

Як відомо, ліганди сімейства TNF (некротичний пухлинний фактор) належать до найбільш плейотропних цитокінів, які індукують велику кількість клітинних реакцій, у тому числі проліферацію, цитоксичність, антивірусну активність, імунорегуляторні активності та транскрипційну регуляцію декількох генів. Кількість цитокінів та рецепторів сімейства TNF значно збільшилась за останні декілька років завдяки впровадженню масового EST-секвенування (секвенування з експресованою секвенувальною міткою). TNFSF13b являє собою офіційну назву, яка була прийнята конгресом із TNF для BLyS, TALL-1, BAFF, THANK, нейрокину- $\alpha$  та zTNF (дивись оглядову роботу Локслі (Locksley) та інших, Cell, 2001, 104:487). Людський TNFSF13b (hTNFSF13b) являє собою мембранний білок типу II, який складається з 285 амінокислот і має N-кінцевий сайт розщеплення, що забезпечує можливість існування як розчинних, так і мембранних білків. У функціональному відношенні TNFSF13b, як видається, регулює В-клітинні та деякі Т-клітинні імунні реакції.

Результати досліджень септичного шоку та інших розладів, що виникають унаслідок надпродукування запальних цитокінів, показали, що протидія ураженого хазяїна проти високих рівнів цитокінів полягає у виділенні розчинних рецепторів цитокінів або у синтезуванні високоафінних протицитокінних антитіл. Способи лікування, що імітують такі природні реакції, розглядаються як життєздатні варіанти терапевтичного підходу до полегшення проявів цитокін-опосередкованого захворювання. Визнається, таким чином, існування потреби у людських антитілах, що зв'язують цитокіни, наприклад, TNFSF13b, які залучаються до регулювання клітинних імунних процесів із високою афінністю і які мають здатність до антагонізування активності цільових цитокінів *in vitro* та *in vivo*. Незважаючи на те, що у міжнародній заявці WO 00/50597 неописово розкриваються антитіла, спрямовані проти TNFSF13b, у цій заявці немає конкретного опису структурних або функціональних характеристик таких антитіл.

Цей винахід пропонує анти-hTNFSF13b людські антитіла або їхні антиген-зв'язувальні домени. Антитіла за цим винаходом відрізняються високоафінним зв'язуванням із TNFSF13b поліпептидами, повільною дисоціативною кінетикою та здатністю до антагонізування щонайменше однієї *in vitro* та/або *in vivo* активності, що пов'язується із TNFSF13b поліпептидами.

Цей винахід пропонує також анти-hTNFSF13b людські антитіла, що включають поліпептид, вибраний з групи, що включає поліпептид, який відповідає Послідовності №2, поліпептид, який відповідає Послідовності №4, поліпептид, який відповідає Послідовності №6, поліпептид, який відповідає Послідовності №8, поліпептид, який відповідає Послідовності №10, поліпептид, який відповідає Послідовності №12, поліпептид, який відповідає Послідовності №14 та поліпептид, який відповідає Послідовності №16.

За іншим варіантом втілення, цей винахід пропонує ізольоване анти-hTNFSF13b людське антитіло, яке зв'язується з hTNFSF13b поліпептидом та відокремлюється від згаданого hTNFSF13b поліпептиду із константою швидкості дисоціації  $K_{off}$ , яка дорівнює  $1 \times 10^{-4} \text{с}^{-1}$  або менше, за результатами визначення засобами поверхневого плазмонного резонансу, або яке пригнічує TNFSF13b-індуковану проліферацію у реакції нейтралізації *in vitro* з  $IC_{50} 1 \times 10^{-8} \text{М}$  або менше.

За варіантом втілення, якому віддається перевага, цей винахід пропонує ізольоване анти-hTNFSF13b людське антитіло, що має такі характеристики:

a) пригнічує TNFSF13b-індуковану проліферацію у реакції нейтралізації *in vitro* з  $IC_{50} 1 \times 10^{-8} \text{М}$  або менше;

b) має CDR3 (гіперваріабельна ділянка 3) важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №16; та

c) має CDR3 легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №8.

Цей винахід пропонує також способи лікування або запобігання гострих або хронічних захворювань чи станів, пов'язаних із В-клітинною та деякою Т-клітинною активністю, у тому числі (але без обмеження) автоімунних захворювань, наприклад, системного червоного вовчака, ревматоїдного артриту та/або неоплазії, що включають введення анти-hTNFSF13b людського антитіла за цим винаходом.

За іншим варіантом втілення, цей винахід пропонує послідовності, які кодують нові анти-hTNFSF13b людські антитіла, вектори, що включають полінуклеотидні послідовності, які кодують анти-hTNFSF13b людські антитіла, клітини-хазяї, трансформовані векторами, що включають полінуклеотиди, які кодують анти-hTNFSF13b людські антитіла, композиції, що містять анти-hTNFSF13b людські антитіла і способи їх одержання та застосування.

За іншим варіантом втілення, цей винахід пропонує антигенну детермінанту згаданого антигену, з якою зв'язуються нові анти-hTNFSF13b людські антитіла. Таким чином, цей винахід також пропонує застосування антитіла, яке зв'язує антигенну детермінанту за цим винаходом, із нейтралізуванням, тим самим, активності TNFSF13b для лікування чи запобігання гострих або хронічних захворювань чи станів, пов'язаних із В-клітинною та деякою Т-клітинною активністю, у тому числі (але без обмеження) автоімунних захворювань, наприклад, системного червоного вовчака, ревматоїдного артриту та/або неоплазії.

Цей винахід включає також готовий виріб, до складу якого входять пакувальний матеріал та антитіло, що міститься у згаданому пакувальному матеріалі, де згадане антитіло нейтралізує активність TNFSF13b для лікування чи запобігання страждання людини від розладу, при якому активність TNFSF13b є шкідливою, і де згаданий пакувальний матеріал включає пакувальну вкладку, яка вказує, що згадане антитіло здійснює нейтралізацію шляхом зв'язування антигенної детермінанти TNFSF13b, де згадана антигенна детермінанта має лизин у положенні 71, треонін у положенні 72, тирозин у положенні 73 та глутамінову кислоту у положенні 105; та пакувальна вкладка, що пропонує введення дозованої лікарської форми, наслідком чого є нейтралізація активності TNFSF13b.

Fig.1. Графік, що ілюструє пригнічення hTNFSF13b- та IL-1 (інтерлейкін-1)-індукованої проліферації клітин T1165.17 людським антитілом 4A5-3.1.1-B4.

Fig.2. Графік, що ілюструє нейтралізацію hTNFSF13b-індукованої проліферації ембріональних людських В-клітин, стимульованих анти-IgM, людським антитілом 4A5-3.1.1-B4.

Для полегшення розуміння цього винаходу спочатку наводиться визначення деяких термінів.

Антитіло являє собою молекулу імуноглобуліну, що складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів, двох

важких (H) ланцюгів (приблизно 50-70кДа) та двох легких (L) ланцюгів (приблизно 25кДа), взаємозв'язаних дисульфідними зв'язками. Легкі ланцюги класифікуються як каппа та лямбда. Важкі ланцюги класифікуються як гамма, мю, альфа, дельта або іпсилон, і визначають ізотип антитіла як IgG, IgM, IgA, IgD та IgE, відповідно. До складу кожного важкого ланцюга входять варіабельна ділянка важкого ланцюга (яка позначається у цьому описі як HCVR) та константна ділянка важкого ланцюга. Константна ділянка важкого ланцюга складається із трьох доменів, CH1, CH2 та CH3 у разі IgG, IgD та IgA і чотирьох доменів, CH1, CH2, CH3, CH4 у разі IgM та IgE. До складу кожного легкого ланцюга входять варіабельна ділянка легкого ланцюга (яка позначається у цьому описі як LCVR) та константна ділянка легкого ланцюга. Константна ділянка легкого ланцюга складається із одного домену, CL. HCVR та LCVR ділянки можуть додатково підрозділятися на гіперваріабельні ділянки, які позначаються як CDR, що чергуються з більш консервативними ділянками, які називаються каркасними ділянками (FR). Кожна HCVR та LCVR складається з трьох CDR та чотирьох FR, які розміщуються у напрямку від аміно-кінця до карбоксильного кінця таким чином: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Приналежність амінокислот до кожного домену відповідає добре відомим домовленостям. [Кабат (Kabat) та інші, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N91-3242 (1991); Чотіа (Chothia) та інші, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); Чотіа (Chothia) та інші, *Nature*, 342:878-883 (1989)]. Функціональні характеристики антитіла відносно зв'язування конкретного антигену визначаються гіперваріабельними ділянками (CDR).

Термін "антитіло" у цьому описі означає моноклональне антитіло *per se*. Моноклональне антитіло може бути людським антитілом, химерним антитілом, гуманізованим антитілом, Fab-фрагментом, Fab'-фрагментом, F(ab')<sub>2</sub> або одноланцюговим F<sub>v</sub>-фрагментом. За варіантом, якому віддається перевага, згаданий термін "антитіло" означає людське антитіло.

Згаданий термін "людське антитіло" включає антитіла, які мають варіабельні та константні ділянки, що відповідають послідовностям людського імуноглобуліну ембріонального типу. Людські антитіла мають деякі переваги над нелюдськими або химерними антитілами для застосування у людській терапії. Наприклад, ефекторна ділянка людського антитіла може краще взаємодіяти з іншими частинами людської імунної системи (наприклад, більш ефективно знищувати клітини-мішені шляхом комплемент-залежної цитотоксичності (CDC) або антитіло-залежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності (ADCC)). Інша перевага полягає у тому, що людська імунна система не буде розпізнавати людське антитіло як чужорідне і, завдяки цьому, гуморальна імунна відповідь проти такого введеного антитіла буде менш інтенсивною, ніж проти повністю чужорідного нелюдського антитіла або частково чужорідного химерного антитіла. Окрім того, повідомлялось, що період напіввиведення введених нелюдських антитіл у кров'яному руслі є набагато коротшим, ніж період напіввиведення людських антитіл. Період напіввиведення людських антитіл буде по суті ідентичним періоду напіввиведення природних людських антитіл, що надає можливість введення менших за об'ємом доз із меншою частотою.

Згаданий термін "hTNFSF13b" означає людську форму члена сімейства лігандів некротичного пухлинного фактора, опис якого наведено у міжнародних заявках WO 98/18921 та WO 00/50597 (який згадується у цьому описі як нейтрокін-α). Згаданий термін "TNFSF13b" означає hTNFSF13b, а також гомологи hTNFSF13b, одержані від інших видів тварин. Згадані терміни "hTNFSF13b" та "TNFSF13b" означають його форми, що можуть бути одержані стандартними методами рекомбінантної експресії або придбані у комерційних джерелах (Research Diagnostics Inc., каталожний № RDI-3113, rhuBAFF, Flanders, штат Нью-Джерсі), а також одержані синтетичним шляхом.

Словосполучення "біологічна властивість", "біологічна характеристика" та згаданий термін "активність" відносно антитіла за цим винаходом застосовуються у цьому описі взаємозамінно і означають (але не обмежуються) афінність та специфічність антигенної детермінанти (наприклад, зв'язування анти-hTNFSF13b людського антитіла з hTNFSF13b), здатність до антагонізування активності цільового поліпептиду (наприклад, активності TNFSF13b), стабільність антитіла *in vivo* та імуногенні властивості згаданого антитіла. До інших біологічних властивостей, що піддаються визначенню, або характеристик антитіла, визнаних у цій галузі, належать, наприклад, перехресна реактивність (наприклад, із нелюдськими гомологами згаданого цільового поліпептиду або з іншими білками чи тканинами, взагалі) та здатність до збереження високих рівнів експресії білка у клітинах ссавців. Вищезгадані властивості або характеристики можуть спостерігатись або визначатись за допомогою методів, визнаних у цій галузі, у тому числі (але без обмеження) за допомогою ELISA (твердофазний імуоферментний аналіз), конкурентного ELISA, аналізу поверхневого плазмонного резонансу, реакції нейтралізації *in vitro* та *in vivo* (наприклад, Приклад 2) та імуногістохімічних досліджень тканинних зрізів із різних джерел, у тому числі від людини, приматів або іншого джерела, у залежності від потреби. Докладний опис конкретних активностей та біологічних властивостей анти-hTNFSF13b людських антитіл наведено нижче у Прикладах.

Згадане словосполучення "контактне положення" означає положення амінокислоти у межах CDR1, CDR2 або CDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга або варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла, яке займає амінокислота, що контактує з антигеном. У разі, коли амінокислота CDR контактує зі згаданим антигеном, ця амінокислота може розглядатись як така, що займає контактне положення.

Словосполучення "консервативна заміна" або "консервативна амінокислотна заміна" означає амінокислотні заміни унаслідок природних мутацій або людської маніпуляції, де антитіла, які одержують шляхом таких заміни, мають по суті таку саму (поліпшену або зменшену, у залежності від потреби) активність (активності), що і антитіла, які розкривають у цьому описі.

Згаданий термін "антигенна детермінанта", який використовують у цьому описі, означає ділянку білкової молекули, з якою може зв'язуватись антитіло.

Словосполучення "імуногенна антигенна детермінанта" означає частину білка, що викликає гуморальну імунну відповідь у разі, коли весь білок є імуногеном.

Згаданий термін "зв'язується", який використовують у цьому описі, означає, взагалі, взаємодію антитіла з антигенною детермінантою антигену. Точніше, згаданий термін "зв'язується" має відношення до афінності

антитіла до антигенної детермінанти антигену. Афіністність визначається  $K_D$ .

Термін "пригнічення" або "пригнічувати" має загальноприйняте значення, яке включає нейтралізацію, перешкоджання, запобігання, стримування, уповільнення, припинення або реверсування розвитку або тяжкості захворювання або стану.

Згаданий термін "нейтралізуюче" або "антагонізуюче" по відношенню до анти-TNFSF13b антитіла або словосполучення "антитіло, яке антагонізує активність TNFSF13b" означає антитіло або фрагмент антитіла, наслідком зв'язування якого з TNFSF13b є пригнічення біологічної активності, індукованої TNFSF13b поліпептидами. Пригнічення біологічної активності TNFSF13b може оцінюватись шляхом визначення одного або декількох *in vitro* або *in vivo* показників біологічної активності TNFSF13b, у тому числі (але без обмеження) TNFSF13b-індукованої проліферації, TNFSF13b-індукованої секреції імуноглобулінів, TNFSF13b-індукованого запобігання апоптозу В-клітин або пригнічення зв'язування рецептора у аналізі зв'язування рецептора TNFSF13b. Показники біологічної активності TNFSF13b можуть оцінюватись за допомогою одного або декількох з цілого ряду *in vitro* та *in vivo* аналізів, відомих у цій галузі (дивись, наприклад, Мур П.А. (Moore P.A.) та інші, Science, 285:260-263 (1999); Шнейдер П. (Schneider P.) та інші, J. Exp. Med., 189:1747-1756 (1999); Шу Г. (Shu H.) та інші, J. Leuko. Biol., 65:680-683 (1999); Махопадья А. (Mukhopadhyay A.) та інші, J. Biol. Chem., 274:15978-15981 (1999); Макей Ф. (Mackay F.) та інші, J. Exp. Med., 190:1697-1710 (1999); Гросс Дж.А. (Gross J.A.) та інші, Nature, 404:995-999 (2000); та Приклад 2). За варіантом, якому віддається перевага, здатність антитіла до нейтралізації або антагонізування активності TNFSF13b оцінюється шляхом пригнічення проліферації В-клітин, як показано у Прикладі 2.

Згаданий термін " $K_{off}$ ", який використовують у цьому описі, означає константу дисоціації антитіла від комплексу антитіло/антиген.

Згаданий термін " $K_D$ ", який використовують у цьому описі, означає константу дисоціації або швидкість "відокремлення", поділену на швидкість "зв'язування" у разі конкретної взаємодії антитіло-антиген. Для цілей цього винаходу,  $K_D$  визначали як показано у Прикладі 4.

"Ізольованим" антитілом є антитіло, яке ідентифікували і відокремили та/або виділили зі складової його природного оточення. Контамінуючими складовими природного оточення антитіла є матеріали, які можуть перешкоджати діагностичному або терапевтичному застосуванню згаданого антитіла; до їх числа можуть належати ферменти, гормони та інші білкові або небілкові розчинені речовини. Ізольоване антитіло одержують, як правило, за допомогою щонайменше однієї стадії очищення. За варіантами втілення, яким віддають перевагу, антитіло буде очищатись (1) до рівня, що перевищує 95%(мас.) антитіла, який визначається за методом Лоурі, а за варіантом, якому віддається найбільша перевага, до рівня, що перевищує 99%(мас), та (2) до гомогенного стану за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) за відновних або невідновних умов із застосуванням кумасі синього або срібла. За варіантом, якому віддається перевага, "ізольованим антитілом" є антитіло, по суті вільне від інших антитіл, що мають різні антигенні специфічності (наприклад, ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язує hTNFSF13b по суті вільне від антитіл, які специфічно зв'язують інші антигени, окрім hTNFSF13b поліпептиду).

Згадане словосполучення "молекула нуклеїнової кислоти" означає молекули ДНК та молекули РНК. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одоланцюговою або дволанцюговою, але, за варіантом, якому віддається перевага, це дволанцюгова ДНК.

Згадане словосполучення "ізольована молекула нуклеїнової кислоти", яке використовують у цьому описі по відношенню до нуклеїнових кислот, які кодують антитіла або фрагменти антитіл (наприклад, HCVR, LCVR, CDR3), що зв'язують hTNFSF13b поліпептид, означає молекулу нуклеїнової кислоти, нуклеотидні послідовності якої, що кодують антитіло або частину антитіла, є вільними від інших нуклеотидних послідовностей, що кодують антитіла або фрагменти антитіл, які зв'язують інші антигени, окрім hTNFSF13b поліпептиду, де інші послідовності можуть, природно, фланкувати згадану нуклеїнову кислоту у людській геномній ДНК. Так, наприклад, ізольована нуклеїнова кислота за цим винаходом, що кодує ділянку HCVR анти-hTNFSF13b людського антитіла, не включає інших послідовностей, що кодують ділянки HCVR, які зв'язують інші антигени, окрім hTNFSF13b поліпептиду.

Згаданий термін "вектор" означає молекулу нуклеїнової кислоти, здатну до транспортування іншої нуклеїнової кислоти, з якою вона зв'язана. Вектором одного із типів є "плазмід", яка являє собою петльовий фрагмент кільцевої дволанцюгової ДНК, до якого можуть лігуватись додаткові сегменти ДНК. Вектором іншого типу є вектор на основі вірусної ДНК, де додаткові сегменти ДНК можуть лігуватись до вірусного геному. Деякі вектори є здатними до автономної реплікації у клітині-хазяїні, до якої вони були введені (наприклад, вектори на основі бактеріальної ДНК, що мають бактеріальну точку ініціювання реплікації, та вектори на основі епісомної ДНК ссавців). Інші вектори (наприклад, вектори на основі неепісомної ДНК ссавців) можуть інтегруватись до геному клітини-хазяїна після введення до цієї клітини, і, таким чином, реплікуються разом із геномом хазяїна. Більше того, деякі вектори є здатними до спрямування експресії генів, з якими вони є функціонально зв'язаними. На такі вектори у цьому описі посилаються як на "рекомбінантні вектори експресії" (або просто "вектори експресії"). Взагалі, вектори експресії, придатні для застосування у методах рекомбінантних ДНК, часто мають форму плазмід. У цьому описі терміни "плазмід" та "вектор" можуть застосовуватись взаємозамінно, оскільки плазмід є найпоширенішою формою вектора. Цей винахід, однак, включає інші форми векторів експресії, наприклад, вектори на основі вірусного геному (наприклад, реплікаційно дефективних ретровірусів, аденовірусів та адено-асоційованих вірусів), які застосовуються для здійснення еквівалентних функцій.

Нуклеїнова кислота є "функціонально зв'язаною" у тому разі, коли вона знаходиться у функціональному зв'язку з іншою послідовністю нуклеїнових кислот. Наприклад, ДНК для передсеквенувальної або секреторної лідерної послідовності є функціонально зв'язаною з ДНК для одержання поліпептиду, якщо вона експресується як передбілок, що бере участь у секретуванні згаданого поліпептиду; промотор або енхансер є функціонально зв'язаним із кодувальною послідовністю, якщо він впливає на транскрипцію згаданої

послідовності; або місце зв'язування рибосоми є функціонально зв'язаним із кодувальною послідовністю, якщо воно є позиціоноване таким чином, що полегшує трансляцію. Взагалі, словосполучення "функціонально зв'язаний" означає, що послідовності ДНК, які зв'язуються, є суміжними, а у разі секреторної лідерної послідовності, є суміжними і знаходяться у межах рамки зчитування. Енхансери, однак, не повинні бути суміжними. Зв'язування здійснюється шляхом лігування на зручних сайтах рестрикції. У разі, якщо такі сайти не існують, застосовують синтетичні олігонуклеотидні адаптори або лінкери у відповідності до стандартної практики.

Згаданий термін "рекомбінантне" у відношенні до антитіла означає антитіла, які одержують, експресують, створюють або ізолюють рекомбінантними методами. Репрезентативними прикладами є антитіла, що експресуються із застосуванням рекомбінантного вектора експресії, трансфікованого до клітини-хазяїна, антитіла, ізольовані з бібліотеки рекомбінантних, комбінаторних людських антитіл, антитіла, ізольовані з тварини (наприклад, миші), яка є трансгенною за генами людського імуноглобуліну, або антитіла, одержані, експресовані, створені або ізольовані за допомогою будь-яких методів, що залучають сплайсингування послідовностей гена людського імуноглобуліну до інших послідовностей ДНК. Такі рекомбінантні людські антитіла мають варіабельні та константні ділянки, одержані із послідовностей людського імуноглобуліну ембріонального типу.

Згадане словосполучення "рекомбінантна клітина-хазяїн" (або просто "клітина-хазяїн") означає клітину, до якої було введено рекомбінантний вектор експресії. Слід розуміти, що такі терміни мають відношення не тільки до конкретної цільової клітини, але і до нащадків такої клітини. Оскільки певні модифікації можуть відбуватись у подальших генераціях унаслідок мутації або впливів навколишнього середовища, такі нащадки можуть фактично не бути ідентичними до батьківської клітини, однак вони, незважаючи на це, включаються до обсягу згаданого терміну "клітина-хазяїн", який використовується у цьому описі.

Рекомбінантні людські антитіла можуть також піддаватись мутагенезу *in vitro* (або, у разі використання тварин, трансгенних за послідовностями людського Ig, соматичному мутагенезу *in vivo*), і, таким чином, амінокислотні послідовності ділянок HCVR та LCVR рекомбінантних антитіл є послідовностями, які, незважаючи на те, що були одержані від послідовностей, пов'язаних із послідовностями людських зародкових HCVR та LCVR, можуть, природно, не існувати у межах зародкового набору людських антитіл *in vivo*.

Можуть використовуватись трансгенні тварини (наприклад, миші), які є здатними, після імунізації, до продукування повного набору людських антитіл за відсутності продукування ендогенних імуноглобулінів. Наслідком перенесення згаданого набору людських імуноглобулінових генів зародкового типу до таких зародкових мишей-мутантів буде продукування людських антитіл у разі введення антигену (дивись, наприклад, Якобовіц (Jakobovits) та інші, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-2555, (1993); Якобовіц (Jakobovits) та інші, *Nature*, 362:255-258, (1993); Брюггеманн (Bruggemann) та інші, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); *Nature*, 148:1547-1553 (1994); *Nature Biotechnology*, 14:826 (1996); Гросс Дж.А. (Gross J.A.) та інші, *Nature*, 404:995-999 (2000); та патенти США №5,877,397, 5,874,299, №5,814,318, №5,789,650, №5,770,429, №5,661,016, №5,633,425, № 5,625,126, № 5,569,825 та № 5,545,806 (кожен з яких включено до цього опису у повному обсязі як посилання для будь-яких цілей)). Людські антитіла можуть також продукуватись у бібліотеках фагів (Хугенбум (Hoogenboom) та Вінтер (Winter), *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1992); Маркс (Marks) та інші, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Для одержання людських моноклональних антитіл доступними є методи Коул (Cole) та інших і Бернер (Boerner) та інших (Коул (Cole) та інші, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therap.*, Алан Р. Лісс (Alan R. Liss), стор. 77 (1985) та Бернер (Boerner) та інші, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)).

Термін "контейнер" означає будь-яку посудину та пакунок, придатні для збереження, транспортування, розподілення та/або маніпулювання з фармацевтичним продуктом.

Словосполучення "пакувальний матеріал" означає зручний для покупця пристрій, що забезпечує можливість зручного введення та/або допоміжні пристрої, які допомагають під час доставки, роз'яснювальної роботи та/або введення. Пакувальний матеріал може поліпшувати введення антитіла пацієнту, зменшувати або підвищувати ефективність роз'яснювального інструкування пацієнта, надавати основу для підвищення ефективності досліджень витрат на охорону здоров'я та/або обмежувати навантаження на канали розподілу. Крім того, пакувальний матеріал може включати (але без обмеження) пакунок на паперовій основі, обгортковий матеріал із термоусадочної плівки, пакунок із прозорою верхньою частиною, купони для замовлення після випробування, роз'яснювальний матеріал, додаткові матеріали та/або засоби для доставки.

Словосполучення "пакувальна вкладка" означає інформацію, що супроводжує продукт, у якій наведено опис того, яким чином вводити "згаданий продукт; а також "дані щодо безпечності та ефективності, необхідні для того, щоб лікар, фармаколог та пацієнт могли прийняти базоване на інформації рішення щодо застосування згаданого продукту та/або для надання пацієнту роз'яснювальної інформації. Згадана пакувальна вкладка звичайно розглядається як "етикетка" фармацевтичного продукту.

Термін "суб'єкт" означає ссавця; за варіантом, якому віддається перевага, це людина, що потребує лікування. Відносно цього винаходу, суб'єктами, що потребують лікування, є ссавці, які страждають на або є схильними до страждання від розладу, під час якого шкідливою є активність TNFSF13b, наприклад, імунні захворювання, у тому числі автоімунні захворювання та запальні захворювання. До розладів, яким віддають перевагу, належать (але ними не обмежуються) системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит, ювенільний хронічний поліартрит, артрит Ліма, хвороба Крона, неспецифічний виразковий коліт, запальна хвороба кишечника, астма, алергійні захворювання, псоріаз, реакція "трансплантат проти хазяїна", відторгнення трансплантата органа, гостре або хронічне імунопатологічне захворювання, пов'язане із трансплантацією органів, саркоїдоз, інфекційні захворювання, паразитарні захворювання, жіноче безпліддя, автоімунна тромбоцитопенія, автоімунна хвороба щитовидної залози, хронічний лімфоматозний тиреоїдит, сухий кератокон'юнктивіт та різні форми раку, зокрема, лімфоми або мієломи В- чи Т-клітин.

У наведених далі підрозділах наданий докладний опис різних аспектів цього винаходу.

Цей винахід має відношення до людських моноклональних антитіл, що є специфічними до та нейтралізують біоактивні hTNFSF13b поліпептиди. Розкриваються також амінокислотні послідовності важких

та легких ланцюгів антитіл, що є високоспецифічними до та нейтралізують TNFSF13b поліпептиди, з якими вони зв'язуються. Ця висока специфічність надає можливість застосування людських аHга-hTNFSF13b антитіл та людських моноклональних антитіл із подібною специфічністю, як імунотерапевтичних засобів для лікування захворювань, пов'язаних із TNFSF13b.

За одним зі своїх аспектів, цей винахід пропонує ізольоване людське антитіло, що включає щонайменше одну з амінокислотних послідовностей, які відповідають Послідовностям №2, №4, №6, №8, №10, №12, №14 або №16, і яке зв'язує антигенну детермінанту TNFSF13b поліпептиду з високою афінністю, відокремлюється від зв'язаного TNFSF13b поліпептиду з низькою константою дисоціації  $K_{off}$  на рівні  $1 \times 10^{-4} \text{с}^{-1}$  або менше, та має здатність до антагонізування активності TNFSF13b поліпептиду. За одним із варіантів втілення, згадане анти-hTNFSF13b людське антитіло включає поліпептид, вибраний з групи, що включає: CDR1 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №4; CDR2 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №6; CDR3 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №8; CDR1 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №12; CDR2 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №14; та CDR3 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №16. За іншим варіантом втілення, згадане анти-hTNFSF13b людське антитіло включає щонайменше два поліпептиди, вибрані з групи, що включає: CDR1 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №4; CDR2 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №6; CDR3 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №8; CDR1 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №12; CDR2 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №14; та CDR3 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №16. За іншим варіантом втілення, згадане анти-hTNFSF13b людське антитіло включає щонайменше три поліпептиди, вибрані з групи, що включає: CDR1 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №4; CDR2 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №6; CDR3 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №8; CDR1 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №12; CDR2 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №14; та CDR3 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №16. За іншим варіантом втілення, згадане анти-hTNFSF13b людське антитіло включає щонайменше чотири поліпептиди, вибрані з групи, що включає: CDR1 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №4; CDR2 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №6; CDR3 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №8; CDR1 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №12; CDR2 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №14; та CDR3 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №16. За іншим варіантом втілення, згадане анти-hTNFSF13b людське антитіло включає щонайменше п'ять поліпептидів, вибраних із групи, що включає: CDR1 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №4; CDR2 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №6; CDR3 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №8; CDR1 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №12; CDR2 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №14; та CDR3 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №16. За іншим варіантом втілення, згадане анти-hTNFSF13b людське антитіло включає поліпептиди: CDR1 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності № 4; CDR2 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №6; CDR3 поліпептид LCVR, який відповідає Послідовності №8; CDR1 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №12; CDR2 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №14; та CDR3 поліпептид HCVR, який відповідає Послідовності №16.

За варіантом, якому віддається більша перевага, згадане анти-hTNFSF13b людське антитіло включає поліпептид варіабельної ділянки легкого ланцюга (LCVR), який відповідає Послідовності №2 або поліпептид варіабельної ділянки важкого ланцюга (HCVR), який відповідає Послідовності №10. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, згадане анти-hTNFSF13b людське антитіло включає LCVR поліпептид, який відповідає Послідовності №2 та HCVR поліпептид, який відповідає Послідовності №10.

За варіантами, яким віддається перевага, ізольоване людське антитіло відокремлюється від зв'язаного TNFSF13b поліпептиду з константою дисоціації  $K_{off}$  на рівні  $5 \times 10^{-5} \text{с}^{-1}$  або менше і пригнічує TNFSF13b-індуковану проліферацію у реакції нейтралізації *in vitro* з  $IC_{50} 1 \times 10^{-7} \text{М}$  або менше. За варіантами, яким віддається більша перевага, ізольоване людське антитіло відокремлюється від зв'язаної антигенної детермінанти TNFSF13b поліпептиду з константою дисоціації  $K_{off}$  на рівні  $5 \times 10^{-5} \text{с}^{-1}$  або менше і пригнічує TNFSF13b-індуковану проліферацію у реакції нейтралізації *in vitro* з  $IC_{50} 1 \times 10^{-8} \text{М}$  або менше. За варіантами, яким віддається ще більша перевага, ізольоване людське антитіло відокремлюється від зв'язаного TNFSF13b поліпептиду з константою кінетичної дисоціації  $K_{off}$  на рівні  $5 \times 10^{-6} \text{с}^{-1}$  або менше і пригнічує TNFSF13b-індуковану проліферацію у реакції нейтралізації *in vitro* з  $IC_{50} 1 \times 10^{-9} \text{М}$  або менше. Прикладами анти-TNFSF13b людських антитіл, що задовольняють вищезгаданим кінетичним та нейтралізаційним критеріям, є 4A5-3.1.1-B4 антитіла.

Анти-hTNFSF13b людським антитілом за цим винаходом, якому віддається найбільша перевага, є 4A5-3.1.1-B4. 4A5-3.1.1-B4 має послідовності LCVR та HCVR поліпептидів, які відповідають Послідовностям №2 та №10, відповідно. Полінуклеотидна послідовність, що кодує LCVR та HCVR 4A5-3.1.1-B4 антитіла відповідає Послідовностям №1 та №9, відповідно. Властивості анти-hTNFSF13b людських антитіл за цим винаходом конкретно розкриваються у Прикладах. Особливої уваги заслуговує висока афінність до TNFSF13b поліпептиду, повільна кінетика дисоціації та висока здатність до антагонізування активності TNFSF13b поліпептиду, що демонструється 4A5-3.1.1-B4.

$K_{off}$  анти-hTNFSF13b людського антитіла може визначатись за поверхневим плазмонним резонансом, як у загальному вигляді описано у Прикладі 4. Взагалі, під час аналізу поверхневого плазмонного резонансу у масштабі реального часу визначають зв'язувальні взаємодії між лігандом (рекомбінантний TNFSF13b поліпептид, іммобілізований на біосенсорній матриці) та досліджуваною речовиною (антитіла у розчині). Інтенсивність цих взаємодій визначають за поверхневим плазмонним резонансом (SPR) із застосуванням системи BIAcore (Pharmacia Biosensor, Piscataway, штат Нью-Джерсі). SPR аналіз може здійснюватись також шляхом іммобілізації досліджуваної речовини (антитіла на біосенсорній матриці) і презентації ліганду (рекомбінантного TNFSF13b у розчині).

За одним із своїх аспектів, цей винахід спрямований також на лінії клітин, що продукують анти-hTNFSF13b

людські антитіла за цим винаходом. Виділення ліній клітин, що продукують моноклональні антитіла за цим винаходом, може здійснюватись за допомогою стандартних методів пошуку, відомих у цій галузі. Гібридома, що продукує анти-hTNFSF13b людське антитіло за цим винаходом, була депонована до ATCC (Американська колекція типових культур) (ATCC PTA-3674), як розкривається у цьому описі.

Для експресії антитіл за цим винаходом можуть застосовуватись найрізноманітніші хазяйські системи експресії, у тому числі бактеріальні, дріжджові, бакуловірусні, рослинні та ссавцеві системи експресії (а також системи експресії фагів). Прикладом придатного вектора експресії на основі бактеріального геному є рUC119 (Sfi). У цій галузі відомі також інші системи експресії антитіл, які розглядаються у цьому описі.

Антитіло за цим винаходом можна одержати шляхом рекомбінантної експресії генів легких та важких імуноглобулінових ланцюгів у клітині-хазяїні. Для рекомбінантної експресії антитіла, клітина-хазяїн трансфікується одним або декількома рекомбінантними векторами експресії, що несуть фрагменти ДНК, які кодують легкі та важкі імуноглобулінові ланцюги антитіла таким чином, що згадані легкі та важкі ланцюги експресуються у клітині-хазяїні. За варіантом, якому віддають перевагу, рекомбінантні антитіла секретуються до середовища, у якому культивуються клітини-хазяї, і з цього середовища згадані антитіла можуть виділятися. Для одержання генів важких та легких ланцюгів антитіла, включення цих генів до рекомбінантних векторів експресії та введення згаданих векторів до клітин-хазяїв вдаються до стандартних методів рекомбінантних ДНК.

Ізольована ДНК, що кодує HCVR ділянку, може перетворюватись на непроцесований ген важкого ланцюга шляхом функціонального зчеплення ДНК, що кодує HCVR, з іншою молекулою ДНК, що кодує константні ділянки важкого ланцюга (CH1, CH2 та CH3). Послідовності ДНК людських генів константних ділянок важких ланцюгів є відомими у цій галузі і фрагменти ДНК, що включають ці ділянки, можна одержати шляхом стандартної ПЛР-ампліфікації. Константною ділянкою важкого ланцюга може бути константна ділянка IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM або IgD та будь-який алотиповий варіант, як описано у роботі Кабат (Kabat) та інші, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication 91-3242 (1991), однак за варіантом, якому віддається найбільша перевага, це константна ділянка IgG1 або IgG4. За альтернативним варіантом частиною антитіла може бути Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub> або одноланцюговий F<sub>v</sub>-фрагмент. Для одержання Fab-фрагмента гена важкого ланцюга, ДНК, що кодує HCVR, може функціонально зчеплюватись з іншою молекулою ДНК, що кодує лише константну ділянку CH1 важкого ланцюга.

Ізольована ДНК, що кодує LCVR ділянку, може перетворюватись на непроцесований ген легкого ланцюга (а також на ген Fab-фрагмента легкого ланцюга) шляхом функціонального зчеплення ДНК, що кодує LCVR, з іншою молекулою ДНК, що кодує константну ділянку легкого ланцюга, CL. Послідовності ДНК людських генів константних ділянок легких ланцюгів є відомими у цій галузі і фрагменти ДНК, що включають ці ділянки, можна одержати шляхом стандартної ПЛР-ампліфікації. Константною ділянкою легкого ланцюга може бути константна ділянка каппа або лямбда.

Для одержання гена scFV, фрагменти ДНК, що кодують HCVR та LCVR, функціонально зчіплюють з іншим фрагментом, що кодує гнучкий лінкер, наприклад, фрагментом, що кодує амінокислотну послідовність Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (Gly4-Ser)<sub>3</sub>, таким чином, що HCVR та LCVR послідовності можуть експресуватись як суміжний одноланцюговий білок з LCVR та HCVR ділянками, які з'єднуються гнучким лінкером (дивись, наприклад, Берд (Bird) та інші, Science, 242:423-426 (1988); Хьюстон (Huston) та інші, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883 (1988); Маккафферті (McCafferty) та інші, Nature, 348:552-554 (1990)).

Для експресії антитіл за цим винаходом, ДНК, що кодують неповні або повномірні легкі та важкі ланцюги, які одержали, як було описано вище, вставляють до векторів експресії таким чином, що згадані гени функціонально зчіплюються з транскрипційними та трансляційними регуляторними послідовностями. Згаданий антитіло-кодуючий ген лігується до вектора таким чином, що транскрипційні та трансляційні регуляторні послідовності у межах згаданого вектора здійснюють свою визначену функцію регулювання транскрипції та трансляції згаданого антитіло-кодуючого гена. Згаданий вектор експресії та регуляторні послідовності експресії вибирають таким чином, щоб вони були сумісними з тими експресуючими клітинами-хазяями, які використовуються. Ген легкого ланцюга антитіла та ген важкого ланцюга антитіла може вставлятись до окремого вектора або, що є більш типовим, обидва гени вставляють до одного і того самого вектора експресії. Антитіло-кодуючі гени вставляють до вектора експресії стандартними методами (наприклад, шляхом лігування комплементарних сайтів рестрикції на фрагменті антитіло-кодуючого гена та вектора або шляхом лігування тупих кінців у разі відсутності сайтів рестрикції). На додаток до цього або альтернативно, рекомбінантний вектор експресії може кодувати сигнальний пептид, що полегшує секрецію ланцюга анти-hTNFSF13b людського антитіла з клітини-хазяїна. Ген ланцюга анти-hTNFSF13b людського антитіла може клонуватись до вектора таким чином, що сигнальний пептид зчіплюється у межах рамки читування з аміно-кінцем гена ланцюга антитіла. Згаданий сигнальний пептид може бути імуноглобуліновим сигнальним пептидом або гетерологічним сигнальним пептидом (тобто сигнальним пептидом від неімуноглобулінового білка).

Окрім генів ланцюгів антитіла, рекомбінантні вектори експресії за цим винаходом несуть регуляторні послідовності, які контролюють експресію генів ланцюгів антитіла у клітині-хазяїні. Регуляторні послідовності включають промотори, енхансери та інші елементи контролю експресії (наприклад, сигнали поліаденілювання), які контролюють транскрипцію або трансляцію згаданих генів ланцюгів антитіла. Фахівцям у цій галузі техніки буде зрозуміло, що конструювання вектора експресії, з включенням вибору регуляторних послідовностей, може залежати від таких факторів, як вибір клітини-хазяїна до трансформування, рівня експресії потрібного білка тощо. Регуляторні послідовності, яким віддається перевага, для експресії у клітині-хазяїні ссавця включають вірусні елементи, які спрямовують високі рівні експресії білка у клітинах ссавця, наприклад, промотори та/або енхансери, одержані від цитомегаловірусу (CMV) (наприклад, CMV промотор/енхансер), вірусу мавп 40 (SV40) (наприклад, SV40 промотор/енхансер), аденовірусу (наприклад, головний пізній промотор аденовірусу (AdMLP)) та поліоми.

Окрім генів ланцюгів антитіла та регуляторних послідовностей, рекомбінантні вектори експресії за цим винаходом можуть нести додаткові послідовності, наприклад, послідовності, що регулюють реплікацію згаданого вектора у клітинах-хазяях (наприклад, точки ініціювання реплікації) та гени селектованих маркерів. Ген селектованих маркерів полегшує відбір клітин-хазяїв, до яких було введено згаданий вектор. Наприклад, ген селектованого маркера, як правило, наділяє стійкістю до лікарських засобів, наприклад, G418, гідроміцину або метотрексату, клітину-хазяїна, до якої було введено згаданий вектор. До генів селектованих маркерів, яким віддається перевага, належить ген дигідрофолатредуктази (DHFR) (для застосування, у dhfr-клітинах-хазяях із селекцією/ампліфікацією метотрексатом) та нео ген (для селекції G418).

Для експресії легких та важких ланцюгів, вектор(-и) експресії, що кодує важкі та легкі ланцюги, трансфікується до клітини-хазяїна за стандартними методами. Різні форми згаданого терміну "трансфекція" призначені для охоплення найрізноманітніших методів, які широко застосовуються для введення екзогенної ДНК до прокаріотичної або еукаріотичної клітини-хазяїна, наприклад, електропорації, осадження фосфатом кальцію, трансфекції DEAE (діетиламіноетил)-декстраном тощо. Незважаючи на існування теоретичної можливості експресії антитіл за цим винаходом у прокаріотичних або еукаріотичних клітинах-хазяях, найбільша перевага віддається експресії антитіл у еукаріотичних клітинах, із віданням найбільшої переваги клітинам-хазяям ссавців, оскільки такі еукаріотичні клітини, і, зокрема, клітини ссавців, є більш ймовірно, ніж прокаріотичні клітини, здатними до складання та секретування відповідним чином укладеного та імунологічно активного антитіла. До клітин-хазяїв ссавців, яким віддається перевага для експресії рекомбінантних антитіл за цим винаходом, належать клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO клітини) (у тому числі dhfr-CHO клітини, опис яких наведено у Урлауб (Urlaub) та Чезін (Chasin), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216-4220 (1980), які застосовуються з DHFR селектованим маркером, як описано, наприклад, у Р.Дж. Кауфман (R.J. Kaufman) та П.А. Шарп (P.A. Sharp), Mol. Biol., 159:601-621 (1982)), клітини мієломи NS0, клітини COS (клітини яєчника мавп) та клітини SP2. Коли рекомбінантні вектори експресії, що кодують антитіло-кодуючі гени, вводяться до клітин-хазяїв ссавців, згадані антитіла продукуються шляхом культивування згаданих клітин-хазяїв впродовж періоду часу, достатнього для надання можливості експресії антитіла у клітинах-хазяях або, за варіантом, якому віддається більша перевага, секретування антитіла до культурального середовища, у якому вирощуються клітини-хазяї. Антитіла можуть виділятися зі згаданого культурального середовища за допомогою стандартних методів очищення білка.

Клітини-хазяї можуть також застосовуватись для продукування частин інтактних антитіл, наприклад, Fab-фрагментів молекул scFV. Слід розуміти, що варіації вищезгаданої процедури входять до обсягу цього винаходу.

Наприклад, може виникнути потреба трансфікування клітини-хазяїна ДНК, що кодує легкий ланцюг або важкий ланцюг (але не обидва) антитіла за цим винаходом. Методи рекомбінантних ДНК можуть також застосовуватись для видалення деякої частини або усієї ДНК, що кодує будь-який або обидва ланцюги (легкий та важкий), яка не є необхідною для зв'язування з hTNFSF13b. Молекули, що експресуються такими "скороченими" молекулами ДНК також входять до числа антитіл за цим винаходом. У одній із систем рекомбінантної експресії антитіла за цим винаходом, рекомбінантний вектор експресії, що кодує як важкий ланцюг антитіла, так і легкий ланцюг антитіла, вводять до dhfr-CHO клітин шляхом трансфекції, що опосередковується фосфатом кальцію. Кожен із генів важкого та легкого ланцюгів антитіла у межах рекомбінантного вектора експресії функціонально зчіплюється з енхансерними/промоторними регуляторними елементами (наприклад, одержаними з SV40, CMV, аденовірусу тощо, наприклад, CMV енхансерний/AdMLP промоторний регуляторний елемент або SV40 енхансерний/AdMLP промоторний регуляторний елемент) для стимулювання високих рівнів транскрипції цих генів. Згаданий рекомбінантний вектор експресії також несе DHFR ген, який надає можливість селекції CHO клітин, які були трансфіковані згаданим вектором із застосуванням селекції/ампліфікації метотрексатом. Відібрані трансформовані клітини-хазяї культивуються для забезпечення можливості експресії важких та легких ланцюгів антитіла і інтактне антитіло виділяють із культурального середовища. Для одержання рекомбінантного вектора експресії, трансфікування клітин-хазяїв, відбирання трансформованих клітин-хазяїв, культивування клітин-хазяїв та виділення антитіла з культурального середовища застосовують стандартні молекулярно-біологічні методи. Антитіла або їх антиген-зв'язувальні домени за цим винаходом можуть бути експресовані у тварині (наприклад, миші), яка є трансгенною за людськими генами імуноглобуліну (дивись, наприклад, Тейлор Л.Д. (Taylor L.D.) та інші, Nucl. Acids Res., 20:6287-6295 (1992)). Рослинні клітини також можуть бути модифіковані для одержання трансгенних рослин, які експресують антитіло або його антиген-зв'язувальний домен за цим винаходом.

Приймаючи до уваги вищенаведене, інший аспект цього винаходу має відношення до нуклеїнових кислот, векторів та композицій, що містять клітини-хазяї, які можуть застосовуватись для рекомбінантної експресії антитіл та фрагментів антитіл за цим винаходом. За варіантом, якому віддається перевага, відмітною ознакою цього винаходу є ізолювані нуклеїнові кислоти, які кодують гіперваріабельні ділянки 4A5-3.1.1-B4 або повні варіабельні ділянки важких та/або легких ланцюгів 4A5-3.1.1-B4. Відповідно, за одним із варіантів втілення, відмітною ознакою цього винаходу є ізолювана нуклеїнова кислота, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла, яка кодує гіперваріабельну ділянку 3 (CDR3) важкого ланцюга 4A5-3.1.1-B4, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №16. За варіантом, якому віддається перевага, нуклеїнова кислота, яка кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла, додатково кодує гіперваріабельну ділянку 2 (CDR2) важкого ланцюга 4A5-3.1.1-B4, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №14. За варіантом, якому віддається більша перевага, нуклеїнова кислота, яка кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла, додатково кодує гіперваріабельну ділянку 1 (CDR1) важкого ланцюга 4A5-3.1.1-B4, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №12. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, ізолювана нуклеїнова кислота кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №10 (повна HCVR ділянка 4A5-3.1.1-B4).

За іншими варіантами втілення відмітною ознакою цього винаходу є ізолювана нуклеїнова кислота, що

кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла, яка кодує гіперваріабельну ділянку 3 (CDR3) легкого ланцюга 4A5-3.1.1-B4, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №8. За варіантом, якому віддається перевага, нуклеїнова кислота, яка кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла, додатково кодує гіперваріабельну ділянку 1 (CDR1) легкого ланцюга 4A5-3.1.1-B4, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №4. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, ізольована нуклеїнова кислота кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №2 (повна LCVR ділянка 4A5-3.1.1-B4).

За іншими варіантами втілення відмітною ознакою цього винаходу є ізольована нуклеїнова кислота, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла, яка кодує гіперваріабельну ділянку 3 (CDR3) легкого ланцюга 4A5-3.1.1-B4, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №8. За варіантом, якому віддається перевага, нуклеїнова кислота, яка кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла, додатково кодує гіперваріабельну ділянку 1 (CDR1) легкого ланцюга 4A5-3.1.1-B4, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №4. За варіантом, якому віддається ще більша перевага, ізольована нуклеїнова кислота кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №2 (повна LCVR ділянка 4A5-3.1.1-B4).

За іншим варіантом втілення цей винахід пропонує ізольовану нуклеїнову кислоту, що кодує гіперваріабельну ділянку 3 (CDR3) важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №16 (тобто CDR3 HCVR 4A5-3.1.1-B4). Ця нуклеїнова кислота може кодувати лише ділянку CDR3 або, за варіантом, якому віддається більша перевага, кодує повну варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла (HCVR). Наприклад, згадана нуклеїнова кислота може кодувати HCVR, що має ділянку CDR2, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №14 (тобто CDR2 HCVR 4A5-3.1.1-B4) та ділянку CDR1, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №12 (тобто CDR1 HCVR4A5-3.1.1-B4).

За ще іншим варіантом втілення цей винахід пропонує ізольовану нуклеїнову кислоту, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №2 (тобто LCVR 4A5-3.1.1-B4). За варіантом, якому віддається перевага, ця нуклеїнова кислота включає нуклеотидну послідовність, яка відповідає Послідовності №1, хоча досвідченому фахівцю буде зрозуміло, що завдяки виродженню генетичного коду амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №2, можуть кодувати інші нуклеотидні послідовності. Згадана нуклеїнова кислота може кодувати лише LCVR або може також кодувати константну ділянку легкого ланцюга антитіла, функціонально зчеплену з LCVR. За одним із варіантів втілення, цією нуклеїновою кислотою є рекомбінантний вектор експресії.

За ще іншим варіантом втілення цей винахід пропонує ізольовану нуклеїнову кислоту, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №10 (тобто HCVR 4A5-3.1.1-B4). За варіантом, якому віддається перевага, ця нуклеїнова кислота включає нуклеотидну послідовність, яка відповідає Послідовності №9, хоча досвідченому фахівцю буде зрозуміло, що завдяки виродженню генетичного коду амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності №10, можуть кодувати інші нуклеотидні послідовності. Згадана нуклеїнова кислота може кодувати лише HCVR або може також кодувати константну ділянку важкого ланцюга антитіла, функціонально зчеплену з HCVR. Наприклад, згадана нуклеїнова кислота може включати константну ділянку IgG1 або IgG4. За одним із варіантів втілення, цією нуклеїновою кислотою є рекомбінантний вектор експресії.

Пересічним фахівцям у цій галузі зрозуміло, що наслідком модифікацій амінокислотної послідовності згаданого антитіла може бути антитіло з еквівалентними або вищими функціональними характеристиками, порівняно з вихідним антитілом. Зміни у антитілах за цим винаходом можуть включати одну або декілька амінокислотних вставок, делецій, замін, укорочень, злиття тощо унаслідок природних мутацій або людської маніпуляції. Цей винахід охоплює антитіла, які розкриваються у цьому описі, а також додатково включає одну або декілька амінокислотних замін, за умови, що замінені антитіла мають по суті таку саму (або поліпшену чи послаблену, у залежності від потреби) активність (активності), що і антитіла, які розкриваються у цьому описі. За варіантом, якому віддається перевага, гіперваріабельна ділянка (CDR) за цим винаходом має 3 або менше консервативних замін. За варіантом, якому віддається перевага, гіперваріабельна ділянка (CDR) за цим винаходом має 2 або менше консервативних замін. За варіантом, якому віддається перевага, гіперваріабельна ділянка (CDR) за цим винаходом має одну консервативну заміну. Досвідченому фахівцю буде зрозуміло, що антитіла, які мають консервативні амінокислотні заміни, можуть одержуватись різноманітними способами, відомими у цій галузі. Наприклад, може застосовуватись ряд методів мутагенезу, у тому числі постановка полімеразно-ланцюгової реакції, олігонуклеотид-спрямований мутагенез із застосуванням тіофосфату (Amersham Sculptor kit) та за методом Кункеля (Kunkel (dut-ung-))

У Таблиці 1 показані прийнятні консервативні заміни, а також заміни, яким віддається перевага.

Таблиця 1

#### Консервативні заміни

Залишок	Заміни	Заміна, якій віддається перевага
Ala (A)	gly, val, leu, ile, ser, met, thr	Val
Arg (R)	lys, gln, asn, his	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn

Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Ala, ile, leu, pro, ser, met, val, val	Ala
His (H)	Asn, gln, lys, arg	Arg
Ile (I)	Leu, val, met, ala, phe, norleucine	Leu
Leu (L)	norleucine, ile, val, met, ala, phe	Ile
Lys (K)	Arg, gln, asn, his	Arg
Met (M)	Ala, gly, ile, leu, phe, ser, val	Leu
Phe (F)	Leu, val, ile, ala, trp, tyr	Tyr
Pro (P)		
Ser (S)	Ala, gly, ile, leu, met, thr, val	Thr
Thr (T)	Ala, gly, ile, leu, met, ser, val	Ser
Trp (W)	tyr, phe	Tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	Phe
Val (V)	Ala, ile, leu, met, ser, met, norleu	Leu

Цей винахід пропонує також рекомбінантні вектори експресії, які кодують антитіло, що включає поліпептид, вибраний з групи, до складу якої входять поліпептид, який відповідає Послідовності №2; поліпептид, який відповідає Послідовності №4; поліпептид, який відповідає Послідовності №6; поліпептид, який відповідає Послідовності №8; поліпептид, який відповідає Послідовності №10; поліпептид, який відповідає Послідовності №12; поліпептид, який відповідає Послідовності №14; поліпептид, який відповідає Послідовності №16.

Цей винахід пропонує також рекомбінантні вектори експресії, як кодують як важкий ланцюг антитіла, так і легкий ланцюг антитіла. Наприклад, за одним із варіантів втілення, цей винахід пропонує рекомбінантний вектор експресії, який кодує:

а) важкий ланцюг антитіла, що має варіабельну ділянку, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності № 10; та

б) легкий ланцюг антитіла, що має варіабельну ділянку, яка включає амінокислотну послідовність, яка відповідає Послідовності № 2.

Після завершення експресії, антитіла у повному об'ємі, їхні димери, окремі легкі та важкі ланцюги або інші імуноглобулінові форми за цим винаходом можуть очищатись за стандартними методиками цієї галузі, у тому числі шляхом осадження за допомогою сульфату амонію, засобами іонообмінної хроматографії, афінної хроматографії, хроматографії з оберненою фазою, хроматографії на колонках із гідрофобною взаємодією, електрофорезу у гелі тощо. Для застосування у фармацевтичних цілях перевага віддається по суті чистим імуноглобулінам з щонайменше приблизно 90-95% гомогенністю, і найбільша перевага віддається 98-99% або вищому рівню гомогенності. Після завершення очищення з досягненням часткової або повної гомогенності, поліпептиди можуть застосовуватись у терапевтичних або профілактичних цілях, як вказується у цьому описі.

Антитіла за цим винаходом можуть включатись до складу фармацевтичних композицій, придатних для введення суб'єкту. За типовим варіантом фармацевтична композиція містить антитіло або частину антитіла за цим винаходом і фармацевтично прийнятний розчинник, носій та/або наповнювач. Фармацевтичні композиції для введення розробляються таким чином, щоб бути придатними для вибраного способу введення, фармацевтично прийнятні розчинники, носій та/або наповнювачі, наприклад диспергуючі агенти, буферні розчини, поверхнево-активні речовини консерванти, солюбілізуювальні агенти, агенти для регулювання ізотонічності стабілізатори тощо застосовуються відповідним чином.

Фармацевтична композиція, що містить анти-hTNFSF13b людське антитіло за цим винаходом, може вводиться ссавцю з підвищеним ризиком або такому, що демонструє патологію або симптоми, пов'язані з аутоімунним захворюванням, наприклад, системним червоним вовчаком, за допомогою стандартних способів введення внутрішньовенним, внутрішньоочеревинним підшкірним, легеневим, черезшкірним, внутрішньом'язовим, інтраназальним, суббукальним, сублінгвальним шляхом або за допомогою супозиторіїв.

Антитіла за цим винаходом можуть включатись до складу фармацевтичної композиції, придатної для парентерального введення. Перевага віддається периферичній системній доставці шляхом внутрішньовенної, внутрішньоочеревинної або підшкірної ін'єкції. Придатні носії для таких ін'єкцій є простими. Окрім того, однак, введення можуть здійснюватись також через слизові оболонки за допомогою інтраназальних аерозолів або супозиторіїв. Придатні лікарські форми для таких способів введення є добре відомими і, як правило, містять поверхнево-активні речовини, які полегшують перенесення через мембрани.

Фармацевтичні композиції, за типовим варіантом, повинні бути стерильними і стійкими за умов виготовлення та збереження. Таким чином, фармацевтичні композиції можуть піддаватись стерильній фільтрації після одержання лікарської форми або їхня мікробіологічна прийнятність може забезпечуватись іншим чином. Типова композиція для внутрішньовенного вливання може містити до 250мл рідини, наприклад, стерильного розчину Рінгера-Локка з концентрацією антитіл 1-100мг/мл. Терапевтичні агенти за цим винаходом можуть усі заморожуватись або ліофілізуватись для збереження і відновлюватись у придатному стерильному носії перед застосуванням. Наслідком ліофілізації та відновлення може бути різний ступінь втрати активності антитіл (наприклад, зі стандартними імуноглобулінами, IgM антитіла мають схильність до більшої втрати активності, аніж IgG антитіла). Для того, щоб компенсувати деяку втрату активності, може виникнути необхідність регулювання дози рН композиції, буде підбиратись таким чином, щоб врівноважити стійкість антитіл (хімічну та фізичну) і забезпечити зручність для пацієнта при введенні. Взагалі, прийнятним є рН у межах від 6 до 8.

TNFSF13b відіграє критичну роль у патології, пов'язаній з цілим рядом захворювань, що залучають імунні та запальні фактори. Таким чином фармацевтична композиція, що містить анти-hTNFSF13b людське антитіло за цим винаходом, може застосовуватись для лікування захворювань, у яких активність hTNFSF13b є

шкідливою, наприклад, імунопатологічних захворювань, у тому числі автоімунних захворювань та запальних захворювань.

До розладів, яким віддають перевагу, належать (але ними не обмежуються) системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит, ювенільний хронічний поліартрит, артрит Ліма, хвороба Крона, неспецифічний виразковий коліт, запальна хвороба кишечника, астма, алергійні захворювання, псоріаз, реакція "трансплантат проти хазяїна", відторгнення-трансплантата органа, гостре або хронічне імунопатологічне захворювання, пов'язане з трансплантацією органів, саркоїдоз, інфекційні захворювання, паразитарні захворювання, жіноче безпліддя, автоімунна тромбоцитопенія, автоімунна хвороба щитовидної залози, хронічний лімфоматозний тиреоїдит, сухий кератокон'юнктивіт та різні форми раку, зокрема, лімфоми або міеломи В- чи Т-клітин.

За варіантом, якому віддається більша перевага, фармацевтична композиція, що містить анти-hTNFSF13b людське антитіло та/або фрагмент антитіла за цим винаходом, застосовується для лікування системного червоного вовчака.

Цим винаходом передбачається також застосування анти-hTNFSF13b людського антитіла за цим винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування щонайменше одного із вищезгаданих розладів, при якому шкідливою є активність TNFSF13b.

У певних ситуаціях антитіло за цим винаходом буде включатись до складу однієї композиції і вводитись разом з одним або декількома додатковими терапевтичними агентами, які застосовуються для лікування автоімунних та/або запальних захворювань. Перевагою таких комбінованих способів лікувального впливу може бути застосування менших- доз терапевтичних агентів, що вводяться, завдяки чому запобігаються можливі токсикози або ускладнення, пов'язані зі способами лікувального впливу із застосуванням одного лікарського засобу. Досвідченим фахівцем буде зрозуміло, що у разі застосування антитіла за цим винаходом як складової комбінованого способу лікувального впливу, придатною може виявитись менша доза антитіла, аніж у тому разі, коли суб'єкту вводять лише антитіло (наприклад, завдяки застосуванню комбінованого способу лікувального впливу може досягатись синергічний терапевтичний ефект, що, у свою чергу, дозволяє застосовувати меншу дозу антитіла для досягнення потрібного терапевтичного ефекту).

Фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть містити "терапевтично ефективну кількість" або "профілактично ефективну кількість" антитіла за цим винаходом. Словосполучення "терапевтично ефективна кількість" означає кількість, ефективну, у дозах та впродовж необхідних періодів часу, для досягнення необхідного терапевтичного результату. Терапевтично ефективна кількість антитіла може змінюватись у залежності від таких факторів, наприклад, як хворобливий стан, вік, стать, маса індивіда та здатність антитіла або частини антитіла викликати необхідну реакцію у згаданого індивіда. Терапевтично ефективною кількістю є також кількість, при якій токсичні або шкідливі ефекти антитіла або частини антитіла, які вона містить, переважаються терапевтично благотворними ефектами. Словосполучення "профілактично ефективна кількість" означає кількість, ефективну, у дозах та впродовж необхідних періодів часу, для досягнення необхідного профілактичного результату. За типовим варіантом, оскільки профілактична доза застосовується на суб'єктах перед або на ранній стадії захворювання, профілактично ефективна кількість буде меншою, аніж терапевтично ефективна кількість.

Схема приймання лікарського засобу може регулюватись для забезпечення одержання оптимальної бажаної реакції (наприклад, терапевтичної або профілактичної реакції). Наприклад, може вводитись одна ударна доза, декілька невеликих доз, що повторюються через певні періоди часу або доза може бути пропорційно зменшеною або збільшеною у залежності від вимог терапевтичної ситуації.

Приймаючи до уваги їхню здатність до зв'язування із hTNFSF13b, антитіла за цим винаходом можуть застосовуватись для виявлення TNFSF13b поліпептидів (наприклад, у біологічному зразку, наприклад, сироватці або плазмі) за допомогою стандартного імуноаналізу, наприклад, твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA), радіоімуноаналізу (RIA) або імуногістохімічних досліджень. Цей винахід пропонує спосіб виявлення TNFSF13b у біологічному зразку, що включає контактування біологічного зразка з антитілом або частиною антитіла за цим винаходом і виявлення антитіла (або частини антитіла), зв'язаного з hTNFSF13b або незв'язаного антитіла (або частини антитіла) з виявленням, таким чином, hTNFSF13b у біологічному зразку. Згадане антитіло безпосередньо або опосередковано мітиться речовиною, що піддається виявленню, для полегшення виявлення зв'язаного або незв'язаного антитіла. Придатними речовинами, що піддаються виявленню, є різні ферменти, простетичні групи, флуоресцентні матеріали, люмінесцентні матеріали та радіоактивні матеріали. Прикладами придатних ферментів є пероксидаза з хрому, лужна фосфатаза,  $\beta$ -галактозидаза або ацетилхолінестераза; прикладами придатних комплексів простетичних груп є стрептавідин/біотин та авідин/біотин; прикладами придатних флуоресцентних матеріалів є умбеліферон, флуоресцеїн, флуоресцеїну ізотіоціанат, родамін, дихлортриазиніламінофлуоресцеїн, дансилу хлорид або фікоеритрин; прикладом люмінесцентного матеріалу є люмінол; прикладами придатних радіоактивних матеріалів є  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  або  $^3\text{H}$ .

За варіантом, альтернативним міченню антитіла, TNFSF13b може аналізуватись у біологічних рідинах засобами конкурентного імуноаналізу із застосуванням стандартів TNFSF13b, мічених речовиною, що піддається виявленню та неміченого анти-hTNFSF13b людського антитіла. У цьому аналізі, біологічний зразок, мічені стандарти TNFSF13b та анти-hTNFSF13b людське антитіло об'єднуються і визначається кількість міченого стандарту TNFSF13b, яка зв'язалась із неміченим антитілом. Кількість TNFSF13b у біологічному зразку є обернено пропорційною до кількості міченого стандарту TNFSF13b, яка зв'язалась з анти-hTNFSF13b людським антитілом.

За іншим варіантом втілення цей винахід пропонує застосування антитіла, яке нейтралізує активність TNFSF13b шляхом зв'язування з антигенною детермінантою TNFSF13b. Згадана антигенна детермінанта була ідентифікована, як описано у Прикладі 10. Для посилення, розчинна частина hTNFSF13b виглядає таким чином:

## Людський TNFSF13b

```

1 AVQGFEETVT QDCLQLIADS ETPTIQKGSY TFVPWLLSFK 40
41 RGSALLEEKEN KILVKETGYF FIYGVVLYTD KTYAMGHILQ 80
81 RKKVHVFGDE LSLVTLFRCI QNMPETLPNN SCYSAGIAKL 120
121 EEGDELQLAI PRENAQISLD GDVTFFGALK LL 152

```

Амінокислоти hTNFSF13b, залучені до зв'язування нових анти-hTNFSF13b людських антитіл, включають щонайменше одну амінокислоту, вибрану з групи, до складу якої входять: треонін у положенні 69, лізин у положенні 71, треонін у положенні 72, тирозин у положенні 73, глутамінова кислота у положенні 105, треонін у положенні 106, лейцин у положенні 107 та аспарагінова кислота у положенні 109. За іншим варіантом втілення амінокислоти, залучені до зв'язування нових анти-hTNFSF13b людських антитіл, включають щонайменше дві амінокислоти, вибрані з групи, до складу якої входять: треонін у положенні 69, лізин у положенні 71, треонін у положенні 72, тирозин у положенні 73, глутамінова кислота у положенні 105, треонін у положенні 106, лейцин у положенні 107 та аспарагінова кислота у положенні 109. За іншим варіантом втілення амінокислоти, залучені до зв'язування нових анти-hTNFSF13b людських антитіл, включають щонайменше три амінокислоти, вибрані з групи, до складу якої входять: треонін у положенні 69, лізин у положенні 71, треонін у положенні 72, тирозин у положенні 73, глутамінова кислота у положенні 105, треонін у положенні 106, лейцин у положенні 107 та аспарагінова кислота у положенні 109. За іншим варіантом втілення амінокислоти, залучені до зв'язування нових анти-hTNFSF13b людських антитіл, включають щонайменше чотири амінокислоти, вибрані з групи, до складу якої входять: треонін у положенні 69, лізин у положенні 71, треонін у положенні 72, тирозин у положенні 73, глутамінова кислота у положенні 105, треонін у положенні 106, лейцин у положенні 107 та аспарагінова кислота у положенні 109. За іншим варіантом втілення амінокислоти, залучені до зв'язування нових анти-hTNFSF13b людських антитіл, включають лізин у положенні 71, треонін у положенні 72, тирозин у положенні 73 та глутамінову кислоту у положенні 105.

За іншим варіантом втілення амінокислоти, залучені до зв'язування нових анти-hTNFSF13b людських антитіл, включають глутамінову кислоту у положенні 105 і щонайменше одну амінокислоту, вибрану з групи, до складу якої входять: треонін у положенні 69, лізин у положенні 71, треонін у положенні 72 та тирозин у положенні 73. За іншим варіантом втілення амінокислоти, залучені до зв'язування нових анти-hTNFSF13b людських антитіл, включають треонін у положенні 106 і щонайменше одну амінокислоту, вибрану з групи, до складу якої входять: треонін у положенні 69, лізин у положенні 71, треонін у положенні 72 та тирозин у положенні 73. За іншим варіантом втілення амінокислоти, залучені до зв'язування нових анти-hTNFSF13b людських антитіл, включають лейцин у положенні 107 і щонайменше одну амінокислоту, вибрану з групи, до складу якої входять: треонін у положенні 69, лізин у положенні 71, треонін у положенні 72 та тирозин у положенні 73. За іншим варіантом втілення амінокислоти, залучені до зв'язування нових анти-hTNFSF13b людських антитіл, включають аспарагін у положенні 109 і щонайменше одну амінокислоту, вибрану з групи, до складу якої входять: лізин у положенні 71, треонін у положенні 72 та тирозин у положенні 73.

За іншим варіантом втілення амінокислоти, залучені до зв'язування нових анти-hTNFSF13b людських антитіл, включають лізин у положенні 71, треонін у положенні 72, тирозин у положенні 73 та глутамінову кислоту у положенні 105.

Подальші приклади призначені для ілюстрування, а не для обмеження цього винаходу.

Приклад 1: Одержання анти-hTNFSF13b людських моноклональних антитіл

Моноклональні антитіла одержували за технологією HuMAb-Mouse<sup>TM</sup> у медареції (Medarex) шляхом імунізації мишей розчинним hTNFSF13b (амінокислоти 133-285, закуплені від фірми RDI, Flanders, штат Нью-Джерсі). Були використані миші обох ліній: HCo7 та HCo12. Мишей імунізували 15-50мкг розчинного hTNFSF13b у RIBI, повному ад'юванті Фрейнда або неповному ад'юванті Фрейнда. Вісьмом мишам із сироватковими титрами антитіл до hTNFSF13b інтравенно вводили 10мкг hTNFSF13b у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS). Селезінки усіх мишей видаляли через три дні і зливали з мієломними клітинами за методом, опис якого було наведено у роботі Золя (Zola) (Золя Г. (Zola H.), Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques. CRC Press, Boca Raton, FL. (1987)).

Гібридоми випробували на зв'язування з hTNFSF13b і для того, щоб пересвідчитись у тому, що вони експресують важкі та легкі ланцюги людського імуноглобуліну. Зв'язування антитіл з hTNFSF13b виявляли засобами ELISA таким чином:

Планшети сенсibiliзували 50мкл розчину (5мкг/мл) hTNFSF13b у PBS впродовж ночі при температурі 4°C. Після цього планшети випорожнювали і блокували сумішшю 100мкл PBS+0,05% твін 20 (PBST)+5% курячої сироватки впродовж 1год при кімнатній температурі. Після потрібного промивання PBST, планшети висушували і до кожної лунки вносили 100 мкл розбавлених вторинних реактивів (HRP (пероксидаза з хрому)-HulGFC, №109-036-098 за каталогом фірми Jackson або HRP-HuKappa, №A80-115P за каталогом фірм Bethyl; 1:5000 у блокувальному буфері). Після інкубування при кімнатній температурі впродовж 1год планшети тричі промивали як описувалось вище. Планшети проявляли за допомогою 10мл цитратно-фосфатного буфера (pH4,8), 80мкл ABTS (2,2'-азино-ди-(3-етилбензотіазолінсульфонат)), 8мкл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на планшет. Після інкубування впродовж періоду часу від 30хв до 1год при кімнатній температурі, оптичну густину планшетів зчитували при A415-A490. Для субклонування відбирали гібридами, які демонстрували зв'язування з hTNFSF13b і являли собою важкий ланцюг та легкий ланцюг каппа людського IgG.

Культуральні середовища субклованих гібридом концентрували у тангенціальних фільтрувальних системах Amicon ProFlux M12 із застосуванням ультрафільтрувальних мембран Amicon S3Y30 UF. Концентровані живильні середовища пропускали через колонки protein-A Sepharose (колонка 5-20мл) зі швидкістю 5мл/хв. Колонки промивали буфером А (PBS, pH7,4) доти, доки оптична густина не поверталась до вихідного рівня, і зв'язані поліпептиди елюювали 50мМ розчином лимонної кислоти, pH3,2. Фракції негайно нейтралізували 1М трис-буфером, pH8,0. Після цього фракції аналізували шляхом електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE). Фракції, що містили антитіло, об'єднували і концентрували за допомогою центрифугальної фільтрувальної установки Ultrafree (Millipore,

смука пропускання фільтра 10кДа).

Приклад 2: Функціональна активність анти-hTNFSF13b людських антитіл

Нейтралізуючу активність анти-hTNFSF13b людських антитіл за цим винаходом визначали за допомогою лінії мишачих IL-1-залежних В-клітин, T1165.17. Згадані клітини тричі промивали експериментальним живильним середовищем (RPMI1640, що містить 10% FBS (сироватка зародка великої рогатої худоби), 1мМ розчин пірувату натрію,  $5 \times 10^{-5}$ М розчин 2-меркаптоетанолу, пеніцилін, стрептоміцин та фунгізон) для видалення IL-1. Клітини ресуспендували з концентрацією 100000 клітин/мл з експериментальному живильному середовищі, що містило 2,5нг/мл розчинного huTNFSF13b, висівали з концентрацією 5000 клітин/лунку на 96-лунковий планшет і інкубували при температурі 37°C у 5% CO<sub>2</sub>. Супернатанти ELISA-позитивних гібридом включаючи у розведенні 1:4. Через 48год додавали 20мкл розчину Promega CellTiter 96 Aqueous One Solution (Madison, штат Вісконсин) і планшет додатково інкубували впродовж 5 год, при температурі 37°C у 5% CO<sub>2</sub>. Оптичну густину, для визначення проліферації, визначали при А490. Приклад нейтралізуючої активності одного із гібридомних супернатантів, 4A5-3.1.1-B4, показано на Фіг.1. Антитіла, для контролю, додавали до IL-1-стимульованих клітин. Ознак пригнічення IL-1-стимульованої проліферації не спостерігалось, проліферацію стимулював лише hTNFSF13b.

Нейтралізуючі антитіла перевіряли на здатність до пригнічення стимульованої проліферації людських ембріональних В-клітин у відповідь на анти-IgM стимуляцію. Людські ембріональні В-клітини виділяли з людської крові шляхом CD19-позитивної селекції із застосуванням системи магнітної ізоляції MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, штат Каліфорнія). В-клітини вносили до лунок 96-лункового планшета з концентрацією  $2 \times 10^5$  клітин/лунку у повному живильному середовищі RPMI, що містило 10% FCS (повним живильним середовищем RPMI є живильне середовище RPMI1640, що містить 10мМ розчин L-глутаміну, 100Од/мл пеніциліну, 100мкг/мл стрептоміцину, 1мМ розчин пірувату натрію, 0,1мМ розчин замісних амінокислот та  $1 \times 10^{-5}$ М розчин β-меркаптоетанолу). Деякі лунки сенсibiliзували розчином (10мкг/мл) антилюдського IgM у PBS (фірма BD Pharmingen/ Clone G20-127) впродовж ночі при температурі 4°C і промивали чотири рази за допомогою PBS перед використанням. Деякі клітини стимулювали розчинним hTNFSF13b (25нг/мл) у присутності або за відсутності нейтралізуючого hTNFSF13b антитіла (2,5мкг/мл). Фіг.2 ілюструє здатність 4A5-3.1.1-B4 до нейтралізації ефекту стимуляції hTNFSF13b.

Приклад 3. Визначення характеристик моноклональних антитіл

Усі згадані нейтралізуючі анти-hTNFSF13b антитіла були людськими IgG1 або людськими IgG4. Вони аналізувались також на здатність до зв'язування із hTNFSF13b у денатурованому стані, тобто hTNFSF13b відокремлювали за допомогою SDS-PAGE і блотували на нітроцелюлозі. Усі нейтралізуючі антитіла виявились нездатними до зв'язування hTNFSF13b у вестерн-блотингу у той час як декілька ненейтралізуючих антитіл виявились здатними до цього.

Експерименти із застосуванням системи BIAcore здійснювали для визначення того, чи зв'язуються ненейтралізуючі антитіла та нейтралізуючі антитіла з однією і тією самою ділянкою на hTNFSF13b. По-перше 4A5-3.1.1-B4 наносили на чип із подальшим впорскуванням спочатку hTNFSF13b, а потім насичувальної кількості ненейтралізуючого антитіла. Після досягнення насичення через чип пропускали 4A5-3.1.1-B4 у високій концентрації. Одинадцять ненейтралізуючих антитіл виявились нездатними до конкурування із 4A5-3.1.1-B4 за одне і те саме місце зв'язування. Одна ненейтралізуюча гібридома виявилась здатною до блокування зв'язування 4A5-3.1.1-B4 приблизно на 45%, що вказує на те, що вона може мати антигенну детермінанту поблизу від антигенної детермінанти 4A5-3.1.1-B4.

За допомогою тієї самої експериментальної схеми визначили, що нейтралізуюче моноклональне антитіло (mAb), 4A5-3.1.1-B4, могло конкурувати за те саме місце зв'язування, що і один із рецепторів hTNFSF13b, TACI. Результати цих експериментів дозволяють зробити припущення про те, що TACI-Fc та 4A5-3.1.1-B4 можуть мати на hTNFSF13b антигенні детермінанти, що взаємно перекриваються.

4A5-3.1.1-B4 іммобілізували на твердій фазі шляхом пропускання розчину антитіла над смолою для IMAC (афінна хроматографія з іммобілізованим іоном металу), навантаженою CO<sup>+2</sup>. Після зв'язування кобальт окиснювали до стану +3 шляхом інкубування згаданого смоли з розбавленим розчином пероксиду. Після промивання смоли нативний hTNFSF13b та hTNFSF13b, підданий модифікації (шляхом відновлення/алкілювання або теплової денатурації), пропускали через колонку. Після промивання зв'язаний білок елюювали кислотним розчином і елюювані білки аналізували засобами MALDI MS (мас-спектрометрія з іонізацією методом лазерної десорбції у матричному розчині). 4A5-3.1.1-B4 зв'язувало нативний рекомбінантний hTNFSF13b, але не зв'язувало ні хімічно, ні термічно модифікований hTNFSF13b. Таким чином, видається, що 4A5-3.1.1-B4 розпізнає конформаційну антигенну детермінанту на розчинному hTNFSF13b.

Рекомбінантний розчинний hTNFSF13b (RDI) інкубували з 4A5-3.1.1-B4 або анти-TNFSF13b кролячим поліклональним антитілом (MoBiTec, Marco Island, FL; проти амінокислот 254-269 hTNFSF13b) на льоду впродовж 2год, і суміш білків піддавали вискоефективному рідинному гель-хроматографуванню (дві послідовно сполучені колонки TosoHaas TSK-GEL G3000PW, урівноважені PBS, зі швидкістю 0,25мл/хв.). Білки елюювали за допомогою PBS. Як контролі, розчини антитіл і розчин hTNFSF13b аналізували окремо. Людський TNFSF13b елюювали з гель-хроматографічної колонки у положенні, яке відповідало тримеру молекули TNFSF13b. Елюювання тримерного hTNFSF13b зсувалось на більш ранню часову точку у присутності 4A5-3.1.1-B4, але не у присутності анти-hTNFSF13b поліклональних антитіл, що вказувало на зв'язування тримерного hTNFSF13b з антитілом 4A5-3.1.1-B4. Ці дані дозволяють зробити припущення про те, що нейтралізуюче моноклональне антитіло 4A5-3.1.1-B4 зв'язується з конформаційною антигенною детермінантою на hTNFSF13b.

Приклад 4: Визначення афінності моноклональних антитіл за допомогою системи BIAcore

Афінність різних анти-hTNFSF13b людських антитіл до hTNFSF13b визначали за допомогою вимірювальної системи BIAcore. Згадана система використовує оптичні властивості поверхневого плазмонного резонансу для визначення зміни концентрації білків взаємодіючих молекул у межах декстринової

біосенсорної матриці. За виключенням визначених випадків, усі реактиви і матеріали були закуплені від фірми BIAcore AB (Uppsala, Швеція). Усі визначення здійснювали при температурі 25°C. Зразки розчиняли у HBS-EP буфері (150мМ розчин NaCl, 3М розчин EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота), 0,005% розчин (у відношенні маси до об'єму) поверхнево-активної речовини P-20 та 10мМ розчин ГЕПЕС-буфера). Козячий антимишачий IgG (Fc-специфічний; фірма Jackson ImmunoResearch, West Grove, штат Пенсільванія) іммобілізували у протоковій кюветі 1 на сенсорному чипі CM5 за допомогою набору для сполучення аміну. Козячий антилюдський IgG (Fc-специфічний; фірма Jackson ImmunoResearch) іммобілізували у протоковій кюветі 2 також за допомогою набору для сполучення аміну. Обидва антитіла були іммобілізовані для досягнення кожним рівня 700 одиниць реагування.

Зв'язування рекомбінантного hTNFSF13b (фірма Research Diagnostics Inc., Flanders, штат Нью-Джерсі) визначали впродовж численних аналітичних циклів. Кожен цикл здійснювали при швидкості 30мкл/хв., і він включав такі стадії: введення 150мкл 4A5-3.1.1-B4 з концентрацією 20мкг/мл, введення 250мкл hTNFSF13b (розпочинаючи з 50нМ із застосування двократних серійних розведень для кожного циклу) з подальшими 15хв для відокремлення та регенерація із застосуванням 90мкл 10мМ розчину гліцину HCl (pH1,5).

Швидкість приєднання та відокремлення для кожного циклу визначали за допомогою моделі зв'язування (1:1) Langmuir із застосуванням комп'ютерної програми BIAevaluation. Значення  $K_D$  4A5-3.1.1-B4 для hTNFSF13b, за результатами визначення, дорівнювало 38пМ.

Приклад 5: Клонування та секвенування антиген-зв'язувальних ділянок важких та легких ланцюгів

Варіабельні ділянки важких та легких ланцюгів нейтралізуючого людського моноклонального антитіла 4A5-3.1.1-B4 клонували і секвенували за наведеними нижче методиками.

мРНК одержали з  $2 \times 10^6$  гібридомних клітин за методикою Micro-Fast Track (фірма Invitrogen) з додатковим набором. кДНК одержали з 200мкл етанолового преципітату мРНК із застосуванням набору cDNA Cycle kit (фірма Invitrogen) шляхом центрифугування аліквоти мРНК впродовж 30хв при 14000об/хв. при температурі 4°C із подальшим промиванням осаду 70% етанолом. Висушений на повітрі осад ресуспендували у 11,5мкл стерильної води, і кДНК одержували у відповідності з рекомендаціями інструкції до набору. Факультативну другу стадію синтезу кДНК випускали, однак кДНК очищали на стадії екстрагування фенолом/хлороформом та осадження етанолом. Осад кДНК ресуспендували у 30мкл TE (Трис-EDTA буфер) для використання у полімеразно-ланцюговій реакції.

Полімеразно-ланцюгові реакції ставили з виродженими праймерами на 5' кінці варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюга, спарованими з 3' праймерами на константній ділянці. На кожні 50мкл реакційної суміші було використано 1мкл кДНК. Реакцію здійснювали у відповідності з інструкцією для застосування з PfuI з 20 подальшими циклами. Продукти полімеразно-ланцюгової реакції перевіряли шляхом пропускання 5мкл кожної реакційної суміші через 1% агарозний гель. Позитивні реакційні суміші клонували із застосуванням набору для клонування Zero Blunt TOPO PCR cloning kit (фірма Invitrogen). Мініпрепарати з позитивних клонів секвенували і аналізували для виявлення продуктивного реаранжування генів. Шляхом проведення незалежних полімеразно-ланцюгових реакцій та секвенування численних клонів одержали послідовності, опис яких наведено нижче.

Послідовності легкого ланцюга людського антитіла 4A5-3.1.1-B4 (гіперваріабельні ділянки виділені жирним шрифтом)

	<b>E • I V L T Q S P A T L S L S P G E</b>
1	GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA CTTTAACACA ACTGCGTCAG AGGTCGGTGG GACAGAAACA GAGGTCCCCT
	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CDR1</div>
51	<b>R • A T L S C R A S Q S V S R Y L</b> AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC CGCTACTTAG TTCTCGGTGG GAGAGGACGT CCCGGTCAGT CTCACAATCG GCGATGAATC
101	<b>A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D</b> CCTGGTACCA GCAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GGACCATGGT CGTCTTTGGA CCGGTCCGAG GGTCCGAGGA GTAGATACTA
	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CDR2</div>
151	<b>A • S N R A T G I P A R F S G S G S</b> GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC CGTAGGTTGT CCCGGTGACC GTAGGGTCGG TCCAAGTCAC CGTCACCCAG
201	<b>G T D S T L T I S S L E P E D F</b> TGGGACAGAC TCCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG ACCCTGTCTG AGGTGAGAGT GGTAGTCGTC GGATCTCGGA CTTCTAAAAC
	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CDR3</div>
251	<b>A V Y Y C Q Q R S N W P R T F G Q</b> CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCCTCGGAC GTTCGGCCAA GTCAAATAAT GACAGTCGTC GCATCGTTGA CCGGAGCCTG CAAGCCGGTT
	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Ck</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;">→</div>
301	<b>G • T K V E I K R T V A A P S V F I</b> GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGAACTGTG GCTGCACCAT CTGTCTTCAT CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCTTGACAC CGACGTGGTA GACAGAAGTA
351	<b>• F P</b> CTTCCCG GAAGGGC

Послідовності важкого ланцюга людського антитіла 4A5-3.1.1-B4 (гіперваріабельні ділянки виділені жирним шрифтом, сигнальна послідовність виділена курсивом)

```

1      M K H L W F F L L L V A A P R W V
   ATGAAACACC TGTGGTTCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT
   TACTTTGTGG ACACCAAGAA GGAGGAGGAC CACCGTCGAG GGTCTACCCA

51      L S Q V Q L Q Q W G A G L L K P
   CCTGTCCCAG GTGCAACTAC AGCAGTGGGG CGCAGGACTG TTGAAGCCTT
   GGACAGGGTC CACGTTGATG TCGTCACCCC GCGTCCTGAC AACTTCGGAA

101     S E T L S L T C A V Y G G S F S G
   CGGAGACCCCT GTCCCTCACC TCGCTGTCT ATGGTGGGTC CTTCACTGGT
   GCCTCTGGGA CAGGGAGTGG ACGCGACAGA TACCACCCAG GAAGTCACCA

      CDR1

151     Y Y W S W I R Q P P G K G L E W I
   TACTACTGGA GCTGGATCCG CCAGCCCCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGAT
   ATGATGACCT CGACCTAGGC GGTGCGGGGT CCCTTCCCCG ACCTCACCTA

      CDR2

201     G E I N H S G S T N Y N P S L K
   TGGGGAAATC AATCATAGTG GAAGCACCAA CTACAACCCG TCCCTCAAGA
   ACCCCTTTAG TTAGTATCAC CTTCTGTGGT GATGTTGGGC AGGGAGTTCT

251     S R V T I S V D T S K N Q F S L K
   GTCGAGTCAC CATATCAGTA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCCCTGAAA
   CAGCTCAGTG GTATAGTCAT CTGTGCAGGT TCTTGGTCAA GAGGGACTTT

301     L S S V T A A D T A V Y Y C A R G
   CTGAGCTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCT GTGTATTACT GTGCGAGAGG
   GACTCGAGAC ACTGGCGGCG CCTGTGCCGA CACATAATGA CACGCTCTCC

      CDR3

351     Y Y D I L T G Y Y Y Y F D Y W G
   GTATTACGAT ATTTTGACTG GTTATTATTA CTACTTTGAC TACTGGGGCC
   CATAATGCTA TAAAACTGAC CAATAATAAT GATGAACTG ATGACCCCGG

      Cyl

401     Q G T L V T V S S A S T K G P S V
   AGGGAACCCT GGTCAACGTC TCCTCAGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC
   TCCCTTGGA CAGTGGCAG AGGAGTCGGA GGTGGTTCCC GGGTAGCCAG

451     F P L A
   TCCCCCTGG CA
   AAGGGGGACC GT

```

Приклад 6: Видова перехресна реактивність анти-hTNFSF13b людських антитіл з нелюдським TNFSF13b

З метою визначення видової перехресної реактивності нейтралізуючих моноклональних антитіл, твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA) провели із застосуванням 4A5-3.1.1-B4 як іммобілізованого, так і ідентифікувального моноклонального антитіла. Людський рекомбінантний TNFSF13b використали, як стандартну криву. Людський TNFSF13b може виявлятися у культуральному супернатанті CHO клітин, трансфікованих вектором, що експресує hTNFSF13b, супернатантах культури людських моноцитів, людській сироватці або плазмі. Супернатанти CHO клітин, що експресують мишачий TNFSF13b, випробували на реактивність у ELISA і одержали негативний результат. 4A5-3.1.1-B4 також виявилось нездатним до утворення імуопреципітату з мишачим TNFSF13b, однак було здатним до утворення імуопреципітату з людським TNFSF13b. Мишачий TNFSF13b застосовували у реакції проліферації, опис якої наведено у Прикладі 2. За результатами реакції проліферації встановили, що 4A5-3.1.1-B4 виявилось нездатним до нейтралізації проліферації, індукованої мишачим TNFSF13b. Це вказує на те, що 4A5-3.1.1-B4 є нездатним до розпізнавання мишачого TNFSF13b.

Приклад 7: Амінокислотна послідовність важкого ланцюга 4A5-3.1.1-B4

Нижче наведена амінокислотна послідовність важкого ланцюга антитіла 4A5-3.1.1-B4, який включає HCVR та константну ділянку IgG4. Людська константна ділянка IgG4 має серин у положенні 231. Однак серин у положенні 231 замінили на пролін, що внесло структурну зміну у шарнірну ділянку для одержання оптимальних міжланцюгових дисульфідних зв'язків. Це зменшує рівень утворення напівантитіл. Напівантитіла утворюються з одного важкого ланцюга і одного легкого ланцюга.

```

1   QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGGFS GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE
51  INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
101 DILTGYYYYF DYWGQGTSLV VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC
151 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
201 TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP
251 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN
301 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKKVSNGK LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ
351 VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV
401 LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK

```

#### Послідовність № 17

Окрім того, для послаблення ефекторної функції згаданого антитіла, фенілаланін у положенні 237 може бути заміненим на аланін, а лейцин у положенні 238 може бути заміненим на аланін або глутамінову кислоту.

Приклад 8: Амінокислотна послідовність важкого ланцюга 4A5-3.1.1-B4

Нижче наведена амінокислотна послідовність важкого ланцюга антитіла 4A5-3.1.1-B4, який включає HCVR та константну ділянку IgG1.

```

1   QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGGFS GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE
51  INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY
101 DILTGYYYYF DYWGQGTSLV VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
151 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
201 TQTYICNVNH KPSNTKVDK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
251 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
301 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
351 EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT
401 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
451 PGK

```

#### Послідовність № 18

Приклад 9: Амінокислотна послідовність легкого ланцюга 4A5-3.1.1-B4

Нижче наведена амінокислотна послідовність легкого ланцюга антитіла 4A5-3.1.1-B4, який включає LCVR та константну ділянку каппа.

```

1   EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
51  ASNRATGIPA RFGSGSGTD STLTISSELP EDFAVYYCQQ RSNWPRTFGQ
101 GTKVEIKRTV AAPSVFIFEP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLNLT LT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201 LSSPVTKSFN RGEC

```

#### Послідовність № 19

Приклад 10: Ідентифікація антигенної детермінанти 4A5-3.1.1-B4

Визначили антигенну детермінанту, з якою зв'язується 4A5-3.1.1-B4 і нейтралізує людський TNFSF13b. Послідовності людського та мишачого TNFSF13b були впорядковано розміщені, як показано нижче:

<b>Мишачий TNFSF13b</b>	1	AFQGPETE	Q	DVDLSAPP	AP	CLPGCRHS	QH	DDNGMNL	RNI	IQDCLQL	IA	49		
<b>Людський TNFSF13b</b>	1	AVQGP	EE	---	-----	-----	-----	-----	-----	TV	TQDCLQL	IA	18	
<b>Мишачий TNFSF13b</b>	50	DS	TPTIR	KG	TYTFVP	WLLS	FKRGN	ALEEK	ENKIV	VRQT	G	YFFIYSQ	VLY	99
<b>Людський TNFSF13b</b>	19	D	SETPTI	QKG	SYTFVP	WLLS	FKRGS	ALEEK	ENKIL	VKET	G	YFFIYGQ	VLY	68
<b>Мишачий TNFSF13b</b>	100	TD	PIFAM	GHV	IQRKK	VHVFG	DELSLV	TLFR	CIQNM	PKTLP	NNSCYS	SAGIA	149	
<b>Людський TNFSF13b</b>	69	TD	KTYAM	GHL	IQRKK	VHVFG	DELSLV	TLFR	CIQNM	PETLP	NNSCYS	SAGIA	118	
<b>Мишачий TNFSF13b</b>	150	R	LEEGDE	IQL	AIPRE	NAQIS	RNGDD	TFFGA	LKLL				183	
<b>Людський TNFSF13b</b>	119	K	LEEGDE	LQL	AIPRE	NAQIS	LDGDV	TFFGA	LKLL				152	

Виходячи з відомої кристалічної структури декількох членів сімейства TNF, створили гомологічну модель людського TNFSF13b. Доступні залишки, якими різняться мишачий та людський TNFSF13b, є потенційними місцями зв'язування для 4A5-3.1.1-B4, оскільки 4A5-3.1.1-B4 нейтралізує людський, але не мишачий TNFSF13b.

Ідентифікували три потенційні антигенні детермінанти: 1) K71, T72, Y73, E105; 2) Q26, S29, L139, D140; 3) L53, K55, E56, K119. Мутагенез з метою одержання химерних молекул здійснили шляхом заміни амінокислотної послідовності з людської на мишачу. Химера А: L139R, D140N; Химера В: K71P, T72I, Y73F; Химера С: K71P, T72I, Y73F, E105K; Химера D: L53V, K55R, E56Q; Химера Е: E105K.

За допомогою реакції проліферації, опис якої було наведено у Прикладі 2, усі химери були перевірені на функціональну активність та нейтралізацію 4A5-3.1.1-B4. Початкові реакції були поставлені з використанням супернатантів 293 тимчасових трансфекцій для кожної з химер та вихідних молекул як людського, так і мишачого TNFSF13b. Усі химери індукували подібну проліферацію, що вказує на те, що одержані химери були функціональними. У разі використання 6мкг/мл 4A5-3.1.1-B4, спостерігали 100% нейтралізацію людського TNFSF13b та химер А, В, D та Е. Нейтралізації мишачого TNFSF13b або химери С не спостерігалось. Для

химер А, В та С одержали очищені TNFSF13b мутанти і згадану реакцію повторили з використанням 11нг/мл кожного вихідного TNFSF13b або химерного TNFSF13b та 1мкг/мл 4A5-3.1.1-B4. Результати показали, що спостерігалась 100% нейтралізація людського TNFSF13b та химери А, 88% нейтралізація химери В; нейтралізація мишачого TNFSF13b або химери С не спостерігалась.

Приклад 11: In vivo дослідження із застосуванням 4A5-3.1.1-B4

Трансгенних мишей з надекспресією розчинного людського TNFSF13b одержали за відомими методами, опис яких наведено у роботі Хоран Б. (Hogan B.) та інших (1986), [Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, NY], модифікованими Фокс (Fox) та Солтер (Solter) (Mol. Cell. Biol. 8:5470, 1988). Стисло, чоловічим пронуклеусам щойно запліднених одноклітинних зародків (зигот) лінії FVB/N робили мікроін'єкцію фрагмента ДНК, що включав ген hTNFSF13b. Зародки культивували in vitro впродовж ночі до досягнення ними двоклітинної стадії розвитку. Після цього двоклітинні зародки трансплантували до яйцепроводів псевдовагітних мишей лінії CD-1 для їх розвитку до встановленого строку. Для визначення присутності трансгену у новонароджених мишей, у кожної тварини видаляли невеликий фрагмент пальця стопи і піддавали його гідролітичному розщепленню для виділення нуклеїнових кислот. Зразок екстракту пальця стопи у подальшому піддавали аналізу засобами полімеразно-ланцюгової реакції для ідентифікування мишей, які мали трансгени.

У hTNFSF13b-трансгенних мишей спостерігалось різке збільшення периферичних В-клітин, в загальній кількості приблизно у три рази, порівняно з підібраними за віком та статтю одноприплідними мишами. Спостерігалось також незначне зростання периферичних Т-клітин. hTNFSF13b-трансгенних мишей піддавали обробці 4A5-3.1.1-B4 для визначення, чи приведе нейтралізація hTNFSF13b до зменшення кількості В-клітин до нормальних рівнів. У 15-тижневому віці hTNFSF13b-мишам-самицям двічі на тиждень впродовж трьох тижнів підшкірно впорскували 25мкг 4A5-3.1.1-B4 або ізотипового контрольного антитіла. Через чотири дні після останнього впорскування антитіла мишей забивали і селезінку видаляли для аналізів. Кількість В- та Т-клітин підраховували шляхом визначення відсотка CD19+ клітин, у разі В-клітин, та CD3+ клітин, у разі Т-клітин, із застосуванням протокової цитометрії та абсолютної лейкоцитарної формули для кожної селезінки. Наведені нижче результати показують, що введення in vivo 4A5-3.1.1-B4 hTNFSF13b-трансгенним мишам може відновити нормальні кількості Т- та В-клітин (середнє значення±середнє квадратичне відхилення)

	В-клітини (×10 <sup>6</sup> )	Т-клітини (×10 <sup>6</sup> )
Експериментальна група		
Одноприплідні миші дикого типу	29±11	46±15
Трансгенне+ізотипове моноклональне антитіло	122±30	75±14
Трансгенне+4A5 моноклональне антитіло	29±5	46±12

Послідовності за цим винаходом:

Послідовність № 1 → полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG  
GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCTACT  
TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT  
GATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGG  
GTCTGGGACAGACTCCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATT  
TTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTTCGGC  
CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACT

Послідовність №2 → амінокислотна послідовність, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDST  
LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIKRT

Послідовність №3 → полінуклеотидна послідовність, що кодує гіперваріабельну ділянку (CDR1) легкого ланцюга

AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCTACTTAGCC

Послідовність №4 → амінокислотна послідовність, що кодує гіперваріабельну ділянку (CDR1) легкого ланцюга

RASQSVSRYLA

Послідовність №5 → полінуклеотидна послідовність, що кодує гіперваріабельну ділянку (CDR2) легкого ланцюга

GATGCATCCAACAGGGCCACT

Послідовність №6 → амінокислотна послідовність, що кодує гіперваріабельну ділянку (CDR2) легкого ланцюга

DASNRAT

Послідовність №7 → полінуклеотидна послідовність, що кодує гіперваріабельну ділянку (CDR3) легкого ланцюга

CAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACG

Послідовність №8 → амінокислотна послідовність, що кодує гіперваріабельну ділянку (CDR3) легкого ланцюга

QQRSNWPRT

Послідовність №9 → полінуклеотидна послідовність, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга

ATGAAA

CACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTC  
CCAGGTGCAACTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGA  
CCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTAC  
TGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGA  
AATCAATCATAGTGAAGCACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAG  
TCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGC  
TCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATTA  
CGATATTTTGAAGTGGTTATTATTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAA  
CCCTGGTCACCGTCTCCTCA

Послідовність №10 → амінокислотна послідовність, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINH  
SGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGYYDILTGYYYYYFDYWGQGTLLTVSS

Послідовність №11 → полінуклеотидна послідовність, що кодує гіперваріабельну ділянку (CDR1) важкого ланцюга

GGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGC

Послідовність №12 → амінокислотна послідовність, що кодує гіперваріабельну ділянку (CDR1) важкого ланцюга

GGSFSGYYWS

Послідовність №13 → полінуклеотидна послідовність, що кодує гіперваріабельну ділянку (CDR2) важкого ланцюга

GAAATCAATCATAGTGAAGCACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGT

Послідовність №14 → амінокислотна послідовність, що кодує гіперваріабельну ділянку (CDR2) важкого ланцюга

EINHSGSTNYNPSLKS

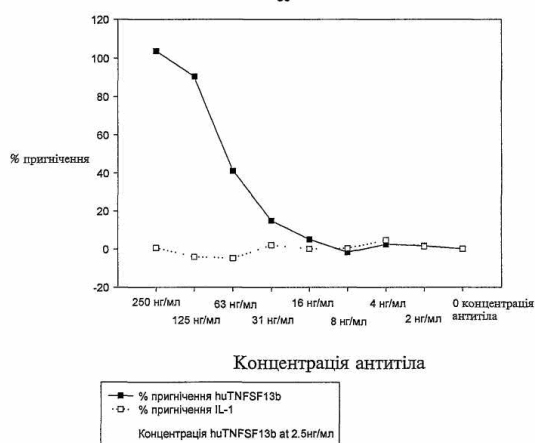
Послідовність №15 → полінуклеотидна послідовність, що кодує гіперваріабельну ділянку (CDR3) важкого ланцюга

GGGTATTACGATATTTTGAAGTGGTTATTATTACTACTTTGACTAC

Послідовність №16 → амінокислотна послідовність, що кодує гіперваріабельну ділянку (CDR3) важкого ланцюга

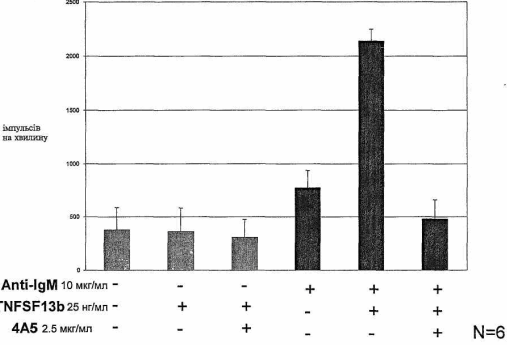
GYDILTGYYYYYFDY

% пригнічення проліферації huTNFSF13b та IL-1 4A5-3.1.1-B  
IC<sub>50</sub> = 76 нг/мл



Фиг.1

Нейтралізація huTNFSF13b-індукованої проліферації ембріональних В-клітин 4A5-3.1.1-B4



Фіг. 2

# ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Eli Lilly and Company

<120> АНТАГОНІСТИЧНІ АНТИ-hTNFSF13b ЛЮДСЬКІ АНТИТІЛА

<130> X-15239 PCT

<160> 19

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 327

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc cgctacttag cctggtagca gcagaaacct      120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac tccactctca ccatcagcag cctagagcct      240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctcggac gttcggccaa      300
gggaccaagg tggaatcaa acgaact                                           327

```

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
          20           25           30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
          85           90           95

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

```

<210> 3

<211> 33

<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 3  
agggccagtc agagtgttag ccgctactta gcc

33

<210> 4  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 5  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
gatgcatcca acagggccac t

21

<210> 6  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

<210> 7  
<211> 27  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
cagcagcgta gcaactggcc tcggacg

27

<210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr  
1 5

<210> 9  
<211> 426  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> sig\_peptide  
<222> (1)..(57)  
<223>

```

<400> 9
atgaaacacc tgtggttctt cctcctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcaactac agcagtgggg cgcaggactg ttgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcgctgtct atggtgggtc cttcagtggg tactactgga gctggatccg ccagccccca 180
gggaaggggc tggagtggat tggggaaatc aatcatagtg gaagcaccaa ctacaaccgc 240
tcctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaaa 300
ctgagctctg tgaccgccgc ggacacggct gtgtattact gtgcgagagg gtattacgat 360
atcttgactg gttattatta ctactttgac tactggggcc agggaaacct ggtcaccgtc 420
tcctca 426

```

```

<210> 10
<211> 142
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)..(19)
<223>

```

```

<400> 10
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
35 40 45

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr
115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

```

<210> 11  
<211> 15  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 11  
ggtgggtcct tcagtgggta ctactggagc

<210> 12  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser  
1 5 10

<210> 13  
<211> 48  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
gaaatcaatc atagtggaag caccaactac aaccctccc tcaagagt

48

<210> 14  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 14

Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 15  
<211> 45  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
gggtattacg atattttgac tggttattat tactactttg actac

45

<210> 16  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10 15

<210> 17  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn  
50 55 60

Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys  
65 70 75

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr  
80 85 90

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly  
95 100 105

Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
110 115 120

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
125 130 135

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
140 145 150

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
155 160 165

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
170 175 180

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
185 190 195

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His  
200 205 210

Lys Pro Ser Gln Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr  
215 220 225

	230		235		240
Pro Ser Val Phe	Leu 245	Phe Pro Pro Lys	Pro 250	Lys Asp Thr Leu	Met 255
Ile Ser Arg Thr	Pro 260	Glu Val Thr Cys	Val 265	Val Val Asp Val	Ser 270
Gln Glu Asp Pro	Glu 275	Val Gln Phe Asn	Trp 280	Tyr Val Asp Gly	Val 285
Glu Val His Asn	Ala 290	Lys Thr Lys Pro	Arg 295	Glu Glu Gln Phe	Asn 300
Ser Thr Tyr Arg	Val 305	Val Ser Val Leu	Thr 310	Val Leu His Gln	Asp 315
Trp Leu Asn Gly	Lys 320	Glu Tyr Lys Cys	Lys 325	Val Ser Asn Lys	Gly 330
Leu Pro Ser Ser	Ile 335	Glu Lys Thr Ile	Ser 340	Lys Ala Lys Gly	Gln 345
Pro Arg Glu Pro	Gln 350	Val Tyr Thr Leu	Pro 355	Pro Ser Gln Glu	Glu 360
Met Thr Lys Asn	Gln 365	Val Ser Leu Thr	Cys 370	Leu Val Lys Gly	Phe 375
Tyr Pro Ser Asp	Ile 380	Ala Val Glu Trp	Glu 385	Ser Asn Gly Gln	Pro 390
Glu Asn Asn Tyr	Lys 395	Thr Thr Pro Pro	Val 400	Leu Asp Ser Asp	Gly 405
Ser Phe Phe Leu	Tyr 410	Ser Arg Leu Thr	Val 415	Asp Lys Ser Arg	Trp 420
Gln Glu Gly Asn	Val 425	Phe Ser Cys Ser	Val 430	Met His Glu Ala	Leu 435
His Asn His Tyr	Thr 440	Gln Lys Ser Leu	Ser 445	Leu Ser Leu Gly	Lys 450

<210> 18  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Glu Ala Glu Leu Leu Lys Pro Ser

Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	20	25	30
Gly	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	35	40	45
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Asn	His	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	50	55	60
Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	65	70	75
Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	80	85	90
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ile	Leu	Thr	Gly	95	100	105
Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	110	115	120
Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	125	130	135
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	140	145	150
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	155	160	165
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	170	175	180
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	185	190	195
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	200	205	210
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	215	220	225
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	230	235	240
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	245	250	255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
305 310 315

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
320 325 330

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
335 340 345

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
350 355 360

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
365 370 375

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
380 385 390

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
395 400 405

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
410 415 420

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
425 430 435

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
440 445 450

Pro Gly Lys  
453

<210> 19  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 19

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr

[illegible]