	A	G							L	N	H	(SEQ
ID NO:133)	A	R	W	E	A	G							L	N	Y	(SEQ
ID NO:134)	A	R	W	M	A	G							L	S	D	(SEQ
ID NO:135)	A	R	W	S	A	G							L	D	H	(SEQ
ID NO:136)	A	R	W	T	A	G							L	D	Y	(SEQ
ID NO:137)	A	R	W	T	A	G							L	T	H	(SEQ
ID NO:138)	A	R	W	V	A	G							L	T	N	(SEQ
ID NO:139)	A	R	W	A	G	G							L	E	N	(SEQ
ID NO:140)	A	R	W	D	G	G							L	S	Y	(SEQ
ID NO:141)	A	R	W	D	R	G							L	T	Y	(SEQ
ID NO:142)	A	R	W	A	S	G							L	S	H	(SEQ
ID NO:143)	A	R	W	A	S	G							L	S	N	(SEQ
ID NO:144)	A	R	W	A	S	G							L	S	Y	(SEQ
ID NO:145)	A	R	W	A	S	G							L	T	H	(SEQ
ID NO:146)	A	R	W	A	S	G							L	T	N	(SEQ
ID NO:147)	A	R	W	D	S	G							L	K	Y	(SEQ
ID NO:148)	A	R	W	D	S	G							L	N	Y	(SEQ
ID NO:149)	A	R	W	D	S	G							L	S	S	(SEQ
ID NO:150)	A	R	W	D	S	G							L	S	V	(SEQ
ID NO:151)	A	R	W	D	S	G							L	S	Y	(SEQ
ID NO:152)	A	R	W	D	S	G							L	T	Y	(SEQ
ID NO:153)	A	R	W	E	S	G							L	S	H	(SEQ
ID NO:154)	A	R	W	E	S	G							L	S	V	(SEQ
ID NO:155)	A	R	W	K	S	G							L	D	S	(SEQ

## Φir. 18B

Kabat#	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	101	102
ID NO:156)	A	R	W	K	S	G							L	E	Y (SEQ
ID NO:157)	A	R	W	L	S	G							L	D	F (SEQ
ID NO:158)	A	R	W	L	S	G							L	D	S (SEQ
ID NO:159)	A	R	W	L	S	G							L	E	S (SEQ
ID NO:160)	A	R	W	L	S	G							L	S	D (SEQ
ID NO:161)	A	R	W	R	S	G							L	E	H (SEQ
ID NO:162)	A	R	W	S	S	G							L	N	Y (SEQ
ID NO:163)	A	R	W	S	S	G							L	T	Y (SEQ
ID NO:164)	A	R	W	T	S	G							M	D	S (SEQ
ID NO:165)	A	R	W	T	S	G							L	T	Y (SEQ
ID NO:166)	A	R	W	D	T	G							L	T	Y (SEQ
ID NO:167)	A	R	W	A	A	G							L	D	H (SEQ
ID NO:168)	A	R	W	A	A	G							L	D	S (SEQ
ID NO:169)	A	R	W	L	A	G							L	S	N (SEQ
ID NO:170)	A	R	W	T	A	G							L	D	Q (SEQ
ID NO:171)	A	R	W	A	S	G							L	D	H (SEQ
ID NO:172)	A	R	W	A	S	G							L	D	N (SEQ
ID NO:173)	A	R	W	A	S	G							L	D	S (SEQ
ID NO:174)	A	R	W	A	S	G							L	D	Y (SEQ
ID NO:175)	A	R	W	K	S	G							L	D	T (SEQ
ID NO:176)	A	R	W	K	S	G							L	G	P (SEQ
ID NO:177)	A	R	W	M	S	G							L	D	S (SEQ
ID NO:178)	A	R	W	R	S	G							L	E	S (SEQ
ID NO:179)	A	R	W	R	S	G							L	E	Y (SEQ
ID NO:180)	A	R	W	T	S	G							L	D	S (SEQ
ID NO:181)	A	R	W	T	S	G							L	D	T (SEQ
ID NO:182)	A	R	W	T	S	G							L	D	V (SEQ
ID NO:183)	A	R	W	T	S	G							L	D	Y (SEQ



## Φir. 19

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T  
 [-H1-] W V R Q A P G Q G L E W M G [-H2-] R V T I T A D T S T S  
 T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R [-H3-] W G Q G T L V T  
 V S S (SEQ ID NO:184)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S [-H1-] W V R Q  
 A P G Q G L E W M [-H2-] R V T I T A D T S T S T A Y M E L S S L  
 R S E D T A V Y Y C A R [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID  
 NO:185)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S [-H1-] W V R Q  
 A P G Q G L E W M [-H2-] R V T I T A D T S T S T A Y M E L S S L  
 R S E D T A V Y Y C A [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID  
 NO:186)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S [-H1-] W V R Q  
 A P G Q G L E W M [-H2-] R V T I T A D T S T S T A Y M E L S S L  
 R S E D T A V Y Y C [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID  
 NO:187)

Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S G G S V S  
 [-H1-] W I R Q P P G K G L E W I G [-H2-] R V T I S V D T S K N  
 Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R [-H3-] W G Q G T L V T  
 V S S (SEQ ID NO:188)

Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S [-H1-] W I R Q  
 P P G K G L E W I [-H2-] R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V  
 T A A D T A V Y Y C A R [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID  
 NO:189)

Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S [-H1-] W I R Q  
 P P G K G L E W I [-H2-] R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V  
 T A A D T A V Y Y C A [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID  
 NO:190)

Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S [-H1-] W I R Q  
 P P G K G L E W I [-H2-] R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V  
 T A A D T A V Y Y C [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID  
 NO:191)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S [-H1-] W V R Q  
 A P G K G L E W V [-H2-] R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L  
 R A E D T A V Y Y C [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID  
 NO:192)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S [-H1-] W V R Q  
 A P G K G L E W V [-H2-] R F T I S R D N S K N T F Y L Q M N S L  
 R A E D T A V Y Y C [-H3-] W G Q G T L V T V S S (SEQ ID  
 NO:193)

## Φir. 20

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C [-L1-] W Y Q Q K P  
 G K A P K L L I [-L2-] G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S  
 L Q P E D F A T Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K R (SEQ ID  
 NO:194)

D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C [-L1-] W Y L Q K P  
 G Q S P Q L L I Y [-L2-] G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S  
 R V E A E D V G V Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K (SEQ ID  
 NO:195)

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C [-L1-] W Y Q Q K P  
 G Q A P R L L I Y [-L2-] G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S  
 R L E P E D F A V Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K (SEQ ID  
 NO:196)

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C [-L1-] W Y Q Q K P  
 G Q P P K L L I Y [-L2-] G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S  
 S L Q A E D V A V Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K (SEQ ID  
 NO:197)

$\Phi$ ir. 21A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND  
YAWNWVRQAPGKGLWVGYYINYSGYTTYNPSL  
KSRFTISRDTTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARWASGLDYWGQGGLVTVSS (SEQ ID NO:198)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND  
YAWNWVRQAPGKGLWVGYYINYSGYTTYNPSL  
KSRFTISRDTTSKNTFYLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARWASGLSHWGQGGLVTVSS (SEQ ID NO:199)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND  
YAWNWVRQAPGKGLWVGYYINYSGYTTYNPSL  
KSRFTISRDTTSKNTFYLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARWASGLSYWGQGGLVTVSS (SEQ ID NO:200)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND  
YAWNWVRQAPGKGLWVGYYINYSGYTTYNPSL  
KSRFTISRDTTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARWTSGLDYWGQGGLVTVSS (SEQ ID NO:201)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND  
YAWNWVRQAPGKGLWVGYYINYSGYTTYNPSL  
KSRFTISRDTTSKNTFYLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARWDAGLTYWGQGGLVTVSS (SEQ ID NO:202)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND  
YAWNWVRQAPGKGLWVGYYINYSGYTTYNPSL  
KSRFTISRDTTSKNTFYLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARWDSGLTYWGQGGLVTVSS (SEQ ID NO:203)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND  
YAWNWVRQAPGKGLWVGYYINYSGYTTYNPSL  
KSRFTISRDTTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARWKSGLDSWGQGGLVTVSS (SEQ ID NO:204)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND  
YAWNWVRQAPGKGLWVGYYINYSGYTTYNPSL  
KSRFTISRDTTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARWTSGLDSWGQGGLVTVSS (SEQ ID NO:205)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND  
YAWNWVRQAPGKGLWVGYYISYSGYTTYNPSL  
KSRFTISRDTTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARWASGLDYWGQGGLVTVSS (SEQ ID NO:206)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND  
YAWNWVRQAPGKGLWVGYYINYAGYTTYNPSL  
KSRFTISRDTTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARWASGLDYWGQGGLVTVSS (SEQ ID NO:207)

 $\Phi$ ir. 21B

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND  
YAWNWVRQAPGKGLWVGYYISYSGYTTYNPSL  
KSRFTISRDTTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARWTSGLDYWGQGGLVTVSS (SEQ ID NO:208)

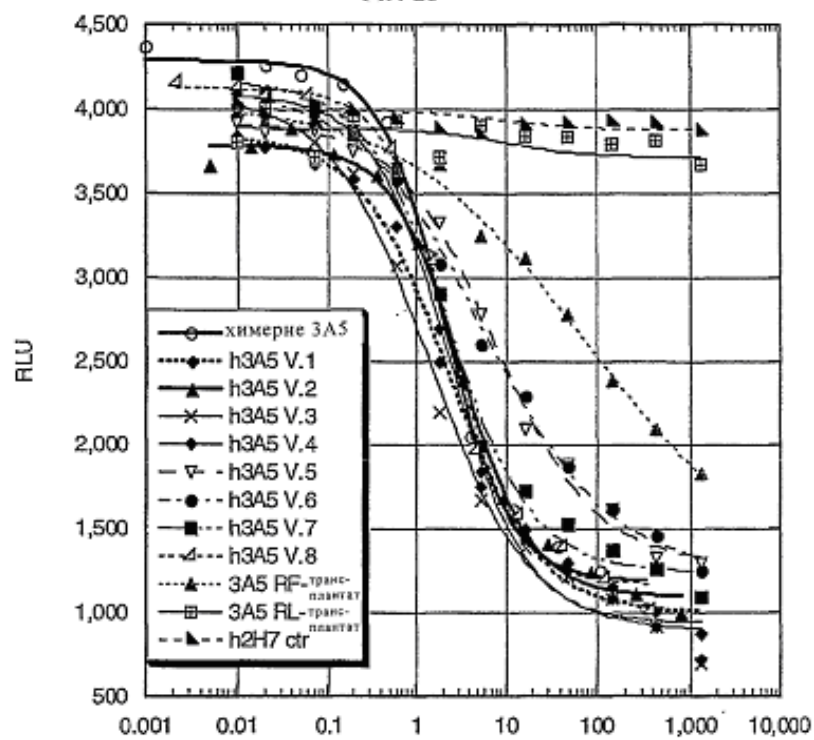
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITND  
YAWNWVRQAPGKGLWVGYYINYAGYTTYNPSL  
KSRFTISRDTTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
ARWTSGLDYWGQGGLVTVSS (SEQ ID NO:209)

 $\Phi$ ir. 22

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASDLIHNW  
LAWYQQKPKAPKLLISGATSLVETGVPSPRFSG  
SGSGTDFTLTISSLQPEDFAFYCYCQQYWTTPF  
TFGQGQTKVEIKR (SEQ ID NO:210)

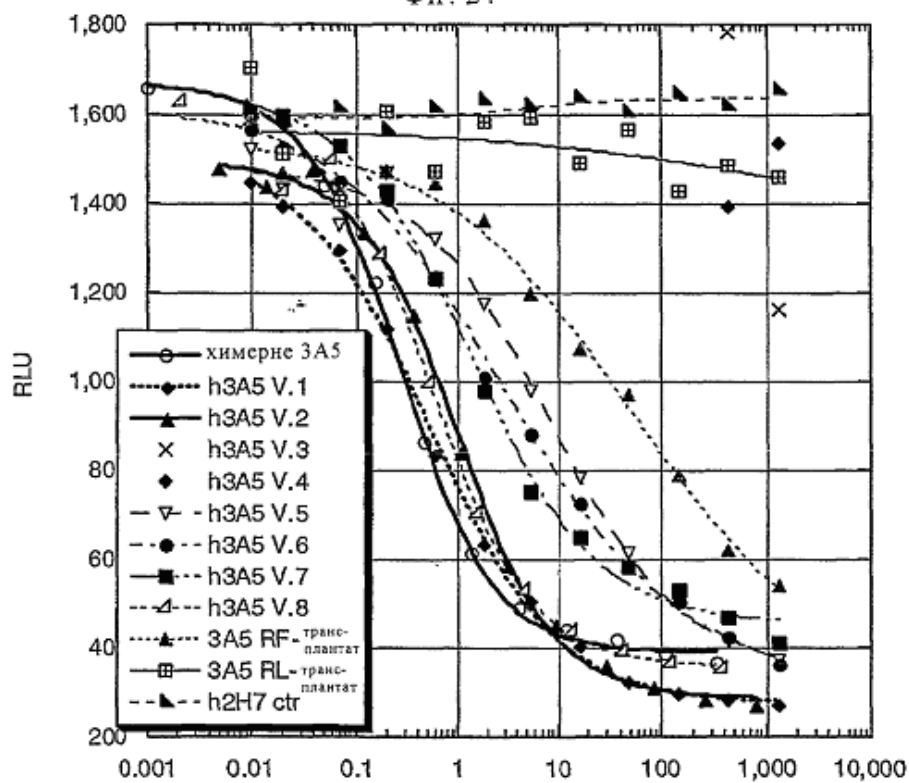
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASDLIHNW  
LAWYQQKPKAPKLLIYGATSLVETGVPSPRFSG  
SGSGTDFTLTISSLQPEDFAFYCYCQQYWTTPF  
TFGQGQTKVEIKR (SEQ ID NO:211)

Фіг. 23



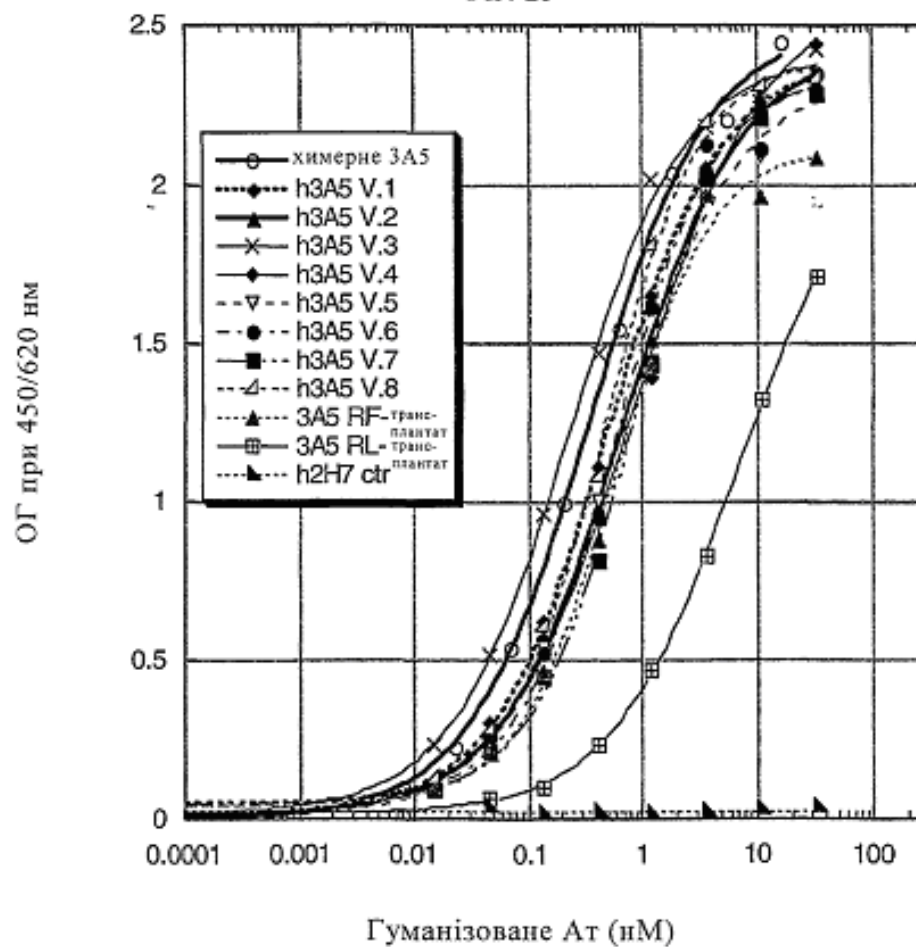
Гуманізоване Ат (нМ)

Фіг. 24

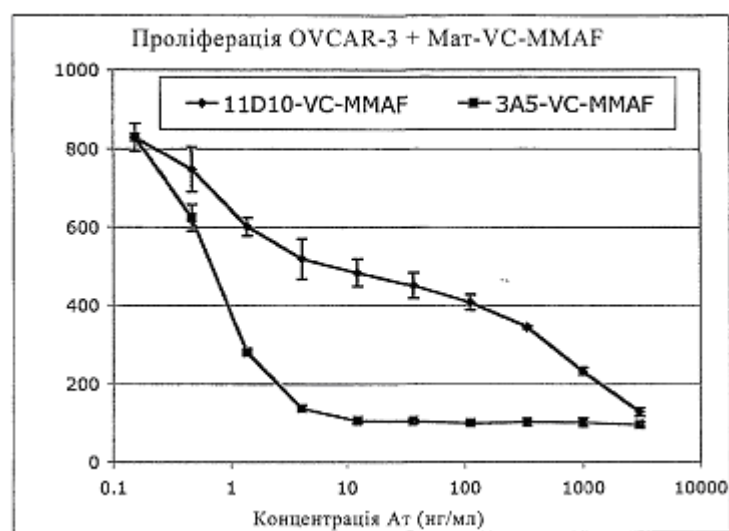


Гуманізоване Ат (нМ)

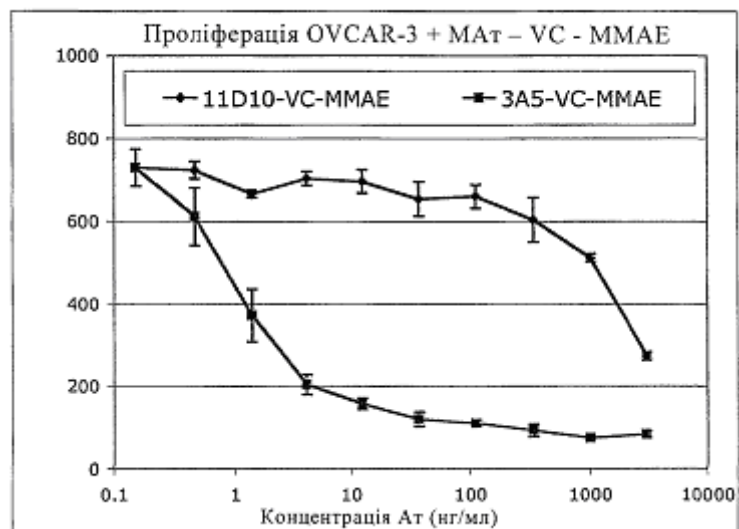
Фиг. 25



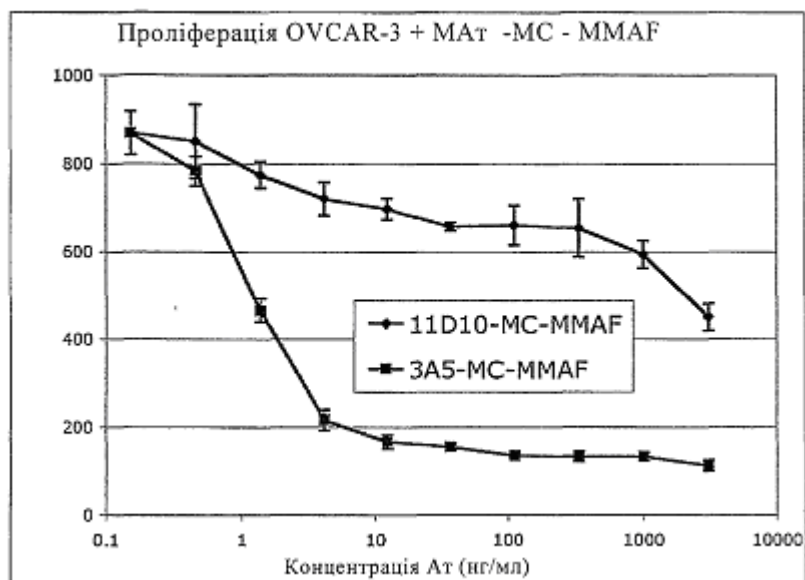
Фиг. 26



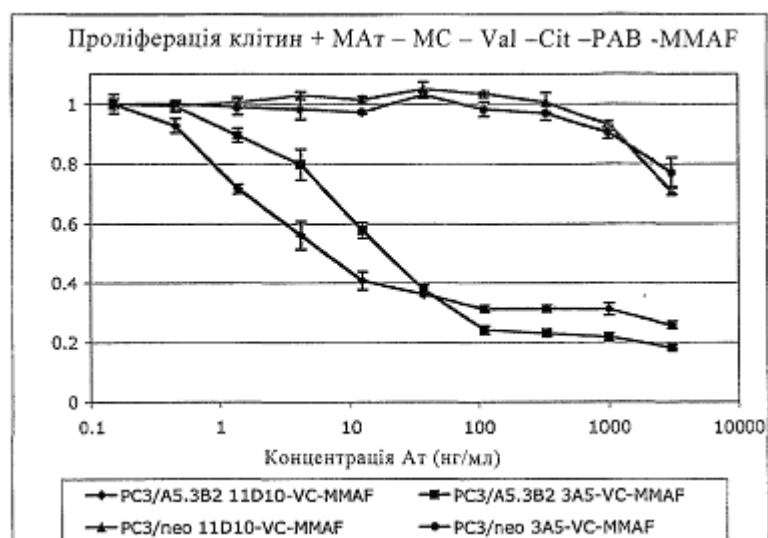
Фиг. 27



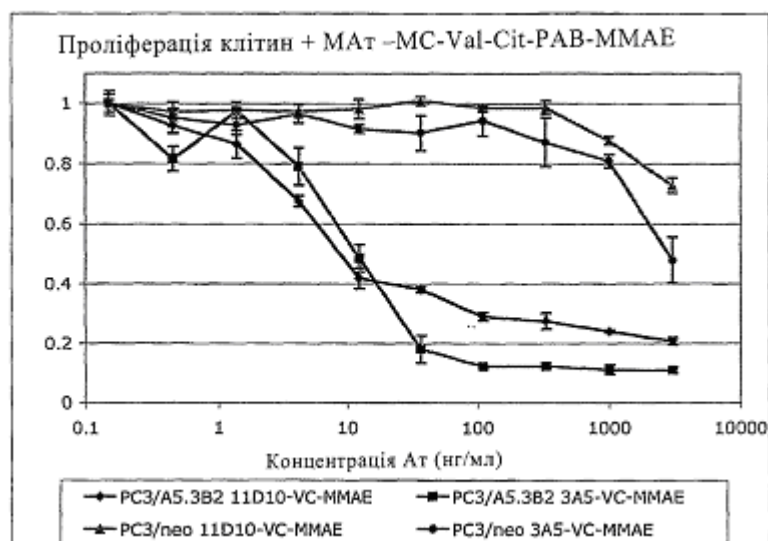
Фиг. 28



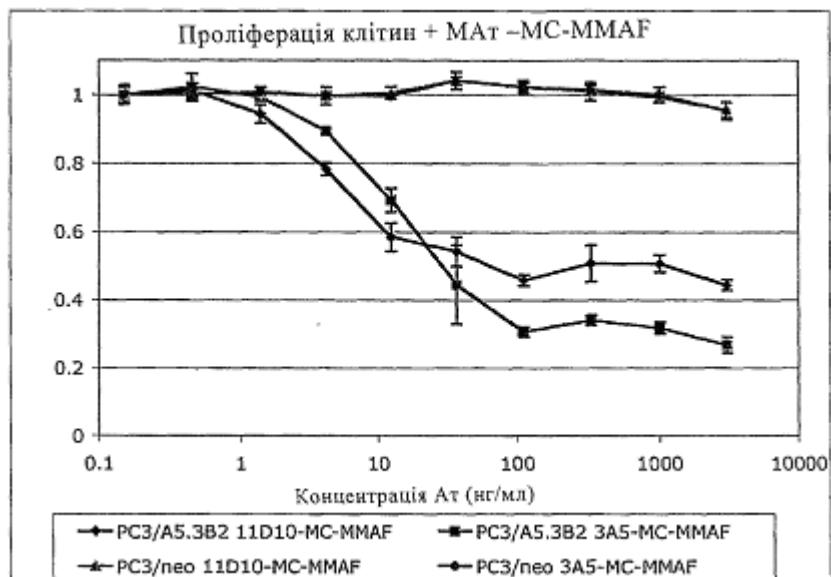
Фиг. 29



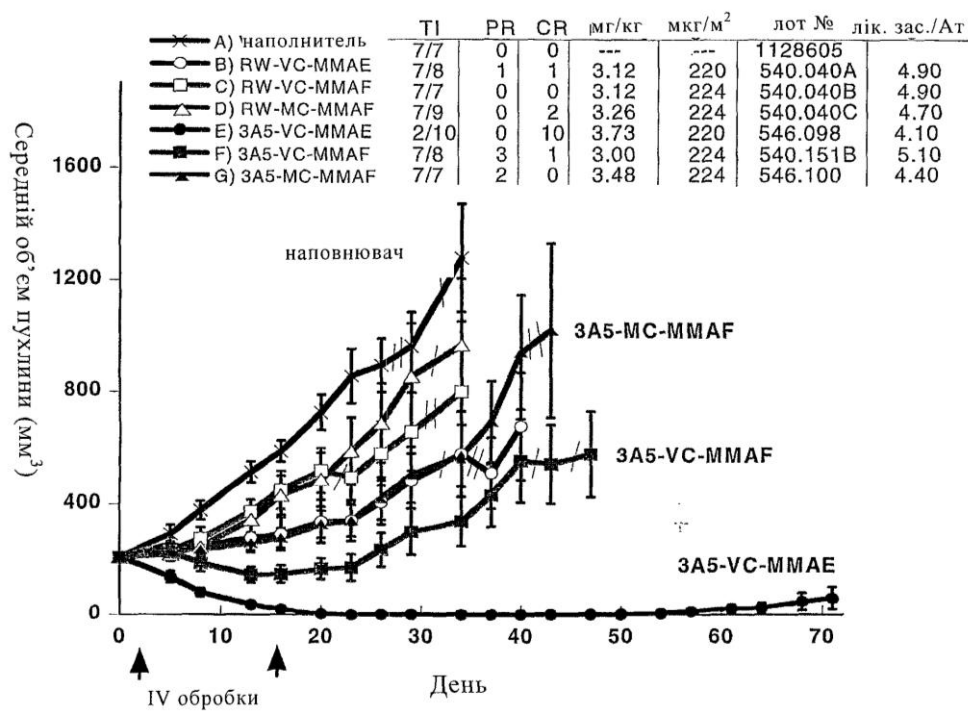
Фиг. 30



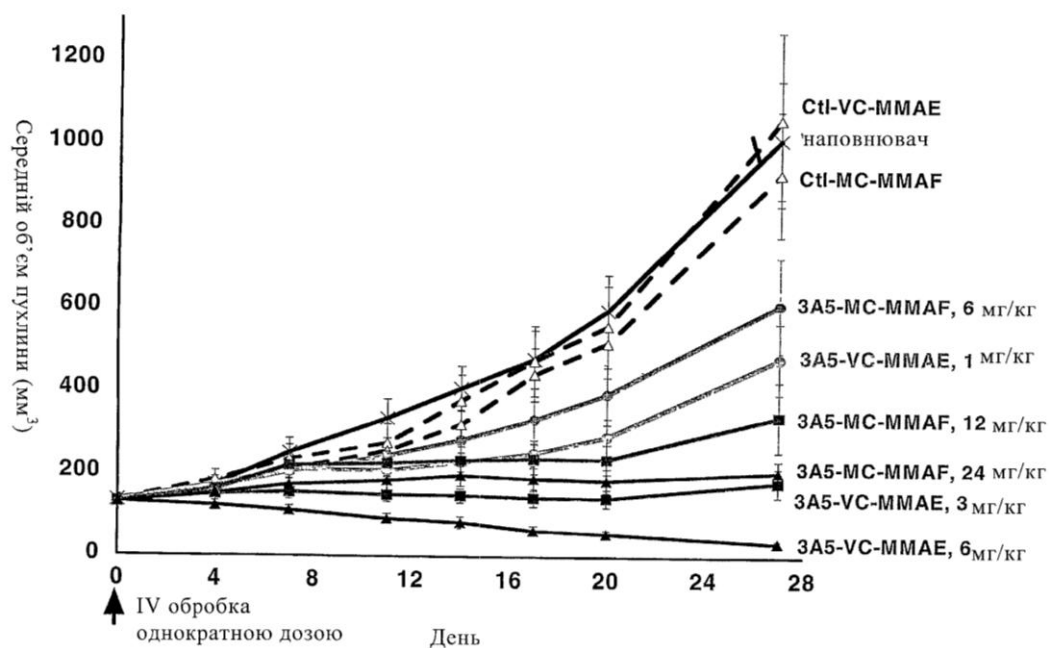
Фиг. 31



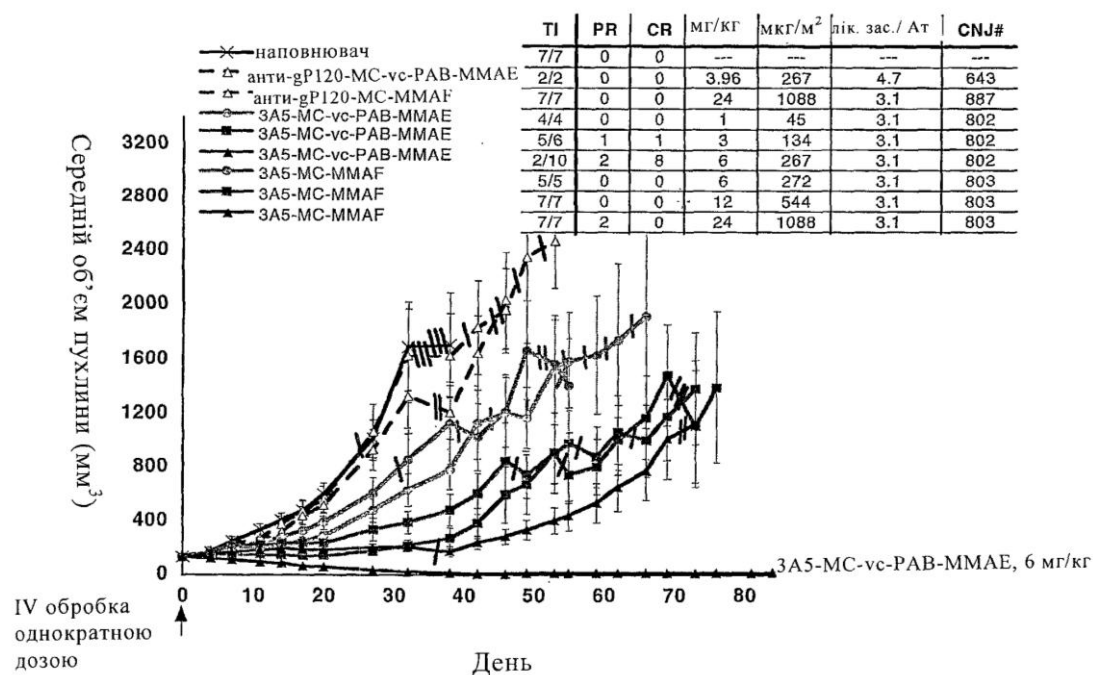
Фіг. 32



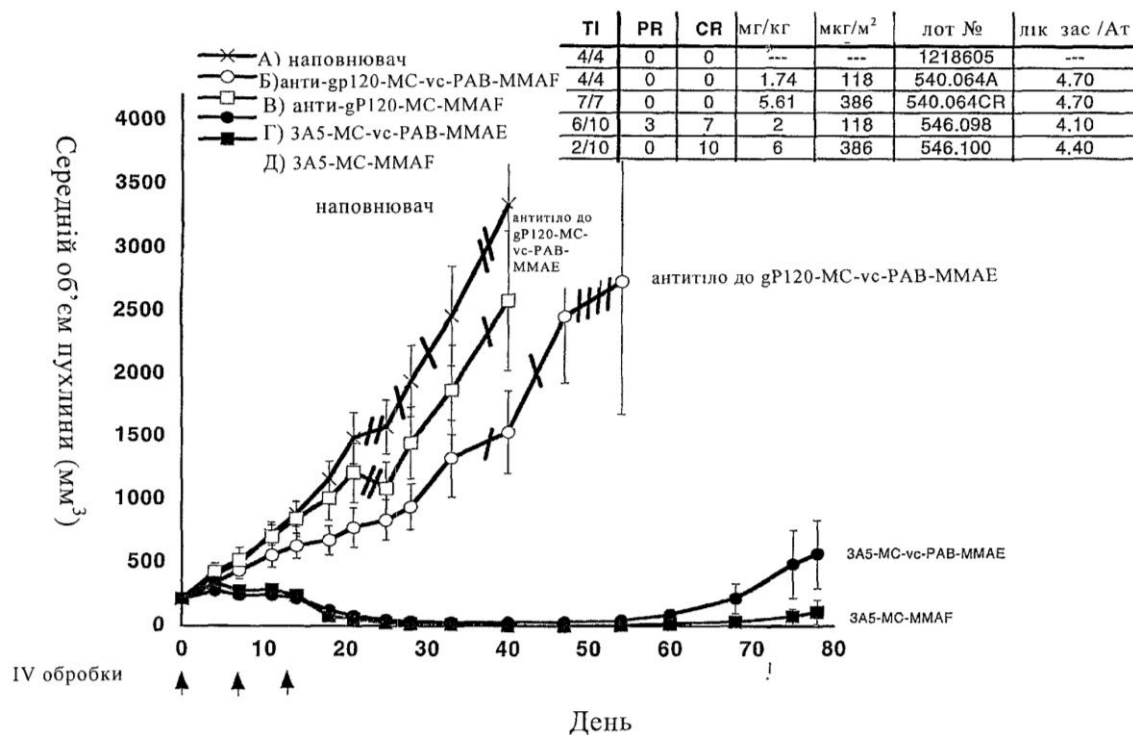
Фіг. 33



Фіг. 34

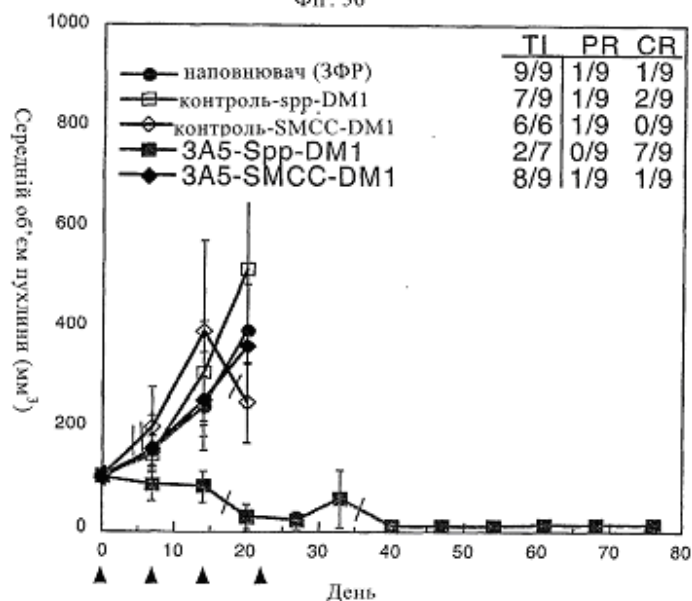


Фіг. 35





Фиг. 36



Фиг. 37

