



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94019 (13) C2

(51) МПК (2011.01)

C07K 16/18

C12N 15/09

A61K 39/395

C07K 14/47 (2011.01)

A61P 35/00

A61P 1/16 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) АНТИТІЛО, ЯКЕ СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З ГЛІПІКАНОМ 3 (GPC3)

1

2

(21) a200602628

(22) 08.07.2005

(24) 11.04.2011

(86) PCT/JP2005/013103, 08.07.2005

(31) 2004-203637

(32) 09.07.2004

(33) JP

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) НАКАНО КІЙОТАКА, JP, ЙОСИНО ТАКЕСІ, JP, НЕЗУ ДЗУН-ІТІ, JP, ЦУНОДА ХІРОЮКІ, JP, ІГАВА ТОМОЮКІ, JP, КОНІСІ ХІРОКО, JP, ТАНАКА МЕ-ГУМІ, JP, ЗУГО ІЗУМІ, JP, КАВАІ СІГЕТО, JP, ІСІ-ГУРО ТАКАХІРО, JP, КІНОСІТА ЯСУКО, JP

(73) ЧУГАІ СЕЙЯКУ КАБУСІКІ КАЙСЯ, JP

(56) EP A1 1541680, 15.06.2005.

EP A1 1548442, 29.06.2005.

EP A1 1541686, 15.06.2005.

EP A1 1411118, 21.04.2004.

WO A2 03100429, 04.12.2003.

MIDORIKAWA Y ET AL: "GLYPICAN-3, OVEREXPRESSED IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA, MODULATES FGF2 AND BMP-7 SIGNALING" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 103, no. 4, 10 February 2003 (2003-02-10), pages 455-465, XP001159615 ISSN: 0020-7136.

SUNG Y-K ET AL: "Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma" CANCER SCIENCE, JAPANESE CANCER ASSOCIATION, TOKYO, JP, vol. 94, no. 3, March 2003 (2003-03), pages 259-262, XP002261241 ISSN: 1347-9032.

CAPURRO M ET AL: "Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma" GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 125, no. 1, July 2003 (2003-07), pages 89-97, XP009020918 ISSN: 0016-5085.

LAGE H ET AL: "Expression of a glypican-related 62-kDa antigen is decreased in hepatocellular carcinoma in correspondence to the grade of tumor differentiation" VIRCHOWS ARCHIV, SPRINGER INTERNATIONAL, BERLIN, DE, vol. 438, no. 6, 21

February 2001 (2001-02-21), pages 567-573, XP002379399 ISSN: 0945-6317.

(57) 1. Антитіло, яке специфічно зв'язується з гліпіканом 3 (GPC3), яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR 1, 2, 3, що включає амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 123, 124, 125, відповідно, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR 1, 2 і 3, що включають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 143, 144 і 158, відповідно.

2. Антитіло, яке специфічно зв'язується з гліпіканом 3 (GPC3), вибране з:

(1) антитіла, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 84, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 92;  
(2) антитіла, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 85, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 92;  
(3) антитіла, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 86, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 92;  
(4) антитіла, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 87, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 92;  
(5) антитіла, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 88, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 92;  
(6) антитіла, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 89, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає аміно-

(13) C2

(11) 94019

(19) UA



- (5) варіабельної ділянки легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 195;
- (6) варіабельної ділянки легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 196;
- (7) варіабельної ділянки легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 197;
- (8) варіабельної ділянки легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 198;
- (9) варіабельної ділянки легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 199;
- (10) варіабельної ділянки легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 200;
- (11) варіабельної ділянки легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 201;
- (12) варіабельної ділянки легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 202;
- (13) варіабельної ділянки легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 203;
- (14) варіабельної ділянки легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 204; і
- (15) варіабельної ділянки легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 205;
- і варіабельну ділянку важкого ланцюга, вибрану з:
- (1) варіабельної ділянки важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 84;
- (2) варіабельної ділянки важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 85;
- (3) варіабельної ділянки важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 86;

- (4) варіабельної ділянки важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 87;
- (5) варіабельної ділянки важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 88;
- (6) варіабельної ділянки важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 89; і
- (7) варіабельної ділянки важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 90.
5. Антитіло за будь-яким з пп. 1-4, яке являє собою гуманізоване антитіло.
6. Антитіло за будь-яким з пп. 1-5 для застосування при лікуванні раку.
7. Антитіло за п. 6 для застосування при лікуванні гепатомі.
8. Інгібітор росту клітин, експресуючих GPC3, який містить як активний інгредієнт антитіло за будь-яким з пп. 1-5.
9. Полінуклеотид, який кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла за п. 5.
10. Полінуклеотид за п. 9, який включає будь-яку з послідовностей, описаних в SEQ ID NO: 57 і 77-83.
11. Полінуклеотид, який кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла за п. 5.
12. Полінуклеотид за п. 11, який включає будь-яку з послідовностей, описаних в SEQ ID NO: 67 і 91.
13. Вектор, який включає полінуклеотид за будь-яким з пп. 9-12.
14. Клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 13.
15. Спосіб отримання антитіла, який включає:
- (а) культивування клітини-хазяїна за п. 14,
- (б) виділення антитіла з культури (а), і
- (с) очищення антитіла.
16. Пептид, який складається з амінокислотних залишків 546-551 гліпікану 3, який використовується як антиген для одержання антитіла за будь-яким з пп. 1-4.

#### Галузь винаходу

Даний винахід відноситься до антитіла проти гліпікану 3, до інгібітору клітинного росту і до протиракового засобу, які містять антитіло як активний інгредієнт.

#### Опис спорідненої галузі

Гліпікан 3 (GPC3) є членом гліпіканового сімейства гепарансульфатпротеогліканів, які присутні на клітинній поверхні. Це дозволяє передбачити, що GPC3 бере участь в клітинному розподілі при розвитку або рості ракових клітин, однак його функція ще не цілком ясна.

Було виявлено, що певний тип антитіл, що зв'язуються з GPC3, інгібує клітинний ріст за допомогою антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (ADCC) і комплементзалежної цитотоксичності (CDC) (міжнародна патентна зая-

вка WO 2003/000883). Крім того, вважають, що GPC3 розщеплюється *in vivo* і надходить в кров у вигляді секретованої форми GPC3, отже, рак можна діагностувати за допомогою антитіл, здатних зв'язуватися з секретованою формою GPC3 (міжнародні патентні заявки-WO 2004/022739, WO 03/100429 і WO 2004/018667).

Для розробки протиракового засобу на основі цитотоксичної активності антитіла переважно, щоб використовувати антитіло володіло високою ADCC-активністю або CDC-активністю. Відповідно, потрібне антитіло проти GPC3, яке володіє високою цитотоксичністю, як антитіло, що розпізнає GPC3.

Метою даного винаходу є надання антитіла проти GPC3, яке володіє більш високою ADCC-













| Антитіло і варіабельні ділянки |   | SEQ ID NO |
|--------------------------------|---|-----------|
| M3C11                          | H | 22        |
| M13B3                          | H | 23        |
| M1E7                           | H | 24        |
| M3B8                           | H | 25        |
| M11F1                          | H | 26        |
| M19B11                         | H | 27        |
| M6B1                           | H | 28        |
| M18D4                          | H | 29        |
| M5B9                           | H | 30        |
| M10D2                          | H | 31        |
| L9G11                          | H | 32        |
| M3C11                          | L | 44        |
| M13B3                          | L | 45        |
| M1E7                           | L | 46        |
| M3B8                           | L | 47        |
| M11F1                          | L | 48        |
| M19B11                         | L | 49        |
| M6B1                           | L | 50        |
| M18D4                          | L | 51        |
| M5B9                           | L | 52        |
| M10D2                          | L | 53        |
| L9G11                          | L | 54        |
| GC199                          | H | 60        |
| GC202                          | H | 61        |
| GC33                           | H | 62        |
| GC179                          | H | 63        |
| GC194                          | H | 64        |
| GC199                          | L | 71        |
| GC202                          | L | 72        |
| GC33                           | L | 73        |
| GC179                          | L | 74        |
| GC194 (1)                      | L | 75        |
| GC194 (2)                      | L | 76        |
| GC33.ver.a                     | H | 84        |
| GC33.ver.c                     | H | 85        |
| GC33.ver.f                     | H | 86        |
| GC33.ver.h                     | H | 87        |
| GC33.ver.i                     | H | 88        |
| GC33.ver.j                     | H | 89        |

|            |      |     |
|------------|------|-----|
| GC33.ver.k | H    | 90  |
| GC33.ver.a | L    | 92  |
| M13B3 (H)  | CDR1 | 103 |
|            | CDR2 | 104 |
|            | CDR3 | 105 |
| M3B8 (H)   | CDR1 | 106 |
|            | CDR2 | 107 |
|            | CDR3 | 108 |
| M11F1 (H)  | CDR1 | 109 |
|            | CDR2 | 110 |
|            | CDR3 | 111 |
| M5B9 (H)   | CDR1 | 112 |
|            | CDR2 | 113 |
|            | CDR3 | 114 |
| M6B1 (H)   | CDR1 | 115 |
|            | CDR2 | 116 |
|            | CDR3 | 117 |
| M10D2 (H)  | CDR1 | 118 |
|            | CDR2 | 119 |
|            | CDR3 | 120 |
| L9G11 (H)  | CDR1 | 118 |
|            | CDR2 | 121 |
|            | CDR3 | 122 |
| GC33 (H)   | CDR1 | 123 |
|            | CDR2 | 124 |
|            | CDR3 | 125 |
| GC179 (H)  | CDR1 | 126 |
|            | CDR2 | 127 |
|            | CDR3 | 128 |
| GC194 (H)  | CDR1 | 129 |
|            | CDR2 | 130 |
|            | CDR3 | 131 |
| GC199 (H)  | CDR1 | 132 |
|            | CDR2 | 133 |
|            | CDR3 | 134 |
| GC202 (H)  | CDR1 | 106 |
|            | CDR2 | 135 |
|            | CDR3 | 136 |
| M13B3 (L)  | CDR1 | 137 |
|            | CDR2 | 138 |
|            | CDR3 | 139 |
| M3B8 (L)   | CDR1 | 140 |
|            | CDR2 | 141 |
|            | CDR3 | 142 |
| M11F1 (L)  | CDR1 | 143 |
|            | CDR2 | 144 |
|            | CDR3 | 145 |
| M5B9 (L)   | CDR1 | 146 |
|            | CDR2 | 147 |
|            | CDR3 | 148 |

|             |      |     |
|-------------|------|-----|
| M6B1 (L)    | CDR1 | 149 |
|             | CDR2 | 150 |
|             | CDR3 | 151 |
| M10D2 (L)   | CDR1 | 152 |
|             | CDR2 | 153 |
|             | CDR3 | 154 |
| L9G11 (L)   | CDR1 | 155 |
|             | CDR2 | 156 |
|             | CDR3 | 157 |
| GC33 (L)    | CDR1 | 143 |
|             | CDR2 | 144 |
|             | CDR3 | 158 |
| GC179 (L)   | CDR1 | 159 |
|             | CDR2 | 160 |
|             | CDR3 | 161 |
| GC194 (L) 1 | CDR1 | 162 |
|             | CDR2 | 147 |
|             | CDR3 | 163 |
| GC194 (L) 2 | CDR1 | 164 |
|             | CDR2 | 165 |
|             | CDR3 | 166 |
| GC199 (L)   | CDR1 | 167 |
|             | CDR2 | 168 |
|             | CDR3 | 169 |
| GC202 (L)   | CDR1 | 170 |
|             | CDR2 | 144 |
|             | CDR3 | 171 |
| GC33 (L)    | G34A | 174 |
| GC33 (L)    | G34D | 175 |
| GC33 (L)    | G34E | 176 |
| GC33 (L)    | G34F | 177 |
| GC33 (L)    | G34H | 178 |
| GC33 (L)    | G34N | 179 |
| GC33 (L)    | G34P | 180 |
| GC33 (L)    | G34Q | 181 |
| GC33 (L)    | G34I | 182 |
| GC33 (L)    | G34K | 183 |
| GC33 (L)    | G34L | 184 |
| GC33 (L)    | G34V | 185 |
| GC33 (L)    | G34W | 186 |
| GC33 (L)    | G34Y | 187 |
| GC33 (L)    | G34R | 188 |

Крім того, в даному винаході описується анти-тіло, яке володіє активністю, еквівалентною активності описаного вище антитіла, і має описану вище амінокислотну послідовність, в якій один або декілька амінокислотних залишків заміщені, видалені або додані і/або вставлені.

Переважно, антитіло даного винаходу являє собою гуманізоване антитіло.

Так, в іншому аспекті даний винахід пропонує гуманізоване антитіло, здатне зв'язуватися з гліпіканом 3.

У наступному аспекті даний винахід пропонує антитіло, здатне зв'язуватися з пептидом, що складається з послідовності амінокислотних залишків 524-563 гліпікану 3.

Переважно, антитіло даного винаходу здатне зв'язуватися з пептидом, що складається з послідовності амінокислотних залишків 537-563 гліпікану 3. Більш переважно, антитіло даного винаходу не зв'язується з пептидом, що складається з послідовності амінокислотних залишків 550-563 гліпікану 3.

Переважно, антитіло здатне зв'язуватися з пептидом, що складається з послідовності амінокислотних залишків 544-553 гліпікану 3, або з пептидом, що складається з послідовності амінокислотних залишків 546-551 гліпікану 3.

У наступному аспекті даний винахід пропонує антитіло, здатне зв'язуватися з епітопом, з яким може зв'язуватися вторинне антитіло, де згадане вторинне антитіло включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR 1, 2 і 3, що має амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 123, 124 і 125, відповідно, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 143, 144 і 158, відповідно. А саме, антитіло даного винаходу може конкурувати з вторинним антитілом за зв'язування з GPC3.

У переважному втіленні антитіло даного винаходу може зв'язуватися з гліпіканом 3 і володіє високою CDC-активністю по відношенню до клітин, що експресують гліпікан 3, і/або високою ADCC-активністю по відношенню до клітин, що експресують гліпікан 3.

В іншому аспекті даний винахід пропонує полінуклеотид, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга або варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла даного винаходу.

Переважно, полінуклеотид даного винаходу має послідовність, описану в SEQ ID NO: 11-21, 33-43, 55-59, 65-70 і 77-83.

У наступному аспекті даний винахід пропонує інгібітор клітинного росту і протираковий засіб, що містять як активний інгредієнт антитіло даного винаходу. Переважно, протираковий засіб даного винаходу використовують для лікування гепатоми.

У наступному аспекті даний винахід пропонує пептид, який містить послідовність амінокислотних залишків 524-563 гліпікану 3, послідовність амінокислотних залишків 537-563 гліпікану 3, послідовність амінокислотних залишків 544-553 гліпікану 3 або послідовність амінокислотних залишків 546-551 гліпікану 3.

Короткий опис малюнків

На Фіг. 1 показана зв'язуюча активність антитіла проти GPC3 в клітині CHO, клітині CHO, що експресує повнорозмірні GPC3, HepG2 і HuH-7, виміряна за допомогою проточної цитометрії. M1E7 (суцільна лінія) і M11F1 (пунктирна лінія) використовують в концентрації 5 мкг/мл, відповідно.

На Фіг. 2 наведена таблиця, що демонструє результати класифікації по епітопам, отримані за допомогою конкурентного аналізу ELISA. Міра конкурентного інгібування зв'язування біотинільованого антитіла проти GPC3 приведена в процентах. Епітопи поділяють на 5 груп, від а до є, відповідно до характеру конкурентного інгібування.

На Фіг. 3 приведені результати вестерн-блотингу, які показують, з яким фрагментом розчинної форми корового білка GPC3 зв'язується антитіло проти GPC3: з N-кінцевим фрагментом розміром 40 кДа або з C-кінцевим фрагментом розміром 30 кДа. Було виявлено, що L9G11 зв'язується з N-кінцевим фрагментом, а M3C11 зв'язується з C-кінцевим фрагментом.

На Фіг. 4 показані результати детекції секретованої форми GPC3 в культуральному супернатанті HepG2 за допомогою сендвіч-методу ELISA. Секретована форма добре детектується при використанні поєднання антитіл, які зв'язуються з N-кінцевим фрагментом, таким як M6B1, M18D4 або M19B11, і погано детектується при використанні поєднання антитіл, які зв'язуються з C-кінцевим фрагментом, таким як M3C11, M13B3 або M3B8.

На Фіг. 5 показані результати імунопреципітації культурального супернатанту HepG2 з використанням антитіла проти GPC3 і детекції секретованої форми GPC3. Середовище як контроль (лінії 1 і 3) і культуральний супернатант HepG2 (лінії 2 і 4) піддають імунопреципітації з використанням M1E7 (лінії 1 і 2) і M10D2 (лінії 3 і 4). Секреторний GPC3 детектують з допомогою M10D2, який зв'язується з N-кінцевим фрагментом.

На Фіг. 6 показані результати аналізу епітопа антитіла, який зв'язується з C-кінцевим фрагментом GPC3, методом вестерн-блотингу з використанням гібридного білка C-кінцевого пептиду GPC3 і GST. Коровий білок розчинної форми GPC3 (лінія 1), GST (лінія 2), GC-1 (лінія 3), GC-2 (лінія 4), GC-3 (лінія 5), GC-4 (лінія 6) і GC-5 (лінія 7) піддають SDS-електрофорезу у відновлювальних умовах і детекції методом вестерн-блотингу з використанням M3C11 і M11F1.

На Фіг. 7 показані результати вимірювання активності CDC мишаче-людського химерного антитіла проти GPC3 на клітинах CHO, які експресують GPC3.

На Фіг. 8 показані результати вимірювання активності ADCC мишаче-людського химерного антитіла проти GPC3 на клітинах CHO, які експресують GPC3 і HepG2.

На Фіг. 9 показані результати вимірювання активності ADCC GC33 на клітинній лінії людської гепатоми, HuH-7, з використанням ефektorних клітин мишачого кісткового мозку.

На Фіг. 10 показані результати вимірювання протипухлинної активності антитіла GC33 на мишачій моделі з трансплантованою гепатомою людини.

На Фіг. 11 показані результати вимірювання активності CDC мишаче-людського химерного антитіла GC33 на клітинах CHO, які експресують GPC3.

На Фіг. 12 показані результати вимірювання активності ADCC мишаче-людського химерного антитіла GC33 на HepG2.

На Фіг. 13 показані послідовності GPC3, що містяться в білках, гібридизованих з GST (GC-4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 і 14), отримані для аналізу епітопа GC33.

На Фіг. 14 показані результати вестерн-блотингу з використанням GC33 після розділення GST, GC-7, 8, 9, 11, 12, 13 і 14 методом SDS-PAGE у відновлювальних умовах.

На Фіг. 15 показані результати вимірювання зв'язуючої активності гуманізованого GC33 по відношенню до GPC3 методом ELISA.

На Фіг. 16 приведена таблиця антитіл, в яку включені ізотипи і результати ELISA, BIAcore, FACS, епітопного аналізу і імунопреципітації для



клонів, отриманих з мишей, імунізованих розчинною формою GPC3.

На Фіг. 17 приведена таблиця антитіл, в яку включені ізотипи і результати ELISA, FACS і епітопного аналізу для клонів, отриманих з мишей, імунізованих GC-3.

На Фіг. 18 показані результати вимірювання зв'язуючої активності модифікованих антитіл по відношенню до корового білка розчинної форми GPC3 методом ELISA. Gly34, який знаходиться в CDR1 варіабельної ділянки L-ланцюга гуманізованого GC33, замінюють будь-яку з 17 амінокислот, відмінних від Cys і Met.

На Фіг. 19 показані результати вимірювання активності CDC мишаче-людських химерних антитіл GC33, M3C11 і M1E7 на клітинах CHO, експресуючих повнорозмірний GPC3.

На Фіг. 20 показані результати вимірювання активності ADCC мишаче-людських химерних антитіл GC33, M3C11 і M1E7 на клітинній лінії гепатоми людини SK-03, що експресують повнорозмірний GPC3.

Докладний опис винаходу

Антитіло

Даний винахід пропонує антитіла, описані в нижченаведених пунктах (1)-(X1).

(I) Антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO, приведених в будь-якому з нижченаведених пунктів (1)-(12):

- (1) SEQ ID NO: 123, 124 і 125 (GC33),
- (2) SEQ ID NO: 109, 110 і 111 (M11F1),
- (3) SEQ ID NO: 106, 107 і 108 (M3B8),
- (4) SEQ ID NO: 132, 133 і 134 (GC199),
- (5) SEQ ID NO: 106, 135 і 136 (GC202),
- (6) SEQ ID NO: 126, 127 і 128 (GC179),
- (7) SEQ ID NO: 129, 130 і 131 (GC194),
- (8) SEQ ID NO: 103, 104 і 105 (M13B3),
- (9) SEQ ID NO: 118, 121 і 122 (L9G11),
- (10) SEQ ID NO: 115, 116 і 117 (M6B1),
- (11) SEQ ID NO: 112, 113 і 114 (M5B9) і
- (12) SEQ ID NO: 118, 119 і 120 (M10D2).

Серед антитіл, описаних в пунктах (1)-(12), переважні антитіла, описані в пунктах (1)-(8), більш переважні антитіла, описані в пунктах (1)-(5), і особливо переважне антитіло, описане в пункті (1). Антитіла, описані в пунктах (1)-(8), розпізнають С-кінцевий пептид гліпікану 3 (пептид, який містить 374-580 амінокислоти гліпікану 3); і використовуються як терапевтичні антитіла. Крім того, антиті-

ла, описані в пунктах (9)-(12), розпізнають N-кінцевий пептид гліпікану 3 (пептид, який містить 1-373 амінокислоти гліпікану 3); і використовуються як діагностичні антитіла.

(II) Антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO, приведених в будь-якому з нижченаведених пунктів (1)-(13):

- (1) SEQ ID NO: 143, 144 і 158 (GC33),
- (2) SEQ ID NO: 143, 144 і 145 (M11F1),
- (3) SEQ ID NO: 140, 141 і 142 (M3B8),
- (4) SEQ ID NO: 167, 168 і 169 (GC199),
- (5) SEQ ID NO: 170, 144 і 171 (GC202),
- (6) SEQ ID NO: 159, 160 і 161 (GC179),
- (7) SEQ ID NO: 162, 147 і 163 (GC194 (1)),
- (8) SEQ ID NO: 164, 165 і 166 (GC194 (2)),
- (9) SEQ ID NO: 137, 138 і 139 (M13B3),
- (10) SEQ ID NO: 155, 156 і 157 (L9G11),
- (11) SEQ ID NO: 149, 150 і 151 (M6B1),
- (12) SEQ ID NO: 146, 147 і 148 (M5B9) і
- (13) SEQ ID NO: 152, 153 і 154 (M10D2).

Серед антитіл, описаних в пунктах (1)-(13), переважні антитіла, описані в пунктах (1)-(8), більш переважні антитіла, описані в пунктах (1)-(5), і особливо переважне антитіло, описане в пункті (1). Антитіла, описані в пунктах (1)-(8), розпізнають С-кінцевий пептид гліпікану 3 (пептид, який містить 374-580 амінокислоти гліпікану 3); і використовуються як терапевтичні антитіла. Крім того, антитіла, описані в пунктах (9)-(13), розпізнають N-кінцевий пептид гліпікану 3 (пептид, який містить 1-373 амінокислоти гліпікану 3); і використовуються як діагностичні антитіла.

(III) Антитіло, вибране з групи, яка складається з антитіл, описаних в нижченаведених пунктах (1)-(13):

(1) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 123, 124 і 125, і варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 143, 144 і 158 (GC33),

(2) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 109, 110 і 111, і варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 143, 144 і 145 (M11F1),

(3) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 106, 107 і 108, і варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 140, 141 і 142 (M3B8),

(4) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, ті, що мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 132, 133 і 134, і варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 167, 168 і 169 (GC199),

(5) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 106, 127 і 136, і варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 170, 144 і 171 (GC202),

(6) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 126, 127 і 128, і варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 159, 160 і 161 (GC179),

(7) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 129, 130 і 131, і варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 162, 147 і 163 (GC194 (1)),

(8) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 129, 130 і 131, і варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 164, 165 і 166 (GC194 (2)),

(9) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 103, 104 і 105, і варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 137, 138 і 139 (M13B3),

(10) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 118, 121 і 122, і варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 155, 156 і 157 (L9G11),

(11) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 115, 116 і 117, і варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 149, 150 і 151 (M6B1),

(12) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3,

які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 112, 113 і 114, і варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 146, 147 і 148 (M5B9),

(13) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, ті, що мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 118, 119 і 120, і варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 152, 153 і 154 (M10D2).

Серед антитіл, описаних в пунктах (1)-(13), переважні антитіла, описані в пунктах (1)-(8), більш переважні антитіла, описані в пунктах (1)-(5), і особливо переважне антитіло, описане в пункті (1). Антитіла, описані в пунктах (1)-(8), розпізнають С-кінцевий пептид гліпікану 3 (пептид, який містить 374-580 амінокислоти гліпікану 3); і використовуються як терапевтичні антитіла. Крім того, антитіла, описані в пунктах (9)-(13), розпізнають N-кінцевий пептид гліпікану 3 (пептид, який містить 1-373 амінокислоти гліпікану 3); і використовуються як діагностичні антитіла.

(IV) Антитіло, яке містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, описану в будь-якому з нижченаведених пунктів (1)-(7):

(1) варіабельна ділянка важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 84 (GC33 VH ver.a),

(2) варіабельна ділянка важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 85 (GC33 VH ver.c),

(3) варіабельна ділянка важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 86 (GC33 VH ver.f),

(4) варіабельна ділянка важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 87 (GC33 VH ver.h),

(5) варіабельна ділянка важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 88 (GC33 VH ver.i),

(6) варіабельна ділянка важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 89 (GC33 VH ver.j), і

(7) варіабельна ділянка важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 90 (GC33 VH ver.k).

Серед антитіл, описаних в пунктах (1)-(7), особливо переважні антитіла, описані в пунктах (2)-(7).

(V) Антитіло, яке включає в себе варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 92 (GC33 VL ver.a).

(VI) Антитіло, вибране з групи, яка складається з антитіл, описаних в нижченаведених пунктах (1)-(7):

(1) антитіло, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 84 (GC33 VH ver.a), і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 92 (GC33 VL ver.a),

(6) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 179, 144 і 158.

(15) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки легкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 188, 144 і 158.

(4) антитіло, яке включає в себе варіабельні ділянки важкого ланцюга, що містять CDR 1, 2 і 3, які мають амінокислотні послідовності, описані в SEQ ID NO: 123, 124 і 125, і варіабельні ділянки



Серед антитіл, описаних в пунктах (1)-(15), переважне антитіло, описане в пункті (15).

(X) Антитіло, яке містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, вибрану з групи, яка складається з варіабельних ділянок легкого ланцюга, описаних в нижченаведених пунктах (1)-(15):

(1) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 191,

(2) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 192,

(3) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 193,

(4) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 194,

(5) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 195,

(6) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 196,

(7) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 197,

(8) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 198,

(9) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 199,

(10) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 200,

(11) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 201,

(12) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 202,

(13) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 203,

(14) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 204, і

(15) варіабельна ділянка легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 205, і варіабельна ділянка важкого ланцюга, вибрана з групи, яка складається з варіабельних ділянок важкого ланцюга, описаних в нижченаведених пунктах (1)-(7):

(1) варіабельна ділянка важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 84,

(2) варіабельна ділянка важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 85,

(3) варіабельна ділянка важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 86,

(4) варіабельна ділянка важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 87,

(5) варіабельна ділянка важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 88,

(6) варіабельна ділянка важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 89, і

Серед описаних вище антитіл переважне антитіло, яке містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 205, і варіабельна ділянка важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 90.

(XI) Антитіло, що має описану в будь-якому з наведених вище пунктів (I)-(X) амінокислотну послідовність, в якій одна або декілька амінокислот заміщені, видалені, додані і/або вставлені, і яке володіє активністю, еквівалентною активності антитіла, описаного в будь-якому з пунктів (I)-(X).

У даному винаході фраза "активність, еквівалентна активності антитіла, описаного в будь-якому з пунктів (I)-(X)" означає еквівалентність зв'язувальної активності антитіла по відношенню до людського гліпікану 3, або цитотоксичну активність по відношенню до клітини, що експресує людський гліпікан 3 (наприклад, HepG2 або рекомбінантні клітини CHO, що експресують людський гліпікан 3, і інш.).

Гуманізоване антитіло

Одним переважним втіленням антитіла відно до даного винаходу є гуманізоване антитіло, яке зв'язується з гліпіканом 3. Гуманізоване антитіло можна отримати відомим способом.

Гуманізоване антитіло також згадується як видозмінене людське антитіло, яке отримують шляхом пересадження ділянки, що визначає комплементарність (CDR) антитіла ссавця, відмінного від людини, наприклад, мишачого антитіла, в CDR людського антитіла. Для отримання таких антитіл також використовуються загальні методи рекомбінантних ДНК (див. Європейську патентну заявку EP 125023 і міжнародну патентну заявку WO 96/02576).

Наприклад, якщо CDR отримують з мишачого антитіла, послідовність ДНК, яку конструюють для з'єднання CDR мишачого антитіла з каркасною ділянкою (FR) людського антитіла, синтезують методом ПЛП з використанням декількох олігонуклеотидів як праймерів, які отримують так, щоб фрагменти перекривалися один з одним по обох кінцях CDR і FR (див. спосіб, описаний в міжнародній патентній заявці WO 98/13388).

Вибирають каркасну ділянку людського антитіла, яка при з'єднанні з CDR дозволяє отримати гіперваріабельну ділянку з бажаним антигензв'язувальним центром. За необхідності амінокислоту в каркасній ділянці варіабельної ділянки антитіла можна замінити так, щоб гіперваріабельна ділянка видозміненого людського антитіла могла утворити відповідний антигензв'язувальний центр (Sato, Do. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

С-ділянку людського антитіла можна використати як С-ділянку химерного антитіла або гумані-

зованого антитіла, наприклад, C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, і C $\gamma$ 4 можна використати як складові частини H-ланцюга, а C $\kappa$  і C $\lambda$ , можна використати як складові частини L-ланцюга. С-ділянку людського антитіла також можна модифікувати, щоб поліпшити стабільність антитіла або полегшити його отримання. Для гуманізації можна використати будь-який ізотип людського антитіла, наприклад, IgG, IgM, IgA, IgE і IgD, переважно IgG, більш переважно IgG1 або IgG3 і особливо переважно IgG1. У даному винаході IgG1 ефективно, якщо антитіло використовується як протираковий засіб, тобто володіє високою цитотоксичною активністю (Chemical immunology, 65: 88 (1997)).

Крім того, після отримання гуманізованого антитіла амінокислоту у варіабельній (наприклад, в FR) або константній ділянці можна замінити іншою амінокислотою.

Походження CDR в гуманізованому антитілі особливо не обмежується, і CDR може бути отриманий від будь-якої тварини. Наприклад, можна використати послідовність, отриману з мишачого антитіла, щурячого антитіла, кролячого антитіла, верблюжого антитіла або т. п. Переважно використати послідовність CDR мишачого антитіла.

Як правило, при гуманізації антитіла важко зберегти агоністичну активність первинного антитіла. Однак в даному винаході успішно отримують гуманізоване антитіло, що володіє агоністичною активністю, еквівалентною активності вихідного мишачого антитіла. Оскільки антигенність гуманізованого антитіла в організмі людини меншає, його можна використати для введення людині в терапевтичних цілях.

Переважні приклади гуманізованого антитіла проти гліпікану 3 даного винаходу включають в себе, наприклад, антитіло, яке містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, описану в SEQ ID NO: 84 (GC33 VH ver.a), SEQ ID NO: 85 (GC33 VH ver.c), SEQ ID NO: 86 (GC33 VH ver.f), SEQ ID NO: 87 (GC33 VH ver.h), SEQ ID NO: 88 (GC33 VH ver.i), SEQ ID NO: 89 (GC33 VH ver.j) або SEQ ID NO: 90 (GC33 VH ver.k), або антитіло, яке містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, описану в SEQ ID NO: 92 (GC33 VL ver.a). Особливо переважні приклади антитіл включають в себе антитіло, яке містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, описану в SEQ ID NO: 84 (GC33 VH ver.a), SEQ ID NO: 85 (GC33 VH ver.c), SEQ ID NO: 86 (GC33 VH ver.f), SEQ ID NO: 87 (GC33 VH ver.h), SEQ ID NO: 88 (GC33 VH ver.i), SEQ ID NO: 89 (GC33 VH ver.j) або SEQ ID NO: 90 (GC33 VH ver.k), і варіабельну ділянку легкого ланцюга, описану в SEQ ID NO: 92 (GC33 VL ver.a).

Крім того, переважний приклад гуманізованого антитіла проти гліпікану 3 включає в себе антитіло, яке містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 90, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 205.

Переважне втілення антитіла згідно з даним винаходом являє собою антитіло, яке зв'язується з епітопом, з яким зв'язується антитіло, описане в будь-якому з нижченаведених пунктів (1)-(8):

(1) антитіло, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 62, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 73 (GC33),

(2) антитіло, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 26, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 48 (M11F1),

(3) антитіло, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 25, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 47 (M3B8),

(4) антитіло, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 60, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 71 (GC199),

(5) антитіло, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 61, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 72 (GC202),

(6) антитіло, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 63, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 74 (GC179),

(7) антитіло, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 64, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 75 (GC194(I)), і

(8) антитіло, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 64, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 76 (GC194 (2)). Більш переважне антитіло, що зв'язується з епітопом, з яким зв'язується антитіло, описане в будь-якому з пунктів (1)-(5), і особливо переважне антитіло, що зв'язується з епітопом, з яким зв'язується антитіло, описане в пункті (1).

Використовують антитіло, яке зв'язується з епітопом, з яким зв'язується будь-яке з вищезгаданих антитіл, оскільки воно володіє особливо високою цитотоксичністю.

Антитіло, описане в будь-якому з пунктів (1)-(7), зв'язується з ділянкою від 524-ої амінокислоти до 580-ої амінокислоти людського гліпікану 3. Особливо, воно зв'язується з ділянкою від 524-ої амінокислоти до 563-ої амінокислоти. Антитіло, описане в будь-якому з пунктів (1)-(5), зв'язується з ділянкою від 537-ої амінокислоти до 563-ої амінокислоти людського гліпікану 3. Антитіло, описане в пункті (1), зв'язується з ділянкою від 544-ої

амінокислоти до 553-ої амінокислоти людського гліпікану 3. Особливо, воно зв'язується з ділянкою від 546-ої амінокислоти до 551-ої амінокислоти.

Антитіла, що розпізнають вищезгадані епітопи, володіють високою цитотоксичністю, отже, їх можна використати для лікування таких захворювань, як рак. Особливо, можна використати антитіло, яке зв'язується з ділянкою від 546-ої амінокислоти до 551-ої амінокислоти, оскільки воно володіє високою цитотоксичністю.

Відповідно, даний винахід включає в себе антитіла, які зв'язуються з епітопом на ділянки від 524-ої амінокислоти до 580-ої амінокислоти людського гліпікану 3, переважно на ділянки від 524-ої амінокислоти до 563-ої амінокислоти, більш переважно на ділянки від 537-ої амінокислоти до 563-ої амінокислоти, ще більш переважно на ділянки від 544-ої амінокислоти до 553-ої амінокислоти, особливо переважно на ділянки від 546-ої амінокислоти до 551-ої амінокислоти.

Інше переважне втілення даного винаходу являє собою антитіло, яке розпізнає ділянку від 524-ої амінокислоти до 563-ої амінокислоти людського гліпікану 3 і не розпізнає ділянку від 537-ої амінокислоти до 563-ої амінокислоти.

Інше переважне втілення даного винаходу являє собою антитіло, яке розпізнає ділянку від 537-ої амінокислоти до 563-ої амінокислоти людського гліпікану 3 і не розпізнає ділянку від 550-ої амінокислоти до 563-ої амінокислоти.

Аналіз епітопа, який розпізнається антитілом, можна провести відомим в даній галузі способом, наприклад, методом вестерн-блотингу, який описується нижче в прикладах.

Антитіло, яке розпізнає вищезгадані ділянки як епітопи, можна отримати відомим в даній галузі способом. Наприклад, воно може бути отримане шляхом отримання пептиду, що має амінокислотну послідовність цільової ділянки на основі амінокислотної послідовності людського гліпікану 3, з подальшим отриманням антитіла з використанням даного пептиду як імуногену, або шляхом отримання антитіла звичайним способом і визначення епітопа, який розпізнає отримане антитіло, з подальшим вибором антитіла, яке розпізнає цільовий епітоп.

Переважним прикладом антитіла проти гліпікану 3 є антитіло, що володіє високою ADCC-активністю, або антитіло, що володіє високою CDC-активністю по відношенню до клітини, що експресує гліпікан 3.

Фраза "висока ADCC-активність" або "висока CDC-активність" в даному описі означає, що антитіло даного винаходу має більш високу ADCC-активність або більш високу CDC-активність, ніж відоме антитіло проти гліпікану 3. Відомі антитіла проти гліпікану 3 включають в себе, наприклад, M3C11 і M1E07, описані в міжнародній патентній заявці WO 2004/22739.

ADCC-активність або CDC-активність можна виміряти за допомогою відомого в даній галузі методу. Наприклад, її можна виміряти по вивільненню хрому. Конкретні умови аналізу вивільнення хрому для вимірювання ADCC-активності особливо не обмежуються, однак, наприклад, її можна

вимірювати, використовуючи умови, описані нижче в прикладах.

Приклади клітин, які експресують гліпікан 3, включають в себе, наприклад, клітинну лінію гепатоми, таку як HepG2, клітинну лінію CHO, що містить ген, який кодує гліпікан 3 і т. п. Для вимірювання ADCC-активності переважно використати клітинну лінію HepG2, а для вимірювання CDC-активності переважно використати рекомбінантну клітинну лінію CHO, експресуючу GPC3. Рекомбінантну клітинну лінію CHO, яка експресує GPC3, можна отримати будь-яким способом, в тому числі, її можна отримати, наприклад, за способом, описаним нижче в прикладах.

Якщо антитіло проти гліпікану 3 використовують як протираковий засіб, переважно, щоб воно володіло таким же рівнем ADCC-активності, що і антитіло, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 62, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 73 (GC33). Якщо антитіло проти гліпікану 3 використовують як протираковий засіб, переважно, щоб воно володіло таким же рівнем CDC-активності, що і антитіло, яке включає в себе варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 62, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, описану в SEQ ID NO: 73 (GC33).

Крім того, даний винахід включає в себе антитіло, що володіє високою зв'язуючою активністю по відношенню до гліпікану 3.

У даному винаході зв'язуючу активність антитіла по відношенню до гліпікану 3 можна виміряти відомим в даній галузі способом. Наприклад, її можна виміряти методом поверхневого плазмового резонансу з використанням BIAcore. А саме, білок гліпікан 3 іммобілізують на сенсорному чипі для взаємодії з антитілом, і взаємодію антитіла і гліпікану 3 розраховують як константу швидкості реакції виходячи з результатів вимірювання. Крім того, для вимірювання зв'язуючої активності можна використати твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA), імуоферментний аналіз (EIA), радіоімунологічний аналіз (RIA) або імуофлуоресцентний аналіз. Наприклад, у випадку імуоферментного аналізу зразок, що містить антитіло, яке аналізується, наприклад, культуральний супернатант клітини, яка продукує антитіло, що аналізується, або очищене антитіло, додають в планшет, заздалегідь покритий антигеном, з яким зв'язується антитіло, що аналізується. Потім додають вторинне антитіло, мічене ферментом, таким як лужна фосфатаза, після чого планшети інкубують і промивають. Потім додають субстрат ферменту, такий як p-нітрофенілфосфат, і вимірюють поглинання, по якому розраховують антигензв'язувальну активність. Верхній кордон зв'язуючої активності особливо не обмежується. Однак, наприклад, верхня межа може знаходитися в інтервалі, який визначається технічними можливостями з точки зору фахівця в даній галузі. Потрібно розуміти, що по мірі вдосконалення технології технічно можливий інтервал буде розширюватися.

Далі, в даному винаході амінокислота, що підлягає дезамідуванню, або сусідня амінокислота, може бути замінена на іншу амінокислоту, наприклад, для придушення дезамідування з метою збільшення стабільності антитіла. Підлягаюча дезамідуванню амінокислота включає в себе аспарагін і глутамін, переважно аспарагін. Амінокислота, що знаходиться по сусідству з аспарагіном, особливо не обмежується і може бути будь-якою амінокислотою. Відомо, що послідовність аспарагін-гліцин є особливо чутливою до дезамідування, отже, переважно, щоб по сусідству з аспарагіном знаходився гліцин. Амінокислота, що використовується для заміни, особливо не обмежується і може являти собою будь-яку амінокислоту, відмінну від аспарагіну і глутаміну. Переважно, дана амінокислота відрізняється від валіну і проліну. Отже, в даному винаході, якщо відбувається дезамідування антитіла, переважно замінити амінокислоту на амінокислоту, відмінну від аспарагіну, глутаміну, валіну і проліну. Придушення дезамідування шляхом заміни амінокислоти можна провести, наприклад, за способом, описаним в міжнародній патентній заявці WO 03/057881. Переважно, щоб після заміни амінокислоти з метою придушення дезамідування зберігалася антигензв'язувальна активність, яка була присутньою до заміни.

Інше втілення стабілізації антитіла включає в себе заміну глутамінової кислоти на іншу амінокислоту. У даному винаході також було виявлено, що, якщо 6-а амінокислота важкого ланцюга антитіла являє собою глутамінову кислоту, антитіло можна значною мірою стабілізувати шляхом заміни глутамінової кислоти на глутамін. Відповідно, даний винахід також відноситься до способу стабілізації антитіла шляхом заміни глутамінової кислоти в 6-ому положенні важкого ланцюга антитіла на глутамін. Нумерація амінокислот в антитілі відома фахівцям в даній галузі (наприклад, Kabat, E. A. et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services 1983).

Антитіло даного винаходу може являти собою кон'юговане антитіло, тобто антитіло може бути зв'язане з різними молекулами, такими як молекули поліетиленгліколу (PEG), радіоактивних речовин і токсинів. Таке кон'юговане антитіло можна отримати шляхом хімічної модифікації отриманого раніше антитіла. Способи модифікації антитіл відомі в даній галузі. Антитіло даного винаходу включає в себе таке кон'юговане антитіло.

Антитіло даного винаходу також може являти собою біспецифічне антитіло (див., наприклад, Journal of Immunology, 1994, 152, 5368-5374). Біспецифічне антитіло може розпізнавати гліпікан 3 і інший антиген, або воно може розпізнавати різні епітопи на молекулі GPC3.

Крім того, антитіло даного винаходу може нести певний білок, гібридизований з N- або C-кінцем антитіла (Clinical Cancer Research, 2004, 10, 1274-1281). Білок для гібридизації з антитілом може бути відповідно вибраний фахівцем в даній галузі.

Антитіло даного винаходу також включає в себе антитіло з підвищеною цитотоксичністю. Приклади антитіл з підвищеною цитотоксичністю вклю-

чають в себе антитіло, що втратило фукозу, антитіло, яке містить розділяючий N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), приєднаний до його вуглеводного ланцюга, і антитіло, що володіє зміненою зв'язуючою активністю по відношенню до рецептору Fcγ, отримане шляхом заміщення однієї або декількох амінокислот в ділянки Fc. Такі антитіла з підвищеною цитотоксичністю можна отримати відомим в даній галузі способом.

Спосіб отримання антитіла

Антитіло, яке зв'язується з гліпіканом 3, можна отримати відомим в даній галузі способом. Наприклад, гібридому, що продукує моноклональне антитіло, можна отримати, як зазначено нижче, використовуючи в основному відомий метод. Тобто гібридому можна отримати шляхом імунізації ссавця традиційним способом, з використанням як сенсibilізуючого антигена білка гліпікану 3 або клітини, що експресують гліпікан 3. Отриманий таким чином імуніцит гібридизують з відомою батьківською клітиною, використовуючи звичайний метод гібридизації клітин, і потім за допомогою традиційного методу скринінгу відбирають клітини, що продукують моноклональні антитіла.

Конкретно, моноклональне антитіло можна отримати таким чином. Спочатку отримують білок гліпікан 3 на основі генної/амінокислотної послідовностей гліпікану 3, описаних в SEQ ID NO: 3 і 4, який використовують як сенсibilізуючий антиген для отримання антитіла. Більш конкретно, генну послідовність, що кодує гліпікан 3, вставляють у відому векторну систему експресії, отриманим вектором трансформують відповідну клітинну-хазяїна і потім цільовий людський білок гліпікан 3 виділяють з клітини-хазяїна або з культурального супернатанту відомим способом.

Потім даний очищений білок гліпікан 3 використовують як сенсibilізуючий антиген. Альтернативно, як сенсibilізуючий антиген можна використати пептидний фрагмент гліпікану 3. В даному випадку пептидний фрагмент можна отримати також шляхом хімічного синтезу відповідно до амінокислотної послідовності людського гліпікану 3.

Епітоп молекули гліпікану 3, який розпізнається антитілом проти гліпікану 3 даного винаходу, не обмежується конкретним епітопом. Антитіло проти гліпікану 3 може розпізнавати будь-який епітоп, якщо епітоп присутній на молекулі гліпікану 3. Відповідно, для отримання антитіла проти гліпікану 3 даного винаходу як антиген можна використати будь-який фрагмент, який містить епітоп, присутній на молекулі гліпікану 3.

Ссавець, якого імунізують сенсibilізуючим антигеном, особливо не обмежується, однак його переважно вибирають з точки зору сумісності з батьківською клітиною, що використовується для гібридизації клітин. Наприклад, звичайно використовують гризунів, таких як миші, щури і хом'яки, кроликів або мавп.

Імунізацію тварин сенсibilізуючим антигеном проводять відомим способом. Наприклад, імунізацію проводять за загальним способом, в якому сенсibilізуючий антиген вводять ссавцеві внутрішньочеревинно або підшкірно. А саме, сенсibilізуючий антиген розбавляють відповідною кількіс-



тю, або суспендують у відповідній кількості PBS (забуференого фосфатом фізіологічного розчину), фізіологічного розчину і т. п., при необхідності продукт змішують з відповідною кількістю стандартного ад'юванту, такого як повний ад'ювант Фрейнда, і потім розчин емульгують і вводять ссавцеві декілька разів через кожні 4-21 днів. Для імунізації сенсibiliзуючим антигеном також можна використати відповідний носій.

Ссавця імунізують за описаним вище способом і потім підтверджують, що в сироватці присутній підвищений рівень цільового антитіла. Потім у ссавця беруть імунцити і піддають їх клітинній гібридизації. Особливо переважним імунцитом є спленоцит.

Як батьківська клітина-партнера для гібридизації з вищезгаданим імунцитом використовують клітину мієломи ссавця. Приклади клітинної лінії мієломи, що переважно використовуються в даному винаході, включають в себе різні відомі клітинні лінії, такі як P3 (P3x63 Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3x63 Ag8U.I (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler. G. and Milstein, C Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies. D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323) і R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133).

Гібридизацію вищезазначених імунцитів з клітинами мієломи в основному можна провести за допомогою відомого способу, наприклад, способу Kohler and Milstein et al. (Kohler. G. and Milstein, C, Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46).

Більш конкретно, вищезазначену клітинну гібридизацію проводять в звичайному поживному розчині для культивування в присутності, наприклад, речовини, що прискорює гібридизацію клітин. Як речовину, що прискорює гібридизацію клітин, використовують, наприклад, поліетиленгліколь (PEG), гемаглютинуючий японський вірус (HVJ). При бажанні, для додаткового збільшення ефективності гібридизації можна додати допоміжний засіб, такий як диметилсульфоксид.

Можна вибрати відповідне співвідношення імунцитів і мієломних клітин. Наприклад, переважно, щоб число імунцитів було в 1-10 разів вище, ніж число мієломних клітин. Культуральний розчин, що використовується для вищезазначеної гібридизації клітин, включає в себе, наприклад, культуральний розчин RPMI1640 або культуральний розчин MEM, відповідний для вирощування вищезазначеної мієломної клітинної лінії, або інший звичайний культуральний розчин, що використовується для даного типу клітинної культури. Крім того, в поєднанні з даним розчином можна використати сироваткову добавку, таку як фетальна теляча сироватка (FCS).

Гібридизацію клітин проводять таким чином. Заздалегідь визначену кількість вищезазначених імунцитів і мієломних клітин ретельно перемішують у вищезазначеному культуральному розчині, додають нагрітий приблизно до 37°C розчин PEG (наприклад, зі середньою молекулярною масою

приблизно від 1000 до 6000) (загальна концентрація від 30 до 60% (мас./об.)), потім розчин перемішують і отримують цільову гібридну клітину (гібридому). Після цього додають відповідний культуральний розчин і декілька разів проводять стадію видалення супернатанту шляхом центрифугування, щоб видалити реагент для гібридизації клітин або інший реагент, що несприятливо впливає на ріст гібридоми.

Отриману таким чином гібридому відбирають шляхом культивування гібридоми в стандартному селекційному культуральному розчині, такому як культуральний розчин НАТ (культуральний розчин, що містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин). Культивування у вищезазначеному культуральному розчині НАТ продовжують протягом періоду часу, достатнього для того, щоб клітини, відмінні від клітин цільової гібридоми (негібридизовані клітини), загинули (звичайно від декількох днів до декількох тижнів). Потім за допомогою стандартного методу лімітуючих розведень відбирають моноклон гібридоми, який продукує цільове антитіло.

У додання до способу імунізації відмінної від людини тварини антигеном з метою отримання гібридоми, цільове людське антитіло, що володіє зв'язуючою активністю по відношенню до гліпікану 3, також можна отримати шляхом сенсibiliзації людського лімфоциту гліпіканом 3 *in vitro* і гібридизації сенсibiliзованого лімфоцита з клітиною мієломи людини, здатною до постійного ділення (див. JP-B-1-59878). В іншому способі, щоб отримати клітини, які продукують антитіло проти гліпікану 3, антиген гліпікан 3 вводять трансгенній тварині, що містить весь набір генів людських антитіл, потім отримані клітини іморталізують, і людське антитіло проти гліпікану 3 отримують з іморталізованих клітин, що продукують антитіло проти гліпікану 3 (див. міжнародні патентні заявки WO 94/25585, WO 93/12227, WO 92/03918 і WO 94/02602).

Отриману таким чином гібридому, яка продукує моноклональне антитіло, можна культивувати пасажами в стандартному культуральному розчині, або її можна зберігати протягом тривалого часу в рідкому азоті.

Одним з прикладів способу, що використовується для отримання моноклонального антитіла з гібридами, є культивування гібридами і отримання моноклонального антитіла з культурального супернатанту за допомогою стандартного методу. Інший спосіб включає в себе введення гібридами ссавцеві, сумісному з гібридомою, щоб забезпечити її проліферацію, і отримання моноклонального антитіла з асциту. Перший спосіб підходить для отримання антитіла високої чистоти, тоді як останній спосіб підходить для отримання великих кількостей антитіл.

Можна також отримати рекомбінантне антитіло з використанням методу генної інженерії, шляхом клонування гена антитіла з гібридами, вставки гена у відповідний вектор, введення вектора в хазяїна з подальшим продукуванням хазяїном рекомбінантного антитіла (наприклад, див. Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990).

Конкретно, мРНК, що кодує варіабельну (V) ділянку антитіла проти гліпікану 3, виділяють з гібридами, що продукує антитіло проти гліпікану 3. мРНК виділяють відомим способом, таким як метод ультрацентрифугування з гуанідином (Chirgwin, J. M. et al., *Biochemistry* (1979) 18, 5294-5299), або метод AGPC (Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156-159), і отримують спільну РНК, а потім цільову мРНК отримують за допомогою набору для виділення мРНК (Pharmacia) або т. п. Крім того, мРНК можна безпосередньо отримати за допомогою набору для виділення мРНК QuickPrep (Pharmacia).

кДНК V-ділянки антитіла синтезують, використовуючи зворотну транскриптазу і отриману описаним вище способом мРНК. кДНК можна синтезувати, використовуючи набір для синтезу одноланцюжкової кДНК із зворотною транскриптазою AMV (SEIKAGAKU CORPORATION) або т. п. Для синтезу і ампліфікації кДНК можна також використати, наприклад, набір 5'-Ampli FINDER RACE (Clontech), метод 5'-RACE з використанням ПЛР (Frohman, M. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., *Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 2919-2932).

Цільовий фрагмент ДНК виділяють з отриманого продукту ПЛР і потім лігують з ДНК-вектором. Реконбінантний вектор отримують з продукту, потім вектор вводять в *E. coli* або т. п. і проводять відбір колоній, отримуючи в результаті цільовий реконбінантний вектор. Потім визначають нуклеотидну послідовність цільової ДНК за допомогою відомого методу, такого як дидезоксинуклеотидний метод обриву ланцюга.

Після отримання ДНК, що кодує V-ділянку цільового антитіла проти гліпікану 3, її вставляють у вектор експресії, який містить ДНК, що кодує константну ділянку (C-ділянка) цільового антитіла.

Щоб отримати антитіло проти гліпікану 3, що використовується в даному винаході, ген антитіла вставляють у вектор експресії так, щоб ген експресувався під управлінням ділянки, регулюючої експресію гена, що включає в себе, наприклад, енкапсер і промотор. Потім клітину-хазяїна трансформують вектором експресії, щоб забезпечити експресію антитіла хазяїном.

Ген антитіла можна експресувати шляхом роздільного введення у вектор експресії полінуклеотиду, що кодує Н-ланцюг, або полінуклеотиду, що кодує L-ланцюг, з подальшою одночасною трансформацією клітини-хазяїна векторами, або шляхом введення в один вектор експресії полінуклеотидів, що кодують Н-ланцюг і L-ланцюг, з подальшою трансформацією клітини-хазяїна вектором (див. міжнародну патентну заявку WO 94/11523).

#### Полінуклеотид

В іншому аспекті даний винахід пропонує полінуклеотид, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга або варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла даного винаходу. Переважно, полінуклеотид даного винаходу має нуклеотидну послідовність, описану в будь-якій з SEQ ID NO: 11-21, 33-43, 55-59, 65-70 і 77-83. Даний винахід також охоплює полінуклеотид, який гібридується з вищеза-

значеним полінуклеотидом в жорстких умовах і кодує антитіло, що володіє активністю, еквівалентною активності антитіла даного винаходу.

Полінуклеотид даного винаходу особливо не обмежується, за умови, що він кодує антитіло даного винаходу. Він являє собою полімер, що складається з сукупності нуклеотидів, таких як дезоксирибонуклеїнові кислоти (ДНК) або рибонуклеїнові кислоти (РНК). Він може містити основу, відмінну від тієї, що зустрічається в природі. Полінуклеотид даного винаходу можна використати для отримання антитіла за допомогою методу генної інженерії. Крім того, полінуклеотид даного винаходу можна використати як зонд для відбору антитіла, функціонально еквівалентного антитілу даного винаходу. Тобто полінуклеотид, що кодує антитіло даного винаходу, або його фрагмент, можна використати як зонд для отримання ДНК, якій гібридується з даним полінуклеотидом в жорстких умовах і кодує антитіло, що володіє активністю, еквівалентною активності антитіла даного винаходу, за допомогою таких методів, як метод гібридизації, метод ампліфікації генів (наприклад, ПЛР). Така ДНК також включена в полінуклеотид даного винаходу.

Методи гібридизації (Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning* 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) добре відомі фахівцям в даній галузі. Приклади умов гібридизації включають в себе, наприклад, умови низької жорсткості. До умов низької жорсткості відносяться, наприклад, наступні умови: 42°C, 0,1xSSC і 0,1% SDS, переважно, 50°C, 0,1xSSC і 0,1% SDS, якщо промивання проводять після гібридизації. Більш переважні приклади умов гібридизації включають в себе, наприклад, умови високої жорсткості. До умов високої жорсткості відносяться, наприклад, наступні умови: 65°C, 5xSSC і 0,1% SDS. У вказаних умовах можна чекати, що при більш високій температурі буде відбуватися ефективне утворення полінуклеотиду, що володіє більш високою мірою гомології. До того ж, існує декілька факторів, які впливають на точність гібридизації, наприклад, температура і концентрація солі, і шляхом відповідного підбору даних факторів фахівець в даній галузі можуть досягнути схожої точності.

Антитіло, функціональне еквівалентне антитілу даного винаходу, що кодується, полінуклеотидом, отриманим таким методом гібридизації і методом ампліфікації генів, володіє високою мірою гомології з антитілом з точки зору амінокислотної послідовності. Антитіло даного винаходу також включає в себе антитіло, функціональне еквівалентне антитілу даного винаходу, і володіє високою мірою гомології відносно амінокислотної послідовності антитіла. Висока міра гомології означає, як правило, щонайменше, 50% або більш високу ідентичність, переважно, 75% або більш високу ідентичність, більш переважно, 85% або більш високу ідентичність, і ще більш переважно, 95% або більш високу ідентичність, на амінокислотному рівні. Щоб визначити гомологію поліпептидів, можна використати алгоритм, описаний в літературі (Wilbur, W. J. and Lipman, D. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) 80, 726-730).

Даний винахід також пропонує вектор, що містить полінуклеотид даного винаходу. Такий вектор можна використати для отримання антитіла даного винаходу. Якщо як хазяїн використовується *E. coli*, вектор даного винаходу, наприклад, особливо не обмежується, поки він має "ori" для ампліфікації в *E. coli* з метою отримання і ампліфікації вектора у великій кількості в *E. coli* (наприклад, JM109, DH5 $\alpha$ , HB101 або XLBlue), і містить маркерний ген для селекції трансформованих *E. coli* (наприклад, ген стійкості до лікарського засобу, який можна ідентифікувати за допомогою лікарського засобу, такого як ампіцилін, тетрациклін, канаміцин або хлорамфенікол). Приклади вектора включають в себе вектори серії M13, вектори серії pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script і т. п. Крім того, для субклонування і витягання кДНК нарівні з описаними вище векторами можна використати pGEM-T, pDIRECT і pT7.

Як вектор даного винаходу переважно використати вектор експресії. Наприклад, вектор експресії, призначений для використання в *E. coli*, повинен мати характеристики, вказані для ампліфікації в *E. coli*. Крім того, якщо як клітина-хазяїн використовують *E. coli*, наприклад, JM109, DH5 $\alpha$ , HB101 або XLBlue, вектор обов'язково повинен містити промотор, наприклад, промотор lacZ (Ward et al., Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), промотор araB (Better et al., Science (1988) 240, 1041-1043), промотор T7 або т. п., який забезпечує ефективну експресію цільового продукту в *E. coli*. Приклади такого вектора включають в себе pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Qiagen), pEGFP, pET (в цьому випадку хазяїном переважно є BL21, який експресує РНК-полімеразу T7) і т. п., а також вектори, описані вище.

Вектор також може містити сигнальну послідовність для секреції поліпептиду. Якщо поліпептид продукується в периплазмі *E. coli*, як сигнальну послідовність для секреції поліпептиду можна використати сигнальну послідовність *pelB* (Lei S. P. et al., J. Bacteriol (1987) 169, 4379). Введення вектора в клітину-хазяїна можна здійснювати, наприклад, з використанням хлориду кальцію і методом електропорації.

Як вектор даного винаходу, на додаток до *E. coli*, можна використати, наприклад, вектори експресії, отримані з ссавців (наприклад, pCDNAS (Invitrogen) і pEGF-BOS (Nucleic Acids Res. (1990) 18(17), p5322), pEF і pCDMS), вектори експресії, отримані з клітин комах (наприклад, "бакуловірусна система експресії Bac-to-BAC" (GIBCO BRL) і pBacPAKS), вектори експресії, отримані з рослин (наприклад, pMH1 і pMH2), вектори експресії, отримані з вірусів тварин (наприклад, pHSV, pMV і pAdexLcw), вектори експресії, отримані з ретровірусів (наприклад, pZIPneo), вектори експресії, отримані з дріжджів (наприклад, "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNVII і SP-Q01), і вектори експресії, отримані з *Bacillus subtilis* (наприклад, pPL608 і pKTHSO).

Для експресії в тваринній клітині, такий як клітина CHO, клітина COS, клітина NIH3T3 і т. п., вектор обов'язково повинен містити промотор, необхідний для експресії в клітині, наприклад,

промотор SV40 (Mulligan et al., Nature (1979) 277, 108), промотор MMTV-LTR, промотор EFloc (Mizushima et al., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322), промотор CMV або т. п., і, більш переважно, він повинен містити маркерний ген (такий як ген стійкості до лікарського засобу, який можна ідентифікувати за допомогою лікарського засобу, такого як неоміцин або G418), що допомагає відбрати трансформовані клітини. Приклади вектора, що має такі характеристики, включають в себе, наприклад, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV і pORI3.

Далі, щоб забезпечити стабільну експресію гена і одночасно збільшення числа піків гена в клітині, в клітину CHO з дефіцитом в шляху синтезу нуклеїнових кислот вводять вектор (наприклад, pCHO1 і інш.), що містить ген DHFR, щоб заповнити дефіцит, і ампліфікують його з метотрексатом (MTX). Щоб забезпечити тимчасову експресію гена, трансформацію проводять з використанням вектора (такого як pCD), що містить ділянку ініціації реплікації SV40, і з використанням клітини COS, що містить на хромосомі ген, що забезпечує експресію антигену SV40 T. Як ділянку ініціації реплікації можна використати ділянку ініціації з вірусу поліоми, аденовірусу, вірусу бичачої папіломи (BPV) і т. п. Щоб забезпечити збільшення числа піків гена в системі клітини-хазяїна, вектор експресії може включати в себе, як маркер селекції, ген аміноглікозидтрансферази (APH), ген тимідинкінази (TK), ген ксантингуанінфосфорибозилтрансферази *E. coli* (*Eco*gpt), ген дигідрофолатредуктази (*dhfr*) і т. п.

Щоб отримати антитіло даного винаходу, вектор вводять в клітину-хазяїна. Клітина-хазяїн, в яку вводять вектор, особливо не обмежується, однак вона включає в себе, наприклад, *E. coli* або будь-яку тваринну клітину. Наприклад, клітину-хазяїна можна використати як систему продукування для продукування або експресії антитіла даного винаходу. Що стосується системи продукування, що використовується для отримання поліпептиду, існує система продукування *in vitro* і система продукування *in vivo*. У системі продукування *in vitro* використовуються еукаріотичні і прокаріотичні клітини.

Як еукаріотичні клітини можна використати, наприклад, тваринні клітини, рослинні клітини або грибові клітини. Відомі тваринні клітини включають в себе клітини ссавців, такі як клітини CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945), клітини COS, клітини 3T3, клітини мієломи, клітини нирок дитинчат хом'яків (BHK), клітини HeLa і клітини Vero, клітини амфібій, такі як яйцеклітини *Xenopus* (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340), або клітини комах, такі як Sf9, Sf21 і Tn5. У даному винаході переважно використовують клітини CHO-DG44, CHO-DXB11, COS7, BHK. Для забезпечення широкомасштабної експресії з тваринних клітин переважно використати клітини CHO. Введення вектора в клітину-хазяїна можна здійснити, наприклад, з використанням фосфату кальцію, DEAE-декстрану, катіонного рибозомного DOTAP (Boehringer Mannheim), методу електропорації, методу ліпофекції або т. п.

З рослинних клітин як систему продукування білків використовують, наприклад, клітини *Nicotiana tabacum*, які можуть бути піддані калюсному культивуванню. Приклади грибкових клітин включають в себе клітини дріжджів, наприклад, що відносяться до роду *Saccharomyces*, більш конкретно, *Saccharomyces cerevisiae* і *Saccharomyces pombe*, і гіфоміцетів, наприклад, що відносяться до роду *Aspergillus*, більш конкретно, *Aspergillus niger*.

У випадку прокаріотичних клітин можна використати систему продукування із застосуванням бактерійної клітини. Приклади бактерійних клітин включають в себе *Escherichia coli* (*E. coli*), такі як JM109, DH5 $\alpha$  і HB101, і *Bacillus subtilis*.

Отримання рекомбінантного антитіла

Антитіло даного винаходу можна отримати шляхом культивування вищезгаданих клітин-хазяїв. Антитіло можна отримати шляхом культивування *in vitro* клітини, трансформованої цільовим полінуклеотидом. Культивування можна провести за допомогою відомого методу. Культуральне середовище для тваринних клітин включає в себе, наприклад, DMEM, MEM, RPMI 1640 і IMDM. Середовище може бути доповнене сироваткою, такою як FBS або фетальна теляча сироватка (FCS), або можна використати середовище, що не містить сироватки. pH в процесі культивування переважно знаходиться в інтервалі від 6 до 8. Культивування звичайно проводять приблизно при 30-40°C протягом приблизно 15-200 годин, за необхідності, зі зміною середовища, при аерації і струшуванні.

З іншого боку, системи для отримання поліпептиду *in vivo* включають в себе, наприклад, систему продукування, в якій використовується тварина, і систему продукування, в якій використовується рослина. Цільовий полінуклеотид вводять в таку тварину або рослину, і в організмі тварини або рослини продукується поліпептид, який потім витягують. Термін "клітина-хазяїн" в даному описі охоплює таку тварину і рослину.

У випадку використання тварини доступні системи продукування із застосуванням ссавця або комахи. Як ссавців можна використати кіз, свиней, овець, мишей і велику рогату худобу (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Також можна використати трансгенного ссавця.

Наприклад, цільовий полінуклеотид отримують у вигляді гібридного гена з геном, що кодує поліпептид, який в природі продукується в молоці, наприклад, козячий казеїн р. Потім фрагмент ДНК, що містить даний гібридний ген, вводять в ембріон кози і ембріон трансплантують козі. Цільове антитіло можна отримати з молока трансгенної кози, народженої козою, що отримала ембріон, або її нащадка. Для збільшення кількості продукованого молока, що містить антитіло, трансгенній козі за необхідності можна дати гормон. (Ebert, K. M. et al., Bio/Technology (1994) 12,699-702).

Як комаху, наприклад, можна використати шовковичного шовкопряда. У випадку використання шовковичного шовкопряда, його інфікують бакуловірусом, в який вбудований полінуклеотид, що кодує цільове антитіло. Цільове антитіло можна

отримати з рідини організму шовковичного шовкопряда (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594).

Як рослину можна використати, наприклад, тютюн. При використанні тютюну полінуклеотид, що кодує цільове антитіло, вставляють у вектор експресії для рослини, наприклад, pMON 530, а потім вектор вводять в бактерію, таку як *Agrobacterium tumefaciens*. Потім тютюн, такий як *Nicotiana tabacum*, інфікують бактерією і в результаті з листя тютюну отримують цільове антитіло (Julian, K. -C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138).

Отримане таким чином антитіло можна виділити з внутрішнього або зовнішнього (культуральне середовище і т. п.) середовища клітини-хазяїна і потім його можна очистити практично до чистого стану і однорідного антитіла. Виділення і очищення антитіла можна провести за допомогою методу виділення і очищення, який звичайно використовується для очищення поліпептидів. Наприклад, поліпептиди можна виділяти і очищати будь-якими методами, включаючи колонкову хроматографію, фільтрацію, ультрафільтрацію, висолювання, осадження розчинником, екстракцію розчинником, перегонку, імунопреципітацію, електрофорез на SDS-поліакриламідному гелі, гель-електрофорез, ізоелектричне фокусування, діалізи, перекристалізацію, а також їх поєднання.

Приклади хроматографічних методів включають в себе, наприклад, афінну хроматографію, іонообмінну хроматографію, гідрофобну хроматографію, гель-фільтрацію, хроматографію на зверненій фазі, адсорбційну хроматографію (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Вказані хроматографічні методи можна провести з використанням рідинної хроматографії, такої як ВЕРХ і FPLC (fast-protein liquid chromatography - рідинна експрес-хроматографія білків). Приклади колонок, що використовуються для афінної хроматографії, включають в себе колонку з білком А або колонку з білком G. Прикладом колонки з білком А є Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia).

Крім того, до або після очищення, у міру необхідності, антитіло можна модифікувати, або можна частково видалити пептиди, шляхом використання відповідного ферменту, що модифікує білки. Фермент, який модифікує білки, що використовується для даної мети, включає в себе, наприклад, трипсин, хімотрипсин, лізилендопептидазу, протеїнаїназу, глюкозидазу.

Діагностичний метод

В іншому аспекті даний винахід пропонує метод діагностики захворювання, такого як рак, шляхом детекції білка GPC3 в зразку, що аналізується за допомогою антитіла даного винаходу.

Детекція, що використовується в даному описі, включає в себе кількісну детекцію і не кількісну детекцію. Некількісна детекція включає в себе, наприклад, просто визначення присутності білка GPC3, визначення присутності конкретної або більшої кількості білка GPC3, порівняння кількості білка GPC3 з його кількістю в іншому зразку (на-

приклад, в контрольному зразку). Кількісна детекція включає в себе визначення концентрації білка GPC3, визначення кількості білка GPC3.

Зразок, що аналізується, особливо не обмежується, поки він являє собою зразок, який може містити білок GPC3, однак переважно він являє собою зразок, взятий у живого організму, такого як ссавець, і більш переважно він являє собою зразок, взятий у людини. Конкретні приклади зразка, що аналізується можуть включати в себе, наприклад, кров, інтерстиціальну рідину, плазму, позасудинну рідину, мозкову рідину, синовіальну рідину, плевральну рідину, сироватку, лімфатичну рідину, слину, переважно кров, сироватку і плазму. Крім того, термін "зразок даного винаходу, що аналізується" також включає в себе зразок, отриманий із зразка, що аналізується, такий як культуральний розчин клітин, зібраних від живого організму.

Вид раку, що діагностується, особливо не обмежується, і конкретні приклади можуть включати в себе рак печінки, рак підшлункової залози, рак легені, рак товстої кишки, рак молочної залози, рак простати, лейкоз і лімфому, переважно рак печінки. Детектований GPC3 особливо не обмежується і може являти собою або повнорозмірний GPC3, або його фрагмент. Якщо детектують фрагмент GPC3, він може являти собою або N-кінцевий фрагмент, або C-кінцевий фрагмент, однак N-кінцевий фрагмент є переважним. Крім того, білок GPC3 може являти собою GPC3 з доданим гепарансульфатом або коровий білок GPC3.

Метод детекції білка GPC3, що міститься в аналізованому зразку, особливо не обмежується, однак детекцію переважно проводять імунологічним методом з використанням антитіла проти GPC3. Приклади імунологічних методів включають в себе, наприклад, радіоімунологічний аналіз, імуноферментний аналіз, імунофлуоресцентний аналіз, імунолюмінесцентний аналіз, імунопреципітацію, турбідиметричний імунологічний аналіз. Переважно використати імуноферментний аналіз, особливо переважно, твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA) (наприклад, сендвіч-метод ELISA). Вищезгаданий імунологічний аналіз, такий як ELISA, можна провести відомим в даній галузі методом.

Загальний метод детекції з використанням антитіла проти GPC3 включає в себе іммобілізацію антитіла проти GPC3 на підкладці, додання зразка, що аналізується, інкубацію підкладки, щоб забезпечити зв'язування антитіла проти GPC3 з білком GPC3, промивання підкладки і детекцію зв'язування білка GPC3 з підкладкою за допомогою антитіла проти GPC3 в зразку, що аналізується.

Зв'язування антитіла проти GPC3 з білком GPC3 звичайно протікає в буфері. Буфери, що використовуються в даному винаході, включають в себе, наприклад, фосфатний буфер, Tris-буфер. Інкубацію проводять в звичайних умовах, наприклад, при температурі від 4°C до кімнатної, протягом 1-24 годин. Промивання після інкубації можна провести будь-яким методом, який не супроводжується інгібуванням зв'язування білка GPC3 з антитілом проти GPC3, з використанням, напри-

клад, буфера, що містить поверхнево-активну речовину, таку як Tween 20.

У способі детекції білка GPC3 даного винаходу крім зразка, що аналізується на білок GPC3, може бути присутнім контрольний зразок. Контрольні зразки включають в себе зразки негативного контролю, які не містять білка GPC3, і зразки позитивного контролю, які містять білок GPC3. У цьому випадку білок GPC3 в зразку, що аналізується можна детектувати шляхом порівняння результатів, отриманих з використанням зразка негативного контролю, який не містить білок GPC3, з результатами, отриманими з використанням зразка позитивного контролю, який містить білок GPC3. Білок GPC3, що міститься в зразку, який аналізується, також можна кількісно визначити шляхом отримання результатів детекції контрольних зразків і зразка, що аналізується, у вигляді числових значень і порівняння отриманих числових значень.

Переважним втіленням детекції зв'язування білка GPC3 з підкладкою за допомогою антитіла проти GPC3 є метод, в якому використовується антитіло проти GPC3, мічене детектованою міткою. Наприклад, білок GPC3 можна детектувати шляхом приведення в контакт зразка, що аналізується, з антитілом проти GPC3, іммобілізованим на підкладці, промивання підкладки і потім детекції GPC3 за допомогою міченого антитіла, яке специфічно зв'язується з білком GPC3.

Антитіло проти GPC3 можна мітити за допомогою загальновідомого методу. Приклади відомих в даній галузі детектованих міток включають в себе флуоресцентний барвник, фермент, кофермент, хемілюмінесцентну речовину або радіоактивну речовину. Конкретні приклади можуть включати в себе радіоактивні ізотопи ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{131}\text{I}$  і т. п.), флуоресцеїн, родамін, дансилхлорид, умбеліферон, люциферазу, пероксидазу, лужну фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу,  $\beta$ -глюкозидазу, пероксидазу хрону, глюкоамілазу, лізозим, сахаридоксидазу, мікропероксидазу, біотин і т. п. У випадку використання біотину як детектованої мітки переважно додавати мічене біотином антитіло і потім авідин, кон'югований з ферментом, таким як лужна фосфатаза.

Конкретно, розчин, що містить антитіло проти GPC3, додають до підкладки, такої як планшет, щоб іммобілізувати на ній антитіло проти GPC3. Після промивання планшет блокують, наприклад, з допомогою БСА, щоб запобігти неспецифічному зв'язуванню білка. Планшет знов промивають і зразок, що потім аналізується додають до планшета. Після інкубації планшет промивають і потім додають мічене антитіло проти GPC3. Після інкубації у відповідних умовах планшет промивають і потім детектують мічене антитіло проти GPC3, що залишилося на планшеті. Білок можна детектувати відомим в даній галузі методом. Наприклад, якщо антитіло мітять радіоактивною речовиною, білок можна детектувати за допомогою рідинного сцинтиляційного аналізу або методом PIA. Якщо антитіло мітять ферментом, білок можна детектувати шляхом додання субстрату і детекції ферментативної зміни субстрату, такої як розвиток забарвлення, за допомогою пристрою зчитування абсорбції.

Якщо антитіло мітять флуоресцентною речовиною, білок можна детектувати з допомогою флуориметра.

Особливо переважним втіленням методу детекції білка GPC3 даного винаходу є метод, в якому використовується антитіло проти GPC3, мічене біотином і авідіном. Конкретно, розчин, що містить антитіло проти GPC3, додають до підкладки, такої як планшет, щоб іммобілізувати на ній антитіло проти GPC3. Після промивання планшет блокують, наприклад, за допомогою БСА, щоб запобігти неспецифічному зв'язуванню білка. Планшет знов промивають і потім зразок, що аналізується, додають до планшета. Після інкубації планшет промивають і потім додають антитіло проти GPC3, мічене біотином. Після інкубації у відповідних умовах планшет промивають і потім додають авідин, кон'югований з ферментом, таким як лужна фосфатаза або пероксидаза. Після інкубації планшет промивають і потім додають субстрат ферменту, кон'югованого з авідіном. Потім білок GPC3 детектують по ферментативній зміні субстрату як індикатора.

Іншим втіленням методу детекції білка GPC3 даного винаходу є метод, в якому використовується первинне антитіло, яке специфічно зв'язується з білком GPC3, і вторинне антитіло, яке специфічно зв'язується з первинним антитілом. Наприклад, зразок, що аналізується, приводять в контакт з антитілом проти GPC3, іммобілізованим на підкладці, підкладку інкубують, промивають і пов'язаний білок GPC3 після промивання детектують за допомогою первинного антитіла проти GPC3 і вторинного антитіла, яке специфічно зв'язується з первинним антитілом. У цьому випадку вторинне антитіло переважно мітять детектованою міткою.

Конкретно, розчин, що містить антитіло проти GPC3, додають до підкладки, такої як планшет, щоб іммобілізувати на ній антитіло проти GPC3. Після промивання планшет блокують, наприклад, за допомогою БСА, щоб запобігти неспецифічному зв'язуванню білка. Планшет знов промивають і потім, зразок, аналізується, додають до планшета. Після інкубації планшет промивають і потім додають первинне антитіло проти GPC3. Після інкубації у відповідних умовах планшет промивають і потім додають вторинне антитіло, яке специфічно зв'язується з первинним антитілом. Після інкубації у відповідних умовах планшет промивають і потім детектують вторинне антитіло, що залишилося на планшеті. Вторинне антитіло можна детектувати вищезазначеним методом.

#### Фармацевтична композиція

В іншому аспекті даний винахід пропонує фармацевтичну композицію, що містить антитіло даного винаходу. Фармацевтичну композицію, що містить антитіло даного винаходу, використовують для лікування і/або профілактики захворювання, пов'язаного з проліферацією клітин, такого як рак, і особливо її використовують для лікування і/або профілактики раку печінки. Якщо антитіло даного винаходу використовують у вигляді фармацевтичної композиції, антитіло може бути введене до складу лікарської форми відомим в даній галузі способом. Наприклад, фармацевтичну композицію

можна вводити парентерально шляхом ін'єкції стерильного розчину або суспензії у воді, або іншого фармацевтично прийнятного розчину. Наприклад, антитіло можна ввести до складу лікарської форми шляхом змішування його відповідним чином з фармацевтично прийнятим носієм або розчинником, таким як стерильна вода, фізіологічний розчин, рослинна олія, емульгатор, суспензія, поверхнево-активна речовина, стабілізатор, флаворант, ексципієнт, носій, консервант, зв'язуючий засіб, з отриманням стандартної лікарської форми, відповідної загальноприйнятим вимогам застосування лікарських засобів (Drug Implementation). Кількість активних інгредієнтів в даних препаратах вибирають так, щоб забезпечити введення відповідної дози у вказаному інтервалі.

Стерильну композицію для ін'єкцій можна отримати з використанням такого носія, як дистильована вода для ін'єкцій, відповідно до загальних положень по застосуванню лікарських засобів.

Приклади водного розчину для ін'єкцій включають в себе, наприклад, фізіологічний розчин, розчин глюкози і інші ізотонічні рідини, що включає в себе домішки, такі як D-сорбіт, D-маноза, D-маніт і хлорид натрію. Їх можна використати в поєднанні з відповідним солюбілізатором, таким як спирт, особливо етанол, багатоатомний спирт, такий як пропіленгліколь і поліетиленгліколь, і неіонна поверхнево-активна речовина, така як полісорбат 80 (TM) і HCO-50.

Кунжутну олію або соєву олію можна використати як маслянисту рідину в поєднанні з бензилбензоатом або бензиловим спиртом як солюбілізатором. Вона може входити до складу композиції разом з буфером, таким як фосфатний буфер або натрій-ацетатний буфер, знеболюючим засобом, таким як прокаїну гідрохлорид, стабілізатором, таким як бензиловий спирт або фенол, або антиоксидантом. Отриманим розчином для ін'єкції звичайно заповнюють відповідну ампулу.

Переважно використовують парентеральне введення, конкретні приклади якого включають в себе ін'єкцію, трансназальне введення, транспульмональне введення, черезшкірне введення і т. п. Композицію для ін'єкції можна вводити системно або місцево шляхом внутрішньовенної ін'єкції, внутрішньом'язової ін'єкції, внутрішньочеревинної ін'єкції, підшкірної ін'єкції або т. п.

У залежності від віку пацієнта і симптомів захворювання вибирають відповідний спосіб введення. Наприклад, одна доза фармацевтичної композиції, що містить антитіло або полінуклеотид, що кодує антитіло, може бути вибрана з інтервалу від 0,0001 мг до 1000 мг на кг маси тіла. Альтернативно, наприклад, доза може бути вибрана з інтервалу від 0,001 мг до 100000 мг/організм пацієнта, хоча вона не завжди обмежується вказаними числовими значеннями. Дозу і спосіб введення вибирає фахівець в даній галузі в залежності від маси тіла і віку пацієнта і симптомів захворювання.

Всі патенти і посилання, що цитуються в даному описі, включені в нього як посилання. Весь зміст, розкритий в описі і малюнках патентної заявки Японії № 2004-203637, по відношенню до якої

дана заявка заявляє пріоритет, включений в даний опис як посилання.

#### Приклади

Даний винахід буде описаний більш детально з посиланням на приведені нижче приклади. Однак даний винахід не обмежується даними прикладами.

#### Приклад 1

кДНК-клонування людського гліпікану 3 (GPC3)  
Повнорозмірну кДНК, що кодує людський GPC3, ампліфікують методом ПЛР, використовуючи набір Advantage 2 (CLONTECH) і одноланцюжкову кДНК, отриману звичайним методом з клітинної лінії раку товстої кишки, Caco2, як матриці. Більш конкретно, 50 мкл реакційної суміші, що містить 2 мкл кДНК, отриманої з Caco2, 1 мкл смислового праймера (GATATC-ATGGCCGGGACCGTGCGCACCGCGT: SEQ ID NO: 1), 1 мкл антисмислового праймера (GCTAGC-TCAGTGCACCAGGAAGAAGAAGCAC: SEQ ID NO: 2), 5 мкл 10x буфера для ПЛР Advantage 2, 8 мкл суміші dNTP (1,25 мМ) і 1,0 мкл полімеразної суміші Advantage піддають 35 циклам, що включають в себе 94°C протягом 1 хвилини, 63°C протягом 30 секунд і 68°C протягом 3 хвилин. Ампліфікований продукт реакції ПЛР вставляють у вектор TA, pGEM-T Easy, використовуючи pGEM-T Easy Vector System I (Promega). Послідовність підтверджують з допомогою ДНК-секвенатора ABI 3100. Таким чином, виділяють кДНК, що кодує повнорозмірний людський GPC3. Послідовність, описана в SEQ ID NO: 3, відповідає нуклеотидній послідовності гена людського GPC3, а послідовність, описана в SEQ ID NO: 4, відповідає амінокислотній послідовності людського білка GPC3.

#### Приклад 2

##### Отримання розчинної форми GPC3

Отримують імунний білок для утворення антитіла проти GPC3, розчинну форму білка GPC, в якій видалена гідрофобна ділянка на С-кінцевій стороні (амінокислоти 564-580).

Використовуючи як матрицю кДНК повнорозмірного людського GPC3, проводять реакцію ПЛР з використанням антисмислового праймера (ATA GAA TTC CAC CAT GGC CGG GAC CGT GCG 3: SEQ ID NO: 5) і смислового праймера, до якого додають послідовність розпізнавання EcoRI і послідовність Козака (ATA GGA TCC CTT CAG CGG GGA ATG AAC GTT 3: SEQ ID NO: 6). Фрагмент, отриманий внаслідок реакції ПЛР (1711 п.о.), клонують в pCXND2-Flag. Конструюють pCXND2-Flag для експресії Flag-міченого білка шляхом вставки ділянки, що забезпечує експресію гена DHFR pCHOI (Hirata et al., FEBS letter 1994; 356; 244-248), в сайтHindIII pCXN2 (Niwa et al., Gene 1991; 108; 193-199) і додання маркерної послідовності нижче за ділянку мультиклонування. Сконструйовану експресійну плазмиду ДНК вводять в клітинну лінію CHO, DXB11, і клітинну лінію CHO, ефективно експресуючу розчинну форму GPC3, отримують в результаті селекції з використанням 500 мкг/мл генетицину. Проводять широкомасштабне культивування клітинної лінії CHO, ефективно експресуючої розчинну форму GPC3, використовуючи 1700-см<sup>2</sup> ролерний флакон, і витягують культура-

льний супернатант для виділення антитіла. Культуральний супернатант наносять на колонку Fast Flow з DEAE-сефарозою (Amersham), після промивання антитіло елюють буфером, що містить 500 мМ NaCl, і піддають його афінному очищенню, використовуючи агарозний афінний гель Anti-Flag M2 (SIGMA). Елювання проводять з використанням 200 мкг/мл пептиду FLAG. Після концентрування елюату за допомогою Centriprep-10 (Millipore), пептид FLAG видаляють гел'єфільтрацією з використанням Superdex 200 HR 10/30 (Amersham). І нарешті, фільтрат концентрують, використовуючи колонку Fast Flow з DEAE-сефарозою, і елюють PBS (утримуючим 500 мМ NaCl), що не містить Tween 20, щоб забезпечити заміну буфера.

#### Приклад 3

##### Отримання розчинної форми корового білка GPC3

GPC3 модифікують гепарансульфатом з отриманням макромолекули. Щоб в скринінгу на антитіло проти GPC3 усунути антитіло проти гепарансульфата, отримують розчинну форму корового білка GPC3, який має мутацію в ділянці зв'язування гепарансульфату, і використовують його в скринінгу.

Використовуючи вищезазначену розчинну форму GPC3 (1-563) як матрицю, кДНК, в якій залишки Ser в положеннях 495 і 509 замінені на Ala, отримують шляхом збирання методом ПЛР, в якому використовуються праймери, сконструйовані так, щоб забезпечити додання His-маркера до С-кінця. Отриману кДНК клонують у векторі pCXND3. pCXNDS конструюють шляхом вставки ділянки pCHOI, що забезпечує експресію гена DHFR, в ділянку HindIII pCXN2. Сконструйовану експресійну плазмиду ДНК вводять в клітинну лінію DXB11, і клітинну лінію CHO, ефективно експресуючу розчинну форму корового білка GPC3, отримують в результаті селекції з використанням 500 мкг/мл генетицину.

Проводять широкомасштабне культивування, використовуючи 1700-см<sup>2</sup> ролерний флакон, і витягують культуральний супернатант для виділення антитіла. Культуральний супернатант наносять на колонку Fast Flow з Q-сефарозою (Amersham). Після промивання антитіло елюють фосфатним буфером, що містить 500 мМ NaCl, і піддають його афінному очищенню, використовуючи колонку Fast Flow з хелатуючою сефарозою (Amersham). Антитіло елюють градієнтом 10-150 мМ імідазолу. І нарешті, елюат концентрують, використовуючи колонку Fast Flow з Q-сефарозою, і елюють фосфатним буфером, що містить 500 мМ NaCl.

Електрофорез на SDS-поліакриламідному гелі у відновлювальних умовах показує три смуги, відповідних 70 кДа, 40 кДа і 30 кДа. Результат амінокислотного секвенування за допомогою білкового секвенатора ABI492 (Applied Biosystems) показує, що смуга 30 кДа відповідає амінокислотній послідовності GPC3, починаючи з 359-ої амінокислоти і нижче, або з 375-ої амінокислоти і нижче, дозволяючи передбачити, що GPC3 розщеплюється між Arg358 і Ser359 або між Lys374 і Val375, отже, він

розділяється на N-кінцевий фрагмент розміром 40 кДа і C-кінцевий фрагмент розміром 30 кДа.

#### Приклад 4

Отримання клітинної лінії CHO, яка експресує повнорозмірний людський GPC3

Для оцінки зв'язуючої активності за допомогою проточної цитометрії отримують клітинну лінію CHO, яка експресує повнорозмірний GPC3.

Змішують десять мікрограм вектора експресії, що містить ген повнорозмірного людського GPC3, і 60 мкл SuperFect (QIAGEN). Після утворення комплексу здійснюють введення гена шляхом додання його до клітинної лінії CHO, DXB11. Після культивування протягом 24 годин в CO<sub>2</sub>-інкубаторі починають селекцію, використовуючи середовище  $\alpha$ MEM (GIBCO BRL), що містить генетин з кінцевою концентрацією 0,5 мг/мл і 10% FBS. Збирають отримані стійкі до генетичної колонії і проводять клонування клітин, використовуючи метод лімітуючих розведень. Кожний клітинний клон солюбілізують і підтверджують експресію повнорозмірного людського GPC3 методом вестерн-блотингу з використанням антитіла проти GPC3. Таким чином, отримують клітинну лінію зі стабільною експресією.

#### Приклад 5

Визначення зв'язуючої активності методом ELISA

Розчинну форму корового білка GPC3 розбавляють до концентрації 1 мкг/мл буфером для покриття (0,1 моль/л NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,6), 0,02% (мас/об.) NaN<sub>3</sub>), вносять в імунопланшет і залишають при 4°C протягом ночі, щоб завершилося покриття планшета. Після блокування планшета буфером для розбавлення (50 ммоль/л Tris-HCl (pH 8,1), 1 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>, 150 ммоль/л NaCl, 0,05% (об./об.) Tween 20, 0,02% (мас/об.) NaN<sub>3</sub>, 1% (мас/об.) BSA) додають антитіло проти GPC3 і залишають стояти при кімнатній температурі протягом 1 години. Промивають буфером для промивання (0,05% (об./об.) Tween 20, PBS), потім додають антитіло проти мишачих IgG (ZYMED), мічене лужною фосфатазою, і залишають стояти при кімнатній температурі протягом 1 години. Промивають буфером для промивання, потім додають SIGMA 104 (SIGMA), розбавлений до концентрації 1 мг/мл субстратним буфером (50 ммоль/л NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,8), 10 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>), і залишають стояти при кімнатній температурі протягом 1 години для розвитку забарвлення. Потім вимірюють поглинання (при 405 нм, довжина хвилі порівняння 655 нм) за допомогою Benchmark Plus (BIO-RAD).

#### Приклад 6

Імунізація розчинною формою GPC3 і селекція гібридоми

Оскільки людський GPC3 і мишачий GPC3 володіють високою гомологією, 94%, на амінокислотному рівні, вважається, що важко отримати антитіло проти GPC3, якщо імунізують нормальну мишу. Тому як тварину, що імунізується, використовують мишу з аутоимунним захворюванням, мишу MRL/MpJUmCrj-lpr/lpr, (далі згадується як миша MRL/lpr, що поставляється Charles River Japan, Inc.). Мишей починають імунізувати у віці 7 або 8 тижнів. Першу імунізацію проводять таким

чином: отримують розчинну форму GPC3 в кількості 100 мкг/особень, емульгують, використовуючи повний ад'ювант Фрейнда (FCA, Becton Dickinson), і вводять підшкірно. Через два тижні отримують розчинну форму GPC3 в кількості 50 мкг/особень, емульгують, використовуючи неповний ад'ювант Фрейнда (FIA, Becton Dickinson), і вводять підшкірно. Потім кожний тиждень проводять додаткову імунізацію, усього 5 разів. Під час останньої імунізації двом імунізованим мишам вводять в хвостову вену розчинну форму GPC3, розбавлену PBS до 50 мкг/особень. На четвертий день після останньої імунізації селезінку видаляють і отримують клітини селезінки, які змішують з клітинами мишачої мієломи, P3-X63Ag8UI (P3U1, отриманими від ATCC), в співвідношенні 2:1. Гібридизацію клітин проводять шляхом поступового додання PEG 1500 (Roche Diagnostic). Обережно додають середовище RPMI 1640 (GIBCO BRL), щоб розбавити PEG 1500, потім PEG 1500 видаляють центрифугуванням, клітини суспендують в середовищі RPMI 1640, що містить 10% FBS, і вносять в 96-ямковий культуральний планшет в кількості 100 мкл/ямка. На наступний день додають середовище RPMI 1640, що містить 10% FBS, домішку до середовища 1x HAT (SIGMA) і домішку для клонування гібридами 0,5xBM-Condimed H1 Hybridoma (Roche Diagnostic) (далі згадується як середовище HAT), в кількості 100 мкл/ямка. Через 2, 3 і 5 днів половину культурального розчину замінюють на середовище HAT. Через 7 днів проводять скринінг з використанням культурального супернатанту. Скринінг проводять методом ELISA, використовуючи імунопланшет, покритий розчинною формою корового білка GPC3. Позитивний клон піддають моноклонуванню методом лімітуючих розведень. У результаті отримують 11 клонов антитіл (M3C11, M13B3, M1E7, M3B8, M11F1, L9G11, M19B11, M6B1, M18D4, M5B9 і M10D2), які володіють сильною зв'язуючою активністю по відношенню до GPC3.

#### Приклад 7

Визначення ізотипу і очищення антитіла проти GPC3

Ізотип визначають методом антиген-залежного ELISA з використанням набору I для визначення ізотипів імуночистих моноклональних антитіл (PIERCE). Очищення антитіл проводять таким чином. Культуральний супернатант гібридоми, культивованої із середовищем HAT, доповненим FBS (Ultra low IgG) (GIBCO BRL), адсорбують на Hi Trap ProteinG HP (Amersham) і промивають буфером для зв'язування (20мМ фосфат натрію (pH 7,0)). Антитіло елюють буфером для елювання (0,1 М гліцин-HCl (pH 2,7)). Елюат відразу нейтралізують буфером для нейтралізації (1М Tris-HCl (pH 9,0)) і діалізують проти PBS протягом дня і ночі, щоб замінити буфер.

#### Приклад 8

Визначення зв'язуючої активності методом ELISA

Щоб оцінити зв'язуючу активність отриманого раніше антитіла проти GPC3, визначають залежне від концентрації зв'язування антитіла з імунопланшетом, що містить іммобілізовану розчинну форму корового білка GPC3. Додають серії 3-кратних



розбавлень (всього 12 розбавлень) очищеного антитіла з концентрацією 10 мкг/мл і як вторинне антитіло додають антитіло проти мишачих IgG. Розвиток забарвлення здійснюють з використанням SIGMA 104. Оскільки міра розвитку забарвлення залежить від часу розвитку забарвлення, аналізують дані, отримані точно через 1 годину. Кожне антитіло дає залежний від концентрації розвиток забарвлення. Будують графік залежності розвитку забарвлення від концентрації антитіла і за допомогою аналізуючого програмного забезпечення, GraphPad Prism, отримують апроксимовану криву. Визначають значення  $EC_{50}$  для антитіла і використовують його як показник зв'язуючої активності. Значення  $EC_{50}$  для всіх клонів приведені на Фіг. 16.

#### Приклад 9

Визначення зв'язуючої активності за допомогою проточної цитометрії

Клітини роз'єднують з допомогою  $10\text{ mM}$  EDTA pH 8,0 (GIBCO)/PBS і суспендують в буфері FACS (1% FBS/PBS) в концентрації  $1 \times 10^6$  клітин/мл. Суспензію вносять в фільтрувальний планшет Multiscreen-HV (Millipore) в кількості 100 мкл/ямка і супернатант видаляють центрифугуванням. Додають антитіло проти GPC3, розбавлене до відповідної концентрації, і залишають взаємодіяти на льоду протягом 30 хвилин. Клітини промивають один раз буфером FACS, додають FITC-мічене антитіло проти мишачих IgG і залишають взаємодіяти на льоду протягом 30 хвилин. Після завершення реакції клітини центрифугують при 500 об./хв. протягом 1 хвилини і супернатант видаляють. Клітини суспендують в 400 мкл буферу FACS і аналізують методом проточної цитометрії. Як проточний цитометр використовують EPICS ELITE ESP (Beckman Coulter). Область живих клітин вибирають по гістограмі з прямим і бічним розсіюванням. Як показано на Фіг. 1, антитіло проти GPC3 (M3C11, M11F1) добре зв'язується з клітиною CHO, що експресує GPC3, і не зв'язується з батьківською клітиною CHO, вказуючи на те, що антитіло специфічно зв'язується з GPC3, презентованим на клітинній мембрані. Крім того, антитіло володіє зв'язуючою активністю по відношенню до клітинної лінії гепатому, HepG2 (отриманої від ATCC) і HuH-7 (отриманої від Health Science Research Resources Bank), дозволяючи передбачити, що антитіло може специфічно розпізнавати гепатому. Визначена методом проточної цитометрії зв'язуюча активність клонів, отриманих від мишей, імунізованих розчинною формою GPC3, приведена на Фіг. 16, де вказані  $X$ -значення гістограми для концентрації антитіла 5 мкг/мл.

#### Приклад 10

Класифікація по епітопах за допомогою конкурентного аналізу ELISA

Отримані антитіла класифікують по епітопах за допомогою конкурентного аналізу ELISA. Антитіла біотинілюють, використовуючи набір для мічення біотинном (Roche). Розчинну форму корового білка GPC3 розбавляють буфером для покриття до концентрації 1 мкг/мл, вносять в планшет в кількості 100 мкл/ямка і витримують при  $4^{\circ}\text{C}$  протягом ночі, щоб на планшеті утворилося покриття.

На наступний день проводять блокування шляхом додання 200 мкл субстратного буфера. Планшет залишають при  $4^{\circ}\text{C}$  протягом ночі або довше, додають антитіло проти GPC3 в кількості 100 мкл/ямка і залишають взаємодіяти при кімнатній температурі протягом 1 години. Після цього, не промиваючи планшет, додають 10 мкл міченого біотином антитіла проти GPC3 в концентрації 10 мкг/мл і залишають взаємодіяти ще на 1 годину. Планшет промивають 3 рази буфером для промивання по 300 мкл/ямка. Кон'югат AP-стрептавідин (ZYMED) розбавляють в 1000 разів буфером для розбавлення, додають в кількості 100 мкл/ямка і залишають взаємодіяти при кімнатній температурі протягом 1 години. Планшет промивають 5 разів буфером для промивання по 300 мкл/ямка. SIGMA 104 розбавляють до концентрації 1 мг/мл субстратним буфером і додають в кількості 100 мкл/ямка. Після інкубації при кімнатній температурі протягом 1 години вимірюють поглинання (при 405 нм, довжина хвилі порівняння 655 нм).

Результати конкурентного аналізу ELISA приведені на Фіг. 2. Вважається, що епітопи антитіла, яке конкурентно інгібує зв'язування біотинільованого антитіла на 50% або більше, в трьохвимірній конформації розташовані близько один до одного. Внаслідок класифікації відповідно до характеру розвитку забарвлення при конкурентному інгібуванні зв'язування 8 типів біотинільованих антитіл, 11 клонів, отриманих від мишей, імунізованих розчинною формою GPC3, поділяють на 5 груп (a, b, c, d і e) (Фіг. 16).

#### Приклад 11

Класифікація по епітопах методом Вестерн-блотингу

Розчинну форму корового білка GPC3 наносять на мініпластину 10% SDS-PAGE (TEFCO) і піддають електрофорезу у відновлювальних умовах. Потім переносять на Immobilon-P (Millipore), використовуючи осередок для електрофоретичного напівсухого перенесення Trans-Blot SD (BIO-RAD). Після короткого промивання мембрани TBS-T (0,05% Tween 20, TBS), її струшують в TBS-T, що містить 5% знежиреного молока, протягом 1 години. Мембрану струшують в TBS-T протягом приблизно 10 хвилин, потім додають кожне антитіло проти GPC3, розбавлене TBS-T, що містить 1% знежиреного молока, і мембрану струшують протягом 1 години. Мембрану промивають TBS-T, струшують в розчині HRP-антитіла проти мишачих IgG (Amersham), розбавленого TBS-T, що містить 1% знежиреного молока, протягом 1 години, і потім промивають TBS-T. Для розвитку забарвлення, яке детектують за допомогою Hyperfilm ECL (Amersham), додають ECL-Plus (Amersham).

Як показано на Фіг. 3, L9G11 визначають як антитіло, що зв'язується з Текінцем, оскільки воно зв'язується з смугою, відповідною приблизно 40 кДа. M3C11 визначають, як антитіло, що зв'язується з С-кінцем, оскільки воно зв'язується з смугою, відповідною приблизно 30 кДа. Всі антитіла, які відносять до групи c, d або e за результатами конкурентного аналізу ELISA, зв'язуються з N-кінцем, а всі антитіла, що відносяться до групи a або b, зв'язуються з С-кінцем (Фіг. 16). По даним вестерн-

блотингу L9G11 має більш високу чутливість виявлення, ніж інші антитіла, які зв'язуються з N-кінцем, дозволяючи передбачити, що дане антитіло можна використати для детекції N-кінцевого фрагмента методом вестерн-блотингу.

#### Приклад 12

##### Детекція секретованої форми GPC3

Після того як було виявлено, що GPC3 розщеплюється по 358-ому або по 374-ому амінокислотному залишку, автори даного винаходу висунули гіпотезу, що секретована форма GPC3 надходить в кров пацієнта з раком печінки. У зв'язку з цим, щоб детектувати секретовану форму GPC3, була розроблена сендвіч-система ELISA для детекції GPC3.

Імунопланшет покривають антитілом проти GPC3 в концентрації 10 мкг/мл і блокують субстратним буфером. Імунопланшет тримають декілька годин при кімнатній температурі або протягом ночі при 4°C, потім додають культуральний супернатант HerG2 і інкубують 1 годину при кімнатній температурі. Імунопланшет промивають 3 рази буфером для промивання по 300 мкл/ямка, додають мічене біотином антитіло проти GPC3, розбавлене до 10 мкг/мл, і інкубують 1 годину при кімнатній температурі. Імунопланшет промивають 3 рази буфером для промивання по 300 мкл/ямка, додають AP-стрептавідин і інкубують 1 годину при кімнатній температурі. Імунопланшет промивають 5 разів буфером для промивання по 300 мкл/ямка. Забезпечують розвиток забарвлення за допомогою АМПАК (DAKO) відповідно до прикладеної інструкції і вимірюють поглинання за допомогою спектрофотометра для зчитування мікропланшетів. Антитіла, що зв'язуються з N-кінцем (M6B1, M19B11 і M18D4), і антитіла, що зв'язуються з C-кінцем (M3C11, M13B3 і M3B8), об'єднують для створення п'яти сендвіч-систем ELISA. Всі вказані поєднання володіють однаковою чутливістю по стандартній кривій, отриманій з використанням секретованої форми GPC3. Дані системи оцінюють з використанням культурального супернатанту HerG2. При використанні поєднання антитіл, що зв'язуються з N-кінцем, детектують високу концентрацію секретованої форми GPC3, приблизно 1 мкг/мл (Фіг. 4). При використанні поєднання антитіл, що зв'язуються з C-кінцем, детектують низьку концентрацію, це дозволяє передбачити, що в секретованій формі GPC3 присутній переважно N-кінцевий фрагмент.

Потім культуральний супернатант HerG2 піддають імунопреципітації, використовуючи антитіло проти GPC3 для детекції секретованої форми GPC3. При використанні M10D2, який зв'язується з N-кінцевим фрагментом, детектують секретовану форму GPC3 розміром 40 кДа (Фіг. 5). З іншого боку, при використанні M1E7, який зв'язується з C-кінцевим фрагментом, секретовану форму GPC3 не виявляють. Імунопреципітацію проводять для всіх отриманих антитіл проти GPC3. Секретована форма GPC3 добре виявляється за допомогою всіх антитіл, що зв'язуються з N-кінцевим фрагментом, тоді як при застосуванні антитіл, що зв'язуються з C-кінцевим фрагментом, секретована форма GPC3 не виявляється або виявляється погано

(Фіг. 16). Приблизно, антитіло, яке дозволяє детектувати секретовану форму GPC3 методом імунопреципітації, можна використати для діагностики гепатомі. Крім того, передбачають, що антитіло, за допомогою якого секретована форма GPC3 детектується погано, можна використати для розробки терапевтичного антитіла, що володіє ADCC-активністю і CDC-активністю, оскільки таке антитіло може мігрувати до ділянки, ураженої гепатомою, не вловлюючись секретованою формою GPC3, присутньою в крові.

#### Приклад 13

Клонування варіабельної ділянки антитіла проти GPC3

Варіабельну ділянку антитіла проти GPC3 ампліфікують методом ПЛР із зворотною транскриптазою з використанням загальної РНК, екстрагованої з гібридоми, що продукує антитіло проти GPC3. Загальну РНК екстрагують з  $1 \times 10^7$  клітин гібридоми з використанням наборів RNeasy Plant Mini (QIAGEN). 5'-Кінцевий фрагмент гена ампліфікують, використовуючи 1 мкг загальної РНК, набір для ампліфікації кДНК SMART RACE (CLONTECH) і будь-який з нижченаведених синтетичних олігонуклеотидів:

синтетичний олігонуклеотид MHC-IgG1, комплементарний послідовності константної ділянки мишачого IgG1:

GGG CCA GTG GAT AGACAG ATG (SEQ ID NO: 7);

синтетичний олігонуклеотид MHC-IgG2a, комплементарний послідовності константної ділянки мишачого IgG2a:

CAG GGG CCA GTG GAT AGA CCG ATG (SEQ ID NO: 8);

синтетичний олігонуклеотид MHC-IgG2b, комплементарний послідовності константної ділянки мишачого IgG2b:

CAG GGG CCA GTG GAT AGA CTG ATG (SEQ ID NO: 9); і

синтетичний олігонуклеотид каппа, комплементарний послідовності константної ділянки мишачого каппа-ланцюга:

GCT CAC TGG ATG GTG GGA AGA TG (SEQ ID NO: 10).

Реакцію зворотної транскрипції проводять при 42°C протягом 1 години і 30 хвилин. Суміш для ПЛР (50 мкл) містить 5 мкл буферу для ПЛР 10x Advantage 2, 5 мкл суміші універсальних праймерів A 10x, 0,2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP і dTTP), 1 мкл полімеразної суміші Advantage 2 (всі реагенти від CLONTECH), 2,5 мкл продукту реакції зворотної транскрипції і 10 пмоль синтетичного олігонуклеотиду MHC-IgG1, MHC-IgG2a, MHC-IgG2b або каппа. ПЛР проводять, використовуючи 5 циклів, що включають в себе 94°C протягом 30 секунд, 94°C протягом 5 секунд і 72°C протягом 3 хвилин, 5 циклів, що включає в себе 94°C протягом 5 секунд, 70°C протягом 10 секунд і 72°C протягом 3 хвилин, і 25 циклів, що включає в себе 94°C протягом 5 секунд, 68°C протягом 10 секунд і 72°C протягом 3 хвилин. І нарешті, продукт реакції нагрівають при 72°C протягом 7 хвилин. Кожний продукт ПЛР виділяють з агарозного гелю, використовуючи набір для гель-екстракції QIAquick

(QIAGEN), клонують у векторі pGEM-T Easy (Promega) і визначають нуклеотидну послідовність.

Нуклеотидні послідовності варіабельних ділянок Н-ланцюга M3C11, M13B3, M1E7, M3B8, M11F1, M19B11, M6B1, M18D4, M5B9, M10D2 і L9G11 описані в SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 і 21, відповідно, а їх амінокислотні послідовності описані в SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 і 32, відповідно. Нуклеотидні послідовності варіабельних ділянок L-ланцюга даних антитіл описані в SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 і 43, відповідно, а їх амінокислотні послідовності описані в SEQ ID NO: 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 і 54, відповідно.

#### Приклад 14

Класифікація по епітопах з використанням GST-гібридного білка

Щоб провести докладний аналіз епітопів анти-тіл, що зв'язуються з С-кінцевим фрагментом, отримують гібридні білки послідовно укорочених С-кінцевих пептидів GPC3 з GST, а саме GC-1 (від Ser495 до Lys563), GC-2 (від Gly510 до Lys563), GC-3 (від Ala524 до Lys563), GC-4 (від Gly537 до Lys563) і GC-5 (від Ser550 до Lys563). С-кінцеву ділянку GPC3 клонують в pGEX-4T-3 (Amersham), щоб сконструювати плазмиду ДНК, в якій С-кінцева ділянка GPC3 лігвана з С-кінцем GST. Плазмиду ДНК вводять в DH5a і в результаті отримують трансформант. Потім до культури трансформанта в фазі логарифмічного зростання додають IPTG, щоб індукувати експресію GST-гібридного білка. Бактерійні клітини збирають після двох годин культивування. Клітини гомогенізують шляхом обробки ультразвуком і центрифугують при 35000 об./хв. протягом 30 хвилин на ультрацентрифугі XL-80 (Beckman, ротор 70,1 Ti). Потім витягують культуральний супернатант і очищають за допомогою модулю очищення GST (Amersham). Очищені таким чином GST-гібридні білки розділяють методом SDS-PAGE у відновлювальних умовах і проводять вестерн-блотинг з використанням антитіл проти GPC3 (Фіг. 6). M3C11 і M1E7 дозволяють детектувати GC-1 і GC-2, але не GC-3, GC-4 і GC-5, вказуючи на те, що епітопи, розпізнавані даними антитілами, знаходяться на ділянці GC-2, і що ділянка GC-3 не є достатньою. M3B8 і M11F1 дозволяють детектувати GC-1, GC-2, GC-3 і GC-4, але не GC-5, вказуючи на те, що епітопи, розпізнавані даними антитілами, знаходяться на ділянці GC-4, і що ділянка GC-5 не є достатньою. Мінімальні ділянки GST-гібридного білка, з якими можуть зв'язуватися всі антитіла, перераховані в колонці під заголовком "вестерн-блотинг" на Фіг. 16.

#### Приклад 15

Отримання мишаче-людського химерного антитіла проти GPC3

Послідовності варіабельних ділянок Н-ланцюга і L-ланцюга антитіла проти GPC3 лігують з послідовностями константних ділянок людського IgG1 і каппа-ланцюга. ПЛР проводять з використанням синтетичного олігонуклеотиду, комплементарного 5'-кінцевій нуклеотидній послідовності варіабельної ділянки Н-ланцюга кожного антитіла, який містить послідовність Козака, і синтетичного

олігонуклеотиду, комплементарного 3'-кінцевій нуклеотидній послідовності, який містить ділянку NheI. Отриманий продукт ПЛР клонують у векторі pB-CH, в якому константна ділянка людського IgG1 вбудована у вектор pBluescript KS(+) (Toyobo). Варіабельна ділянка мишачого Н-ланцюга і константна ділянка людського Н-ланцюга (ланцюг  $\gamma$ 1) лігують через ділянку NheI. Отриманий фрагмент гена Н-ланцюга клонують у векторі експресії, pCXND3. У той же час проводять ПЛР з використанням синтетичного олігонуклеотиду, комплементарного 5'-кінцевій нуклеотидній послідовності варіабельної ділянки L-ланцюга кожного антитіла, яка містить послідовність Козака, і синтетичного олігонуклеотиду, комплементарного 3'-кінцевій нуклеотидній послідовності, який містить ділянку BsiWI. Отриманий продукт ПЛР клонують у векторі pB-CL, в якому константна ділянка людського каппа-ланцюга вбудована у вектор pBluescript KS(+) (Toyobo). Варіабельну і константну ділянки людського L-ланцюга лігують через ділянку BsiWI. Отриманий фрагмент гена L-ланцюга клонують у векторі експресії, pUCAG. Вектор pUCAG отримують шляхом клонування фрагмента розміром 2,6 тис. п.о., отриманого в результаті розщеплення pCXN (Niwa et al., Gene 1991; 108: 193-200) рестриктазою BamHI по ділянці BamHI вектора pUC19 (Toyobo).

Щоб отримати вектор експресії мишаче-людського химерного антитіла проти GPC3, фрагмент гена отримують шляхом розщеплення вектора pUCAG, що містить фрагмент гена L-ланцюга, рестриктазою HindIII (Takara Shuzo), і клонують в ділянку HindIII вектора pCXNDS, що містить ген Н-ланцюга. Дана плазмідна буде експресувати ген стійкості до неоміцину, ген DHFR і ген мишаче-людського химерного антитіла проти GPC3 в клітині тварини.

Клітинну лінію CHO (клітинна лінія DG44), стабільно експресуючу антитіло, отримують таким чином. Ген вводять в клітини методом електропорації, використовуючи Gene Pulser II (Bio-Rad). Суміш, отриману шляхом змішування 25 мкг вектора експресії кожного мишаче-людського химерного антитіла проти GPC3 і 0,75 мл суспензії клітин CHO в PBS ( $1 \times 10^7$  клітин/мл), охолоджують на льоду протягом 10 хвилин і переносять в кофетку. Потім використовують імпульси при напрузі 1,5 кВ і місткості 25 мкФ. Після 10-хвилинного періоду відновлення при кімнатній температурі клітини, що були піддані електропорації, суспендують в 40 мл середовища CHO-S-SFM II (Invitrogen), що містить домішку їх HT (Invitrogen). Суспензію розбавляють в 50 разів таким же середовищем і вносять в 96-ячковий культуральний планшет в кількості 100 мкл/ямка. Культивують в CO<sub>2</sub>-інкубаторі (5% CO<sub>2</sub>) протягом 24 годин, потім додають генетицин (Invitrogen) в концентрації 0,5 мг/мл і клітини культивують протягом 2 тижнів. Культуральний супернатант беруть з ямки, що містить колонію стійких до генетицину трансформованих клітин, і кількість IgG вимірюють за допомогою описаного нижче методу визначення концентрації. Клітинну лінію з високим рівнем продукції послідовно вирощують, щоб отримати клітинну лінію, стабільно експресу-

ючу мишаче-людське химерне антитіло проти GPC3. Клітинну лінію культивують в широкому масштабі і збирають культуральний супернатант. Очищення кожного мишаче-людського химерного антитіла проти GPC3 проводять з допомогою Hi Trap ProteinG HP (Amersham).

#### Приклад 16

Вимірювання активності, пов'язаної з комплексом-залежною цитотоксичністю (CPC-активність)

16.1 Отримання людського альбуміну веронального буфера (HAVB)

У воді, очищеній на установці milli-Q, розчиняють 12,75 г NaCl (вищої категорії, Wako Pure Chemicals), 0,5625 г Na-барбіталу (вищої категорії, Wako Pure Chemicals) і 0,8625 г барбіталу (вищої категорії, Wako Pure Chemicals) до кінцевого об'єму 200 мл і автоклавають при 121°C протягом 20 хвилин. Потім додають 100 мл обробленої в автоклаві гарячої води milli-Q. pH становить 7,43 (рекомендоване значення pH: 7,5). Розчин використовують у вигляді 5х веронального буфера. У 50 мл води, очищеної на установці milli-Q, розчиняють 0,2205 г CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (вищої категорії, Junsei Chemical) до кінцевої концентрації 0,03 моль/л і отриманий розчин використовують як розчин CaCl<sub>2</sub>. У 50 мл води, очищеної на установці milli-Q, розчиняють 1,0165 г MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (вищої категорії, Junsei Chemical) до кінцевої концентрації 0,1 моль/л і отриманий розчин використовують як розчин MgCl<sub>2</sub>. У воді, очищеній на установці milli-Q, розчиняють 100 мл 5х веронального буфера, 4 мл людського сироваткового альбуміну (25% Buminat (zareєстрована торгова марка), концентрація людського сироваткового альбуміну: 250 мг/мл, Baxter Healthcare), 2,5 мл розчину CaCl<sub>2</sub>, 2,5 мл розчину MgCl<sub>2</sub>, 0,1 г KCl (вищої категорії, Junsei Chemical), 0,5 г глюкози (D(+)-глюкоза, безводна, вищої категорії, Wako Pure Chemicals) з отриманням кінцевого об'єму 500 мл, і отриманий розчин використовують як HAVB. Після стерилізації фільтруванням HAVB зберігають при заздалегідь встановленій температурі 5°C.

#### 16.2 Отримання клітин-мішеней

Клітини CHO, що експресують повнорозмірний людський GPC3, отримані в прикладі 4, культивують в середовищі α-MEM, що містить нуклеїнові кислоти (+) (GIBCO) і доповнену 10% FBS і 0,5 мг/мл генетицину (GIBCO). Клітини від'єднують від чашки, використовуючи буфер для роз'єднання клітин (Invitrogen Corp), вносять в кожну ямку 96-ямкового плоскодонного планшета (Falcon) в кількості 1х10<sup>4</sup> клітин/ямка і культивують 3 дні. Після культивування додають 5,55 мБк хрому-51 і клітини культивують в інкубаторі в атмосфері, що містить 5% діоксид у вуглецю, при 37°C протягом 1 години. Отримані клітини двічі промивають HAVB, додають 50 мкл HAVB і використовують як клітини-мішені.

#### 16.3 Аналіз вивільнення хрому (CPC-активність)

Кожне химерне антитіло розбавляють HAVB, отримуючи розчин з концентрацією 40 мкг/мл. До клітин-мішеней додають 50 мкл розчину кожного антитіла і залишають на льоду протягом 15 хвилин. Потім в кожну ямку додають 100 мкл людської

сироватки з периферичної крові здорового добровольця, розбавленої HAVB, з отриманням кінцевої концентрації 25% (кінцева концентрація антитіла: 10 мкг/мл) і залишають в інкубаторі в атмосфері 5% діоксиду вуглецю при 37°C протягом 90 хвилин. Планшет центрифугують, після чого з кожної ямки відбирають 100 мкл супернатанту і вимірюють радіоактивність за допомогою гамма-лічильника. Питому швидкість вивільнення хрому розраховують по нижченаведеній формулі.

Питома швидкість вивільнення хрому (%)=(A)х100/(B-C)

"А" означає кількість радіоактивності (імп./хв.) в кожній ямці, "В" означає середню кількість радіоактивності (імп./хв.) в ямці, в якій до клітин-мішеней додано 100 мкл 2% водного розчину NP-40 (Nonidet P-40, Code No. 252-23, Nacalai Tesque) і 50 мкл HAVB, і "С" означає середню кількість радіоактивності (імп./хв.) в ямці, в якій до клітин-мішеней додано 150 мкл HAVB. Аналіз проводять з потрійними повторами і для CDC-активності розраховують середнє значення і стандартне відхилення (%).

Результати наведені на Фіг. 7. Серед 9 типів химерних антитіл проти GPC3, МЗВ8 і М11F1, які являють собою антитіла, що розпізнають С-кінець, володіють високою CDC-активністю по відношенню до клітин CHO, що експресують GPC3, однак в інших антитіл CDC-активність не спостерігається. МЗВ8 і М11F1 відносять до групи "b" за результатами конкурентного методу ELISA, і можна виявити епітоп, що відіграє важливу роль у виявленні високої CDC-активності.

#### Приклад 17

Вимірювання ADCC-активності з використанням PBMC, отриманих з периферичної крові людини

#### 17.1 Отримання розчину, що містить людські PBMC

Гепаринізовану периферичну кров, отриману від здорових добровольців, розбавляють в 2 рази PBS(-) і нашаровують на Ficoll-Paque TM PLUS (Amersham). Після центрифугування при 500хg протягом 30 хвилин при 20°C, збирають середній шар, який являє собою фракцію мононуклеарних лейкоцитів. Клітини промивають 3 рази, суспендують в 10% FBS/RPMI і використовують як розчин, що містить людські PBMC.

#### 17.2 Отримання клітин-мішеней

Клітини HerG2, культивовані в середовищі 10% FBS/RPMI 1640, від'єднували від чашки за допомогою Trypsin-EDTA (Invitrogen), вносять в кожну ямку 96-ямкового планшета з U-подібним дном (Falcon) в кількості 1х10<sup>4</sup> клітин/ямка і культивують протягом 2 днів. Отримані в прикладі 4 клітини CHO, експресуючі повнорозмірний людський GPC3, культивують в середовищі α-MEM, що містить нуклеїнові кислоти (+) (GIBCO) і доповнену 10% FBS і 0,5 мг/мл генетицину (GIBCO). Клітини від'єднують від чашки, використовуючи буфер для роз'єднання клітин (Invitrogen Corp), вносять в кожну ямку 96-ямкового плоскодонного планшета (Falcon) в кількості 1х10<sup>4</sup> клітин/ямка і культивують

3 дні. У кожен ямку додають хром-51 (5,55 мБк) і клітини культивують в інкубаторі в атмосфері, що містить 5% діоксиду вуглецю, при 37°C протягом 1 години. Отримані клітини промивають один раз середовищем, додають 50 мкл середовища 10% FBS/RPMI 1640 і використовують як клітини-мішені.

### 17.3 Аналіз вивільнення хрому (APCC-активність)

До клітин-мішеней додають 50 мкл розчину, що містить різні концентрації антитіла, і залишають взаємодіяти на льоду протягом 15 хвилин. Потім додають 100 мкл розчину людських РВМС в кількості  $5 \times 10^5$  клітин/ямка і клітини культивують в інкубаторі в атмосфері 5% діоксиду вуглецю при 37°C протягом 4 годин. Після культивування планшет центрифугують і за допомогою гамма-лічильника вимірюють радіоактивність в 100 мкл культурального супернатанту. Питому швидкість вивільнення хрому розраховують по нижченаведеній формулі.

Питома швидкість вивільнення хрому  
 $(\%) = (AC) \times 100 / (B - C)$

"А" означає середню кількість радіоактивності (імп./хв.) в кожній ямці, "В" означає середню кількість радіоактивності (імп./хв.) в ямці, в якій до клітин-мішеней додано 100 мкл 2% водного розчину NP-40 (Nonidet P-40, Code No. 252-23, Nacalai Tesque) і 50 мкл середовища 10% FBS/RPMI, і "С" означає середню кількість радіоактивності (імп./хв.) в ямці, в якій до клітин-мішеней додано 150 мкл середовища 10% FBS/RPMI. Аналіз проводять з потрійними повторами і для ADCC-активності розраховують середнє значення і стандартне відхилення (%). Результати приведені на Фіг. 8. Серед 9 типів химерних антитіл проти GPC3, антитіла, що розпізнають С-кінець, володіють тенденцією виявляти високу ADCC-активність.

#### Приклад 18

Імунізація з використанням GC-3 і селекція гібридами

Серед отриманих антитіл проти GPC3 тільки M11F1 і M3B8 володіють високою CDC-активністю, вказуючи на те, що CDC-активність є епітопозалежною. Щоб отримати антитіло, що володіє як ADCC-активністю, так і CDC-активністю, для імунізації використовують GST-гібридний білок, що містить епітоп, розпізнаваний M11F1 і M3B8, який позначають GC-3. За допомогою вищезгаданого методу очищають велику кількість GC-3. Буфер міняють на PBS за допомогою гель-фільтрації на Superdex 75 (Amersham). Отриманий продукт використовують як імунний білок. Трьох мишей Balb/c (отриманих від Charles River Japan, Inc.) і трьох мишей MRL/lpr імунізують GC-3 відповідно до вищезгаданого методу. Для першої імунізації GC-3 отримують в кількості 100 мкг/особень, емульгують з використанням FCA і вводять підшкірно. Через два

тижні GC-3 отримують в кількості 50 мкг/особень, емульгують з використанням FIA і вводять підшкірно. Після п'ятої імунізації проводять останню імунізацію (50 мкг/особень) всіх мишей шляхом введення імунного білка в хвостову вену. Після гібридизації клітин проводять скринінг гібридом методом ELISA з використанням імунопланшету, покритого розчинною формою корового білка GPC3. Позитивний клон піддають моноклонуванню методом лімітуючих розведень. У результаті отримують 5 клонів антитіл (GC199, GC202, GC33, GC179 і GC194), що володіють високою зв'язуючою активністю по відношенню до GPC3.

Антитіло виділяють з культурального супернатанту гібридами з використанням Hi Trap proteinG HP і аналізують вищезгаданим методом. Значення  $EC_{50}$  визначають методом ELISA з використанням імунопланшета, покритого розчинною формою корового білка GPC3, і за допомогою проточної цитометрії отримують X-значення гістограми при концентрації 5 мкг/мл (Фіг. 17). Відповідно до класифікації по епітопах конкурентним методом ELISA, антитіла розділяють на групу b (GC199, GC202 і GC33) і нову епітопну групу f (GC179 і GC194). Класифікація по епітопах з використанням GST-гібридних білків показує, що за допомогою GC199, GC202 і GC33 можна детектувати GC-1, GC-2, GC-3 і GC-4, але не GC-5, дозволяючи передбачити, що епітопи, розпізнавані даними антитілами, знаходяться на ділянці GC-4, так само, як і епітопи, розпізнавані M11F1 і M3B8, а ділянка GC-5 не є достатньою. З іншого боку, з допомогою GC179 і GC194 можна детектувати GC-1, GC-2 і GC-3, але не GC-4 і GC-5, дозволяючи передбачити, що епітопи, розпізнавані даними антитілами, знаходяться на ділянці GC-3, а ділянка GC-4 не є достатньою. Мінімальні ділянки GST-гібридних білків, з якими можуть зв'язуватися всі антитіла, перераховані в колонці під заголовком "вестерн-блотинг" на Фіг. 17.

Варіабельні ділянки Н-ланцюга і L-ланцюга GC199, GC202, GC33, GC179 і GC194 клонують відповідно до описаного вище методу і визначають їх послідовності. У випадку L-ланцюга GC194, клонують 2 типи послідовностей. Нуклеотидні послідовності варіабельних ділянок Н-ланцюга GC199, GC202, GC33, GC179 і GC194 описані в SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58 і 59, відповідно, а їх амінокислотні послідовності описані в SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63 і 64, відповідно. Нуклеотидні послідовності варіабельних ділянок L-ланцюга GC199, GC202, GC33, GC179, GC194(1) і GC194(2) описані в SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69 і 70, відповідно, а їх амінокислотні послідовності описані в SEQ ID NO: 71, 72, 73, 74, 75 і 76, відповідно.

Крім того, визначають міру гомології даних амінокислотних послідовностей шляхом порівняння з базою даних амінокислотних послідовностей відомих антитіл, таким чином визначаючи їх гіперваріабельні ділянки, які наведені нижче.

| Антитіло  | CDR  | Амінокислотна послідовність | SEQ ID NO |
|-----------|------|-----------------------------|-----------|
| M13B3 (H) | CDR1 | NYAMS                       | 103       |
|           | CDR2 | AINNNGDDTTYLDTVKD           | 104       |
|           | CDR3 | QGGAY                       | 105       |
| M3B8 (H)  | CDR1 | TYGMGVG                     | 106       |
|           | CDR2 | NIWWYDAKYNSDLKS             | 107       |
|           | CDR3 | MGLAWFAY                    | 108       |
| M11F1 (H) | CDR1 | IYGMGVG                     | 109       |
|           | CDR2 | NIWWNDDKYNSALKS             | 110       |
|           | CDR3 | IGYFYFDY                    | 111       |
| M5B9 (H)  | CDR1 | GYWMH                       | 112       |
|           | CDR2 | AIYPGNSDTNYNQKFKG           | 113       |
|           | CDR3 | SGDLTGGLAY                  | 114       |
| M6B1 (H)  | CDR1 | SYAMS                       | 115       |
|           | CDR2 | AINSNGGTTYYPDTMKD           | 116       |
|           | CDR3 | HNGGYENYGFAY                | 117       |
| M10D2 (H) | CDR1 | SYWMH                       | 118       |
|           | CDR2 | EIDPSDSYTYYNQKFRG           | 119       |
|           | CDR3 | SNLGDGHRFPAPFY              | 120       |
| L9G11 (H) | CDR1 | SYWMH                       | 118       |
|           | CDR2 | TIDPSDSETHYNLQFKD           | 121       |
|           | CDR3 | GAFYSSYSYWAFAY              | 122       |
| GC33 (H)  | CDR1 | DYEMH                       | 123       |
|           | CDR2 | ALDPKTGDTAYSQKFKG           | 124       |
|           | CDR3 | FYSYTY                      | 125       |
| GC179 (H) | CDR1 | INAMN                       | 126       |
|           | CDR2 | RIRSESNNYATYYGDSVKD         | 127       |
|           | CDR3 | EVTTSFAY                    | 128       |
| GC194 (H) | CDR1 | ASAMN                       | 129       |
|           | CDR2 | RIRSKSNYAIYYADSVKD          | 130       |
|           | CDR3 | DPGYGNPWFAF                 | 131       |
| GC199 (H) | CDR1 | DYSMH                       | 132       |
|           | CDR2 | WINTETGEPTYADDFKG           | 133       |
|           | CDR3 | LY                          | 134       |
| GC202 (H) | CDR1 | TYGMGVG                     | 106       |
|           | CDR2 | NIWWHDDKYNSALKS             | 135       |
|           | CDR3 | IAPRYNKYEGFFAF              | 136       |
| M13B3 (L) | CDR1 | KSSQSLDSDGKTYLN             | 137       |
|           | CDR2 | LVSKLDS                     | 138       |
|           | CDR3 | WQGTHTFPLT                  | 139       |
| M3B8 (L)  | CDR1 | KASQDINNYLS                 | 140       |
|           | CDR2 | RANRLVD                     | 141       |
|           | CDR3 | LQCDEFPPWT                  | 142       |
| M11F1 (L) | CDR1 | RSSQSLVHSNGNTYLH            | 143       |
|           | CDR2 | KVSNRFS                     | 144       |
|           | CDR3 | SQSTHVPWT                   | 145       |
| M5B9 (L)  | CDR1 | RSSKSLHLSNGITYLY            | 146       |
|           | CDR2 | QMSNLAS                     | 147       |
|           | CDR3 | AQNLELPYT                   | 148       |
| M6B1 (L)  | CDR1 | KASQDINKNII                 | 149       |
|           | CDR2 | YTSTLQP                     | 150       |
|           | CDR3 | LQYDNLPT                    | 151       |
| M10D2 (L) | CDR1 | RASHSISNFLH                 | 152       |
|           | CDR2 | YASQSI                      | 153       |
|           | CDR3 | QQSNIWSLT                   | 154       |
| L9G11 (L) | CDR1 | RASESVEYYGTSLMQ             | 155       |
|           | CDR2 | GASNVES                     | 156       |
|           | CDR3 | QSRKVPYT                    | 157       |
| GC33 (L)  | CDR1 | RSSQSLVHSNGNTYLH            | 143       |
|           | CDR2 | KVSNRFS                     | 144       |
|           | CDR3 | SQNTHTVPPT                  | 158       |
| GC179 (L) | CDR1 | KSSKSLHLSNGNTYLN            | 159       |
|           | CDR2 | WMSNLAS                     | 160       |
|           | CDR3 | MQHIEYPFT                   | 161       |

|             |      |                  |     |
|-------------|------|------------------|-----|
| GC194 (L) 1 | CDR1 | RSSKSLHSDITYLY   | 162 |
|             | CDR2 | QMSNLAS          | 147 |
|             | CDR3 | AQNLELPPT        | 163 |
| GC194 (L) 2 | CDR1 | SASSSVSYMY       | 164 |
|             | CDR2 | DTSNLAS          | 165 |
|             | CDR3 | QOWSSYPLT        | 166 |
| GC199 (L)   | CDR1 | KSSQSLHSDGKTFLN  | 167 |
|             | CDR2 | LVSRLDS          | 168 |
|             | CDR3 | CQGTHTFPRT       | 169 |
| GC202 (L)   | CDR1 | RSSQSIVHSNGNTYLE | 170 |
|             | CDR2 | KVSNRFS          | 144 |
|             | CDR3 | FQGSHPVWT        | 171 |

#### Приклад 19

Визначення APCC-активності з використанням ефекторних клітин кісткового мозку миші

19.1 Отримання розчину, що містить ефекторні клітини кісткового мозку миші

Клітини кісткового мозку збирають з стегнової кістки мишей SCID (CLEA Japan, Inc., самці, вік 10 тижнів) і суспендують в середовищі 10% FBS/RPMI 1640 в концентрації  $5 \times 10^5$  клітин/мл. Мишачий GM-CSF (PeproTech) і людський IL-2 (PeproTech) додають в концентрації 10 нг/мл і 50 нг/мл, відповідно, і клітини культивують в інкубаторі в атмосфері, що містить 5% діоксиду вуглецю, при 37°C протягом 5 днів. Після культивування клітини зіскрабують скребачкою і один раз промивають середовищем. Потім клітини суспендують в середовищі 10% FBS/RPMI 1640 в концентрації  $5 \times 10^6$  клітин/мл і використовують як розчин, що містить ефекторні клітини мишачого кісткового мозку.

#### 19.2 Отримання клітин-мішеней

Клітинну лінію гепатоми людини, HuH-7, підтримують і субкультивують з використанням середовища DMEM (SIGMA), що містить 10% FBS (ThermoTrace). Клітини від'єднують від чашки за допомогою буфера для роз'єднання клітин (Invitrogen), вносять в кожну ямку 96-ямкового планшета з U-подібним дном (Falcon) в кількості  $1 \times 10^4$  клітин/ямка і культивують 1 день. Після культивування додають 5,55 мБк хрому-51 і клітини культивують в інкубаторі в атмосфері, що містить 5% діоксиду вуглецю, при 37°C протягом 1 години. Отримані клітини промивають один раз середовищем, додають 50 мкл середовищем 10% FBS/RPMI 1640 і використовують як клітини-мішені.

#### 19.3 Аналіз вивільнення хрому (APCC-активність)

До клітин-мішеней додають 50 мкл розчину, що містить різні концентрації антитіла, і залишають взаємодіяти на льоду протягом 15 хвилин. Потім додають 100 мкл розчину, що містить ефекторні клітини мишачого кісткового мозку, ( $5 \times 10^5$  клітин/ямка) і клітини культивують в інкубаторі в атмосфері 5% діоксиду вуглецю при 37°C протягом 4 годин. Після культивування планшет центрифугують і за допомогою гамма-лічильника вимірюють радіоактивність в 100 мкл культурального супернатанту. Питому швидкість вивільнення хрому розраховують по нижченаведеній формулі.

Питома швидкість вивільнення хрому (%) =  $(AC) \times 100 / (B - C)$

"А" означає середню кількість радіоактивності (імп./хв.) в кожній ямці, "В" означає середню кількість радіоактивності (імп./хв.) в ямці, в якій до клітин-мішеней додано 100 мкл 2% водного розчину NP-40 (Nonidet P-40, Code No. 252-23, Nacalai Tesque) і 50 мкл середовища 10% FBS/RPMI, і "С" означає середню кількість радіоактивності (імп./хв.) в ямці, в якій до клітин-мішеней додано 150 мкл середовища 10% FBS/RPMI. Аналіз проводять з потрійними повторами і для ADCC-активності розраховують середнє значення і стандартне відхилення (%).

Результати приведені на Фіг. 9. Виявлено, що антитіло GC33 виявляє ADCC-активність, якщо концентрація антитіла становить 0,1 мкг/мл або вище, і що воно володіє більш високою активністю, ніж антитіло GC199.

#### Приклад 20

Протипухлинна активність антитіла GC33 на мишачій моделі з трансплантованою гепатомою людини

#### 20.1 Отримання мишачої моделі з трансплантованою гепатомою людини

Отримують суспензію клітинної лінії гепатоми людини HuH-7,  $5 \times 10^6$  клітин/мл, в розчині, що містить середовище DMEM і MATRIGEL (BD Bioscience) в співвідношенні 1:1. За день до цього 100 мкл розчину антитіла проти асіало-GM1 (Wako Pure Chemicals, вміст одного флакона розчиняють в 1 мл дистильованої води для ін'єкції, потім додають 4 мл фізіологічного розчину) вводять внутрішньочеревинно мишам SCID (самці, вік 5 тижнів, CLEA Japan, Inc.). Мишам підшкірно трансплантують в абдомінальну ділянку 100 мкл вищезазначеної клітинної суспензії ( $5 \times 10^6$  клітин/миша).

#### 20.2 Отримання і введення антитіла

Починаючи з 20 дня після трансплантації клітин, розчин антитіла, отриманий в день введення, з концентрацією 0,5 мг/мл (група, якій вводять 5 мг/кг) і 0,1 мг/мл (група, якій вводять 1 мг/кг), PBS(-), вводять мишачій моделі з трансплантованими клітинами гепатоми людини в кількості 10 мл/кг через хвостову вену один раз на тиждень протягом 3 тижнів. Як негативний контроль аналогічним чином вводять середовище, PBS(-), в кількості 10 мл/кг через хвостову вену один раз на тиждень протягом 3 тижнів. Обидві групи складаються з 6 мишей кожна.

#### 20.3 Оцінка протипухлинного ефекту

Протипухлинну дію антитіла GC33 на мишачу модель з трансплантованими клітинами гепатоми

людини оцінюють по зміні об'єму пухлини з течією часу і по масі пухлини через 1 тиждень після останнього введення. Об'єм пухлини розраховують по наведеній нижче формулі.

Об'єм пухлини = (основна вісь) × (мінорна вісь) × (мінорна вісь) / 2

Як показано на Фіг. 10, в групі, одержуючій антитіло GC33, спостерігається значне придушення росту пухлини в порівнянні з групою, що одержує середовище.

Таким чином, показано, що GC33 надає протипухлинну дію на мишачу модель з трансплантованими клітинами гепатоми людини.

#### Приклад 21

Отримання мишаче-людського химерного антитіла GC33

Н-ланцюг і L-ланцюг GC33 ампліфікують методом ПЛР з використанням синтетичного олігонуклеотиду, комплементарного 5'-кінцевим нуклеотидним послідовностям, який містить послідовність Козака і ділянку HindIII, і синтетичного олігонуклеотиду, комплементарного 3'-кінцевим нуклеотидним послідовностям, який містить ділянку BstNI. Після розщеплення за допомогою HindIII і BstNI, отриманий продукт ПЛР клонують у векторі експресії, HEFg $\gamma$ 1, в який вбудована константна ділянка людського IgG1, і у векторі експресії, HEFgK, в який вбудована константна ділянка людського каппа-ланцюга (Sato et al., Mol Immunol. 1994; 371-381). Вектори вводять в клітини CHO (клітинна лінія DG44) відповідно до описаного вище методу і отримують клітинну лінію зі стабільною експресією. Антитіло виділяють з культурального супернатанту з використанням Hi Trap ProteinG HP (Amersham). Концентрацію IgG в культуральному супернатанті вимірюють сандвіч-методом ELISA для людських IgG, використовуючи козячі антитіла проти людських IgG (BIOSOURCE) і кон'югат козячих антитіл проти людських IgG з лужною фосфатазою (BIOSOURCE), і визначають концентрацію шляхом порівняння з комерційно доступним людським IgG (Cappel).

#### Приклад 22

Визначення CDC-активності і ADCC-активності з використанням мишаче-людського химерного антитіла GC33

CDC-активність і ADCC-активність мишаче-людських химерних антитіл GC33, M3C11 і M1E7 вимірюють за допомогою способів, описаних в прикладах 16 і 17. Як клітини-мішені для вимірювання CDC-активності використовують клітини CHO, що експресують повнорозмірний GPC3, а для вимірювання ADCC-активності використовують клітини HepG2. Результати приведені на Фіг. 11 і Фіг. 12, відповідно. Виявлено, що у всіх аналітичних системах GC33, в порівнянні з двома іншими антитілами, виявляє високу CDC-активність і ADCC-активність.

#### Приклад 23

Аналіз епітопів GC33

Щоб детально визначити епітоп, розпізнаваний GC33, отримують гібридні білки, що складаються з додатково укороченого С-кінцевого пепти-

ду GPC3 і GST, і аналізують їх методом вестерн-блотингу. Отримані пептидні послідовності GPC3, що містяться в GST-гібридному білку, приведені на Фіг. 13. Оскільки GC33 може зв'язуватися з GC-4 (амінокислоти 537-563), але не може зв'язуватися з GC-5 (амінокислоти 550-563), вважається, що епітоп знаходиться в ділянці, що включає в себе, щонайменше, частину фрагмента від 537 до 550 амінокислоти. Спочатку отримують пептиди GC-6 (GNSQQAATPKDNEIS (SEQ ID NO: 93)), GC-7 (GNSQQAATP (SEQ ID NO: 94)), GC-8 (QQAATPKDNEIS (SEQ ID NO: 95)) і GC-9 (TPKDNELIS (SEQ ID NO: 96)). Отримують пряму оліго-ДНК і зворотну оліго-ДНК, які конструюють так, щоб сайт розщеплення послідовності розпізнавання EcoRI був приєднаний до 5'-кінця, а сайт розщеплення послідовності розпізнавання Sall був приєднаний до 3'-кінця, відповідно. Оліго-ДНК синтезують з допомогою Espec Oligo Service. ДНК виділяють з використанням картриджа C-18, фосфорилують по 5'-кінцю і аналізують. Змішують двадцять п'ять мікролітрів прямої оліго-ДНК (10 мкМ) і 25 мкл зворотної оліго-ДНК (10 мкМ) і піддають взаємодії при 94°C протягом 5 хвилин, при 37°C протягом 10 хвилин, і при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, потім залишають при 4°C на 10 хвилин для відпалу прямої оліго-ДНК і зворотної оліго-ДНК. Концентрацію олігонуклеотидів визначають шляхом вимірювання поглинання при молярному співвідношенні вставки до вектора 3:1. Олігонуклеотиди клонують в EcoRI- і Sall-розщепленому векторі pGEX4T-3 і підтверджують нуклеотидні послідовності. GST-гібридний білок отримують вищезгаданим способом і очищають з допомогою глутатіон-сефарози 4В. Очищені білки розділяють методом SDS-PAGE у відновлювальних умовах і аналізують методом вестерн-блотингу з використанням GC33. Результати показують, що антитіло GC33 не дозволяє достовірно детектувати ніякі GST-гібридні білки, отже, можна передбачити, що для зв'язування GC33 потрібна більш довга послідовність на С-кінці (Фіг. 14). Основуючись на вищезгаданому припущенні, отримують GC-11 (AATPKDNEIST (SEQ ID NO: 97)), GC-12 (PKDNEISTFH (SEQ ID NO: 98)), GC-13 (DNEISTFHNL (SEQ ID NO: 99)) і GC-14 (EISTFHNLGN (SEQ ID NO: 100)) і оцінюють їх таким же способом. Отримані результати показують, що GC-11, GC-12 і GC-13 краще зв'язуються з GC33, отже, можна передбачити, що епітоп, розпізнаваний GC33, розташований в послідовності від 544-ой до 553-ої амінокислоти (PKDNEISTFH) на С-кінці GPC3.

#### Приклад 24

Гуманізація GC33

Дані по послідовностях антитіл отримують з відкритої для широкого доступу бази даних Kabat (<http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) і з бази даних ImMunoGeneTics (IMGT). Варіабельну ділянку Н-ланцюга і варіабельну ділянку L-ланцюга окремо аналізують на гомологію. Отримані результати показують, що варіабельна ділянка Н-ланцюга володіє високою мірою гомології з DN13 (Smithson et al., Mol Immunol. 1999; 36: 113-124), а варіабельна ділянка L-ланцюга володіє високою мірою



гомології з мПНК IGH homo sapiens ділянки VLJ легкого ланцюга каппа імуноглобуліну, неповним cds, клон: K64, номер за каталогом AB064105. Сигнальну послідовність з номером по каталогу S40357, яка володіє високою мірою гомології з AB064105, використовують як сигнальну послідовність L-ланцюга. Щоб отримати гуманізоване антитіло, гіперваріабельну ділянку (далі згадується як CDR) GC33 трансплантують в каркасні ділянки (далі згадується як FR) вказаних людських анти-тіл.

Конкретно, синтетичні оліго-ДНК розміром приблизно 50 основ конструюють так, щоб приблизно 20 основ з них гібридизувалися, і потім вказані синтетичні оліго-ДНК збирають разом методом ПЛР, щоб отримати гени, що кодують всі варіабельні ділянки. Їх розщеплюють по ділянки HindIII, вбудованій в кінець 5'-кінця синтетичної оліго-ДНК, і по ділянки BstNI, вбудованій в кінець 3'-кінця синтетичної оліго-ДНК. Фрагменти клонують у векторі експресії, HEFg $\gamma$ 1, в якому клонують константну ділянку людського IgG, або у векторі експресії, HEFg $\kappa$ 1, в якому клонують константну ділянку людського каппа-ланцюга (Sato et. al., Mol Immunol. 1994; 37:1- 381). Н-ланцюг і L-ланцюг гуманізованого GC33, сконструйований, як описано вище, називають ver.a, відповідно. Гуманізоване GC33, у якого і Н-ланцюг, і L-ланцюг, є ver.a (ver.a/ver.a), володіє більш низькою зв'язуючою активністю, чим антитіло з варіабельними ділянками мишачого GC33 (миша/миша). Конструюють антитіла, в яких химерно об'єднані послідовності мишачого GC33 і послідовності ver.a (миша/ver.a, ver.a/миша), відносно Н-ланцюга і L-ланцюга, і визначають їх зв'язуючу активність. Результати показують, що зменшення зв'язування спостерігається у випадку ver.a/миша, отже, зменшення зв'язуючої активності внаслідок заміни амінокислот відноситься до Н-ланцюга (Фіг. 15). Потім отримують модифіковані Н-ланцюги, ver.c, ver.f, ver.h, ver.i, ver.j, ver.k. Всі вказані гуманізовані GC33 володіють такою ж зв'язуючою активністю, як і химерне антитіло, яке містить варіабельну ділянку мишачого GC33 (Фіг. 15). Нуклеотидні послідовності варіабельних ділянок Н-ланцюга гуманізованого GC33, ver.a, ver.c, ver.f, ver.h, ver.i, ver.j, ver.k, описані в SEQ ID NO: 77, 78, 79, 80, 81, 82 і 83, відповідно, а їх амінокислотні послідовності описані в SEQ ID NO: 84, 85, 86, 87, 88, 89 і 90, відповідно. Нуклеотидна послідовність і амінокислотна послідовність варіабельної ділянки L-ланцюга гуманізованого GC33, ver.a, описані в SEQ ID NO: 91 і 92, відповідно. У варіабельних ділянках Н-ланцюга гуманізованого GC33 ver.i, ver.j і ver.k 6-ий залишок глютамінової кислоти замінюють на залишок глютаміну. Термостабільність даних антитіл значно підвищена.

#### Приклад 25

Модифікація L-ланцюга гуманізованого GC33

Відомо, що константа швидкості реакції дезамідування білків залежить від первинної послідовності. Також відомо, що поєднання Asn-Gly особливо чутливе до дезамідування (Rocinson et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001; 98; 944-949). Що

стосується Asn33 в CDR1 ver.a L-ланцюгу гуманізованого GC33, описаного в SEQ ID NO: 91, первинною послідовністю є поєднання Asn-Gly, яке, як передбачено, є чутливим до дезамідування.

Щоб оцінити вплив дезамідування Asn33 на зв'язуючу активність, отримують модифіковане антитіло, в якому Asn33 замінений на Asp. Точкову мутацію вводять за допомогою набору для направленої мутагенезу Quick Change (Stratagene). Більш конкретно, 50 мкл реакційної суміші, що містить 125 нг смислового праймера (CTT GTA CAC AGT GAC GGA AAC ACC TAT: SEQ ID NO: 172), 125 нг антисмислового праймера (ATA GGT GTT TCC GTC ACT GTG TAG AAG: SEQ ID NO: 173), 5 мкл 10x реакційного буферу, 1 мкл суміші dNTP, 10 нг HEFgK, в якому клонують ver.a L-ланцюга гуманізованого GC33, і 1 мкл ДНК-полімерази Pfu Turbo піддають реакції ПЛР, що включає в себе 12 циклів, які складаються з 95°C протягом 30 секунд, 55°C протягом 1 хвилини і 68°C протягом 9 хвилин. Потім додають рестриктазу, DpnI, розщеплення проводять при 37°C протягом 2 годин і продукт розщеплення вводять в компетентну клітину XL1-Blue, присутню в наборі, і в результаті отримують трансформант. Варіабельну ділянку вирізають з клона, в який відповідним чином введена кожна мутація, і знов клонують в HEFg $\kappa$ . Його вводять в клітину COS7 з використанням Eugene 6(Roche) разом з HEFg $\gamma$ 1, в якому клонують ver.k Н-ланцюга гуманізованого GC33. З культурального супернатанту виділяють антитіло, що тимчасово експресується в клітині. Концентрацію антитіла визначають сендвіч-методом ELISA, використовуючи антитіло проти людського IgG. Зв'язуючу активність модифікованого антитіла визначають методом ELISA з використанням імунопланшету, покритого розчинною формою корового білка GPC3. Як показано на Фіг. 18, модифіковане антитіло (N33D), в якому Asn33 замінений на Asp, втрачає зв'язуючу активність, отже, можна передбачити, що дезамідування Asn33 впливає значним чином на зв'язуючу активність.

Як спосіб придушення дезамідування Asn33 була описана заміна Gly34 на іншу амінокислоту (міжнародна патентна заявка WO 03057881A1). Відповідно до вищезазначеного методу G34 замінюють на будь-яку з 17 амінокислот, відмінних від Cys і Met, з використанням набору для направленої мутагенезу Quick Change і отримують ряд модифікованих антитіл, а саме, G34A, G34D, G34E, G34F, G34H, G34N, G34P, G34Q, G34I, G34K, G34L, G34V, G34W, G34Y, G34R, G34S і G34T. Здійснюють тимчасову експресію даних антитіл в клітинах COS7 і в клітинному супернатанті визначають зв'язуючу активність. Було виявлено, що зв'язуюча активність зберігається, навіть якщо G34 замінюють на іншу амінокислоту, за винятком Pro (G34P) і Val (G34V).

Амінокислотні послідовності CDR1 легкого ланцюга вищезазначених антитіл описані в SEQ ID NO: 174 (G34A), SEQ ID NO: 175 (G34D), SEQ ID NO: 176 (G34E), SEQ ID NO: 177 (G34F), SEQ ID NO: 178 (G34H), SEQ ID NO: 179 (G34N), SEQ ID NO: 180 (G34T), SEQ ID NO: 181 (G34Q), SEQ ID NO: 182 (G34I), SEQ ID NO: 183 (G34K), SEQ ID

NO: 184 (G34L), SEQ ID NO: 185 (G34S), SEQ ID NO: 186 (G34W), SEQ ID NO: 187 (G34Y), SEQ ID NO: 188 (G34R), SEQ ID NO: 189 (G34V) і SEQ ID NO: 190 (G34P), відповідно. Амінокислотні послідовності варіабельних ділянок легкого ланцюга вищезазначених антитіл описані в SEQ ID NO: 191 (G34A), SEQ ID NO: 192 (G34D), SEQ ID NO: 193 (G34E), SEQ ID NO: 194 (G34F), SEQ ID NO: 195 (G34H), SEQ ID NO: 196 (G34N), SEQ ID NO: 197 (G34T), SEQ ID NO: 198 (G34Q), SEQ ID NO: 199 (G34I), SEQ ID NO: 200 (G34K), SEQ ID NO: 201 (G34L), SEQ ID NO: 202 (G34S), SEQ ID NO: 203 (G34W), SEQ ID NO: 204 (G34Y), SEQ ID NO: 205 (G34R), SEQ ID NO: 206 (G34V) і SEQ ID NO: 207 (G34P), відповідно.

Антитіло даного винаходу можна використати як інгібітор клітинного росту, протираковий засіб або засіб для діагностики раку.

#### Приклад 26

Отримання клітинної лінії гепатоми людини (SK-03), що експресує повнорозмірний людський GPC3

Для оцінки біологічної активності антитіл проти GPC3 отримують клітинну лінію гепатоми людини, яка експресує повнорозмірний GPC3.

Один мікрограм вектора експресії, що містить ген повнорозмірного людського GPC3, оброблено-го Pvu I, змішують з 2 мкл FuGENE (Roche), щоб отримати комплекс. Потім вводять ген шляхом додання отриманого комплексу до клітин SK-HEP-1 (отриманим від ATCC). Після інкубації в CO<sub>2</sub>-інкубатор протягом 24 годин проводять селекцію

клітин, експресуючих GPC3, з використанням середовища MEM по Дульбекко (D-MEM, SIGMA), що містить генетин в кінцевій концентрації 1 мг/мл і 10% FBS. Збирають стійкі до генетину колонії і клітини клонують, використовуючи метод лімітуючих розведень. Експресію людського GPC3 в кожному клітинному клоні аналізують методом потоочної цитометрії з використанням химерного антитіла GC33 і FITC-міченого козячого антитіла проти людських IgG (ICN). Таким чином отримують клітинну лінію SK-03 зі стабільною експресією.

#### Приклад 27

Порівняння CDC-активності і ADCC-активності мишаче-людських химерних антитіл

Щоб безпосередньо порівняти CDC-активність і ADCC-активність мишаче-людських химерних антитіл GC33, M3C11 і M1E7, описаних в прикладі 22, CDC-активність і ADCC-активність трьох антитіл вимірюють в одній аналітичній системі за способом, описаним в прикладах 16 і 17. Як клітини-мішені для вимірювання CDC-активності використовують клітини CHO, експресуючі повнорозмірний GPC3, а для вимірювання ADCC-активності використовують клітини SK-03. Результати приведені на Фіг. 19 і Фіг. 20, відповідно. Виявлено, що в будь-якій аналітичній системі GC33 володіє більш високою CDC-активністю і ADCC-активністю, ніж два інші антитіла.

#### Застосування в промисловості

Антитіло даного винаходу можна використати як інгібітор клітинного росту, протираковий засіб і засіб для діагностики раку.

## СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| <110> | Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha                                    |     |
| <120> | Антитіла проти гліпікану 3   |     |
| <130> | PCG-9009WO   |     |
| <150> | JP 2004-203637   |     |
| <151> | 2004-07-09   |     |
| <160> | 173  |     |
| <170> | PatentIn version 3.1   |     |
| <210> | 1  |     |
| <211> | 31   |     |
| <212> | ДНК  |     |
| <213> | Штучна послідовність   |     |
| <220> |  |     |
| <223> | Праймер ПЛР  |     |
| <400> | 1  |     |
|       | gatatcatgg ccgggaccgt ggcacccgcg t                                 | 31  |
| <210> | 2  |     |
| <211> | 31   |     |
| <212> | ДНК  |     |
| <213> | Штучна послідовність   |     |
| <220> |  |     |
| <223> | Праймер ПЛР  |     |
| <400> | 2  |     |
|       | gctagctcag tgcaaccagga agaagaagca c                                | 31  |
| <210> | 3  |     |
| <211> | 1743   |     |
| <212> | ДНК  |     |
| <213> | homo sapiens   |     |
| <400> | 3  |     |
|       | atggccggga ccgtgcgcac cgcgtgcttg gtggtggcga tgcctgcag cttggacttc   | 60  |
|       | ccgggacagg cgcagcccc gccgcgcgcg ccggacgcca cctgtcacca agtcogctcc   | 120 |
|       | ttcttcacga gactgcagcc cggactcaag tgggtgccag aaactcccggt gccaggatca | 180 |
|       | gatttgcaag tatgtctccc taagggccca acatgtgtct caagaaagat ggaagaaaaa  | 240 |
|       | taccaactaa cagcacgatt gaacatggaa cagctgtctc agtctgcaag tatggagctc  | 300 |
|       | aagttcttaa ttattcagaa tgcctgcggt ttccaagagg cctttgaaat tgttgctcgc  | 360 |
|       | catgccaaaga actacaccaa tgccatgttc aagaacaact acccaagcct gactccacaa | 420 |
|       | gcttttgagt ttgtgggtga atttttcaca gatgtgtctc tctacatctt gggttctgac  | 480 |
|       | atcaatgtag atgacatggt caatgaattg ttgacagcc tgtttccagt catctatacc   | 540 |
|       | cagctaatga acccaggcct gcctgattca gccttgaca tcaatgagtg octccgagga   | 600 |
|       | gcaagacgtg acctgaaagt atttggaat ttcccaagc ttattatgac ccagggttcc    | 660 |
|       | aagtcactgc aagtcactag gatcttctt caggctctga atcttggaaat tgaagtgatc  | 720 |
|       | aacacaactg atcacctgaa gttcagtaag gactgtgccc gaatgctcac cagaatgtgg  | 780 |

tactgctctt actgccaggg actgatgatg gttaaaccct gtggcgggta ctgcaatgtg 840  
gtcatgcaag gctgtatggc aggtgtggtg gagattgaca agtactggag agaatacatt 900  
ctgtcccttg aagaacttgt gaatggcatg tacagaatct atgacatgga gaacgtactg 960  
cttggctctt tttcaacaat ccatgattct atccagtatg tocagaagaa tgcaggaaag 1020  
ctgaccacca ctattggcaa gttatgtgcc cattctcaac aacgccaata tagatctgct 1080  
tattatcctg aagatctctt tattgacaag aaagtattaa aagttgctca tgtagaacat 1140  
gaagaaacct tatccagccg aagaagggaa ctaattcaga agttgaagtc tttcatcagc 1200  
ttctatagtg ctttgcctgg ctacatctgc agccatagcc ctgtggcggg aaacgacacc 1260  
ctttgctgga atggacaaga actcgtggag agatacagcc aaaaggcagc aaggaatgga 1320  
atgaaaaacc agttcaatct ccatgagctg aaaatgaagg gccctgagcc agtgggtcagt 1380  
caaattattg acaaaactgaa gcacattaac cagctcctga gaacctgtc tatgcccata 1440  
ggtagagttc tggataaaaa cctggatgag gaaggggttg aaagtggaga ctgcggtgat 1500  
gatgaagatg agtgcatgtg aggtctggtg gatggaatga taaaagtga gaatcagctc 1560  
cgcttccttg cagaactggc ctatgatctg gatgtggatg atgcgcctgg aaacagtcag 1620  
caggcaactc cgaaggacaa cgagataagc acctttcaca acctcgggaa cgttcattcc 1680  
ccgctgaagc ttctcaccag catggccatc tcggtggtgt gcttctctt cctggtgcac 1740  
tga 1743

<210> 4

<211> 580

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Met Ala Gly Thr Val Arg Thr Ala Cys Leu Val Val Ala Met Leu Leu  
1 5 10 15  
Ser Leu Asp Phe Pro Gly Gln Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Asp  
20 25 30  
Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly  
35 40 45  
Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val  
50 55 60  
Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys  
65 70 75 80  
Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala  
85 90 95  
Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln  
100 105 110  
Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala  
115 120 125  
Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe  
130 135 140  
Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp  
145 150 155 160

Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro  
 165 170 175  
 Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu  
 180 185 190  
 Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe  
 195 200 205  
 Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln  
 210 215 220  
 Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile  
 225 230 235 240  
 Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu  
 245 250 255  
 Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys  
 260 265 270  
 Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly  
 275 280 285  
 Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu  
 290 295 300  
 Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu  
 305 310 315 320  
 Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys  
 325 330 335  
 Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser  
 340 345 350  
 Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile  
 355 360 365  
 Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His Val Glu His Glu Glu Thr Leu  
 370 375 380  
 Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser  
 385 390 395 400  
 Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala  
 405 410 415  
 Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr  
 420 425 430  
 Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His  
 435 440 445  
 Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp  
 450 455 460  
 Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys  
 465 470 475 480  
 Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly  
 485 490 495

Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly  
 500 505 510  
 Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr  
 515 520 525  
 Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro  
 530 535 540  
 Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser  
 545 550 555 560  
 Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser Val Val Cys Phe Phe  
 565 570 575  
 Phe Leu Val His  
 580

<210> 5

<211> 31

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер ПЛР

<400> 5

atagaattcc accatggccg ggaccgtgcg c 31

<210> 6

<211> 31

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер ПЛР

<400> 6

ataggatccc ttcacggggg aatgaacgtt c 31

<210> 7

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер ПЛР

<400> 7

gggccagtgg atagacagat g 21

<210> 8

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер ПЛР

| 85   | 94019 | 86 |
|--|-------|----|
| <400> 8  |       |    |
| caggggccag tggatagacc gatg   |       | 24 |
| <210> 9  |       |    |
| <211> 24   |       |    |
| <212> ДНК  |       |    |
| <213> Штучна послідовність   |       |    |
| <220>  |       |    |
| <223> Праймер ПЛР  |       |    |
| <400> 9  |       |    |
| caggggccag tggatagaact gatg  |       | 24 |
| <210> 10   |       |    |
| <211> 23   |       |    |
| <212> ДНК  |       |    |
| <213> Штучна послідовність   |       |    |
| <220>  |       |    |
| <223> Праймер ПЛР  |       |    |
| <400> 10   |       |    |
| gctcactgga tggagggaag atg  |       | 23 |
| <210> 11   |       |    |
| <211> 1392   |       |    |
| <212> ДНК  |       |    |
| <213> Mus musculus   |       |    |
| <400> 11   |       |    |
| atgaacttcg ggctcacctt gattttcctt gtccttactt taaaagggtgt ccagtgtgag | 60    |    |
| gtgcaactgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gaggatccct gaaactctcc  | 120   |    |
| tgtgcagcct ctggattcac ttccagtcgc tatgccatgt cttgggttcg ccagattcca  | 180   |    |
| gagaagatac tggagtgggt cgcagccatt gatagtagtg gtggtgacac ctactattta  | 240   |    |
| gacactgtga aggaccgatt caccatctcc agagacaatg ccaataatac cctgcacotg  | 300   |    |
| caaatgcgca gtctgaggtc tgaggacaca gocttgatt actgtgtaag acaggggggg   | 360   |    |
| gcttactggg gccaaaggac tctggtcact gtctctgcag ctagcaccaa gggcccatcg  | 420   |    |
| gtcttcccc tggcaccttc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc   | 480   |    |
| ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgcctgaac  | 540   |    |
| agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc  | 600   |    |
| gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc accagacct acatctgcaa cgtgaatcac   | 660   |    |
| aagcccagca acccaagggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga caaaactcac  | 720   |    |
| acatgcccac cgtgcocago acctgaactc ctggggggac cgtcagtcct cctcttcccc  | 780   |    |
| ccaaaaccca aggcaacct catgatctoc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg   | 840   |    |
| gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtczag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg  | 900   |    |
| cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc  | 960   |    |
| gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctccc   | 1020  |    |
| aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga   | 1080  |    |
| gaaccacagg tgtacacct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc   | 1140  |    |

ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200  
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1260  
 ttctcttaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320  
 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380  
 ccgggtaaat ga 1392

<210> 12

<211> 342

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 12

gaggtgcacc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60  
 tctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatgcc tgtcttgggt tcgccagact 120  
 ccagagaaga ggtctggagtg ggtcgcagcc attaataata atggtgatga cacctactat 180  
 ttagacactg tgaaggaccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240  
 ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acagccctgt attactgtgt aagacaaggg 300  
 ggggcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctg ca 342

<210> 13

<211> 1413

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 13

atgggatgga actggatctt tatTTtaatc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccactctgag 60  
 gtccagctgc agcagctctg acctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaagatatcc 120  
 tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tactacatgc actgggtgaa gcaaagtcct 180  
 gaaaagagcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagca ctgggtgtac tacctacaac 240  
 cagaagttca aggccaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300  
 cagctcaaga gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaag gaggggcgga 360  
 ttaactggga cgagcttctt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 420  
 gctagcacca agggcccatc ggtcttccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 480  
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggccaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 540  
 tggaactcag gcgccctgac cagcgcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 600  
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagagacc 660  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 720  
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 780  
 ccgtcagctt tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 840  
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 960  
 agcacgtacc gtgtggctag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020  
 gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080  
 aaagccaaag ggcagcccg agaaccacag gtgtacacc tgcctccatc ccgggatgag 1140  
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200  
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 1260



ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320  
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380  
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1413

<210> 14

<211> 354

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 14

caggtcactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60  
 acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttatggta tgggtgtagg ttggattcgt 120  
 cagccttcag ggatgggtct ggagtggctg gccaacattt ggtggtatga tgctaagtac 180  
 tataactctg acctgaagag ccggctcaca atctccaagg atacctcaa caaccaggtg 240  
 ttctcaaga tctccagtgt ggacacttca gatactgccata cactactctg tgctcaaatg 300  
 ggactggcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca 354

<210> 15

<211> 354

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 15

caggtcactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60  
 acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc atttatggta tgggtgtagg ttggattcgt 120  
 cagccttcag ggaagggctc ggagtggctg gccaacattt ggtggaatga tgataagtac 180  
 tataactcag cctgaagag ccggctcaca atctccaagg atacctcaa caaccaggta 240  
 ttctcaaga tctccagtgt ggacactgca gatactgccata cactactctg tgctcaaatg 300  
 ggtaacttct actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 16

<211> 1416

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 16

atgaacttcg ggctcacctt gatattcctc gtccctactt taaaagggtg ccagtgtgag 60  
 gtgcagctgg tggagtctgg gggagactta gtgaagcctg gagggaccct gaaactctcc 120  
 tgtgcagcct ctggatccac ttctagtaac tatgccatgt ctgggttcg ccagactcca 180  
 gagaagaggc tggagtgggt cgcagccatt gatagtaatg gaggtaccac ctactatcca 240  
 gacactatga aggaccgatt caccatttcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300  
 caaatgaaca gtctgaggtc tgaagacaca gccttttata actgtacaag acataatgga 360  
 gggatatgaaa actacggctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct 420  
 gcagctagca ccaaggggcc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480  
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg 540  
 tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc 600  
 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 660  
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 720

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctggg 780  
 ggaccgtcag tcttctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840  
 cctgaggtca catgctgtgt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900  
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagcaa agccgcggga ggagcagtac 960  
 aacagcacgt accgtgtgtg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020  
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080  
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1140  
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggta aaggcttcta tcccagcgac 1200  
 atcgccgttg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1260  
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320  
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380  
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 1416

<210> 17

<211> 366

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 17

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60  
 tctgtgcag cctctggatt cacttccagt agctatgcca tgtcttgggt tcgccagact 120  
 ccagagaaga ggctggagtg ggtgcagacc attaatagta atggaggtac cacctactat 180  
 ccagacacta tgaaggaccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240  
 ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaagac tcagccttgt attactgtac aagacataat 300  
 ggaggggtatg aaaactacgg ctggtttgct tactggggcc aagggactct ggtcactgtc 360  
 tctgca 366

<210> 18

<211> 1413

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 18

atggaatcta actggatact tccttttatt ctgtcggtag cttcaggggt ctactcagag 60  
 gttcagctcc agcagtctgg gactgtgtgt gcaaggcctg gggcttcagt gaagatgtcc 120  
 tgcaaggctt ctggtacac ctttactggc tactggatgc gctgggtaaa acagaggcct 180  
 ggacagggtc tggaaatgat tggcgctatt tatcctggaa atagtgtac aacatacaac 240  
 cagaagtca agggcaaggc caaactgact gcagtcacat ctgtcagcac tgcctacatg 300  
 gaactcagca gcctgacaaa tgaggactct gcggtctatt actgttcaag atcgggggac 360  
 ctaactgggg ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtct tacagccaaa 420  
 gctagacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 480  
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg 540  
 tggaaactcag gcgcctgtac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 600  
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660  
 tacatctgca acgtgaatca caagccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 720  
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 780

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 840  
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900  
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 960  
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020  
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080  
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcctccatc ccgggatgag 1140  
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200  
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 1260  
ctggactccg acggtcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320  
cagcagggga acgtctctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag 1380  
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1413

<210> 19

<211> 357

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 19

gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60  
tcctgcaagg cttctggcta cacctttacc ggctactgga tgcactgggt aaaacagagg 120  
cctggacagg gtctggaatg gattggcgct attatcctg gaaatagtga tactaactac 180  
aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtea catctgccag cactgcctac 240  
atggagctca gcagcctgac aaatgaggac gctgcgggtc atcactgtac aagatcgggg 300  
gacctaactg gggggcttgc ttactggggc caagggaactc tggctactgt ctctgca 357

<210> 20

<211> 372

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 20

caggtccagc tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaaactg 60  
tcctgcaagg cttctggata caccttact agctactgga tgcattgggt gaagcagagg 120  
cctggacaag gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgatagtta tacttactac 180  
aatcaaaagt tcaggggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccaa cacagcctac 240  
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctcgggtct attactgttc aagatcaaat 300  
ctgggtgatg gtcactaccg gtttctctgc tttccttact ggggccaagg gactctggtc 360  
actgtctctg ca 372

<210> 21

<211> 372

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 21

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaaac ctggggcttc agtgaagctg 60  
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaaacagagg 120  
cctggacaag gccttgaatg gattggtaca attgaccctt ctgatagtga aactcactac 180

```

aatctacagt tcaaggacac ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attattgtat aagaggcgcc 300
ttctatagtt cctatagtta ctgggcctgg ttgcttact ggggccaagg gactctggtc 360
actgtctctg ca 372
<210> 22
<211> 463
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 22
Met Asn Phe Gly Leu Thr Leu Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Arg Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ile Pro Glu Lys Ile Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Ala Ile Asp Ser Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Leu
65 70 75 80
Asp Thr Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn
85 90 95
Thr Leu His Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu
100 105 110
Tyr Tyr Cys Val Arg Gln Gly Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
115 120 125
Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
130 135 140
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
145 150 155 160
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
165 170 175
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
180 185 190
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
195 200 205
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
210 215 220
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
225 230 235 240
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

```

260 265 270  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 275 280 285  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 290 295 300  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 305 310 315 320  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 325 330 335  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 340 345 350  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 355 360 365  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 370 375 380  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 385 390 395 400  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 405 410 415  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 420 425 430  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 435 440 445  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460  
 <210> 23  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 23  
 Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Asn Asn Asn Gly Asp Asp Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Val Arg Gln Gly Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ala

<210> 24

<211> 470

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Met Gly Trp Asn Trp Ile Phe Ile Leu Ile Leu Ser Val Thr Thr Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe  
 35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Lys Ser Leu  
 50 55 60

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

Gln Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Gly Leu Thr Gly Thr Ser Phe Phe Ala  
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

260 265 270  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 370 375 380  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470  
 <210> 25  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 25  
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Met Gly Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Tyr Asp Ala Lys Tyr Tyr Asn Ser Asp  
 50 55 60  
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val  
 65 70 75 80

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

Cys Ala Gln Met Gly Leu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala  
115

<210> 26

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ile Tyr  
20 25 30

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

Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val  
65 70 75 80

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

Cys Ala Gln Ile Gly Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 27

<211> 471

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Met Asn Phe Gly Leu Thr Leu Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly  
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys  
20 25 30

Pro Gly Gly Thr Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe  
35 40 45

Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Ile Asp Ser Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro  
65 70 75 80



Asp Thr Met Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
                   85                  90                  95  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe  
                   100                  105                  110  
 Tyr His Cys Thr Arg His Asn Gly Gly Tyr Glu Asn Tyr Gly Trp Phe  
                   115                  120                  125  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr  
                   130                  135                  140  
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
                   145                  150                  155                  160  
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
                   165                  170                  175  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
                   180                  185                  190  
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
                   195                  200                  205  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
                   210                  215                  220  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
                   225                  230                  235                  240  
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
                   245                  250                  255  
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
                   260                  265                  270  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
                   275                  280                  285  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
                   290                  295                  300  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
                   305                  310                  315                  320  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
                   325                  330                  335  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
                   340                  345                  350  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
                   355                  360                  365  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
                   370                  375                  380  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
                   385                  390                  395                  400  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
                   405                  410                  415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 420 425 430  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 435 440 445  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 450 455 460  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 28

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Asn Ser Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg His Asn Gly Gly Tyr Glu Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

<210> 29

<211> 470

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Met Glu Ser Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Ala Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg  
 20 25 30  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45  
 Thr Gly Tyr Trp Met Arg Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn  
 65                      70                      75                      80  
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Val Ser  
                     85                      90                      95  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val  
                     100                      105                      110  
 Tyr Tyr Cys Ser Arg Ser Gly Asp Leu Thr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp  
                     115                      120                      125  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr Ala Lys Ala Ser Thr Lys  
                     130                      135                      140  
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145                      150                      155                      160  
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
                     165                      170                      175  
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
                     180                      185                      190  
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
                     195                      200                      205  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
                     210                      215                      220  
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 225                      230                      235                      240  
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
                     245                      250                      255  
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
                     260                      265                      270  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
                     275                      280                      285  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
                     290                      295                      300  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305                      310                      315                      320  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
                     325                      330                      335  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
                     340                      345                      350  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
                     355                      360                      365  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
                     370                      375                      380  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385                      390                      395                      400

111

94019

112

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 30

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ala Ala Val Tyr His Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Ser Gly Asp Leu Thr Gly Gly Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 31

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Arg Ser Asn Leu Gly Asp Gly His Tyr Arg Phe Pro Ala Phe Pro  
 100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

<210> 32

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Leu Gln Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Thr Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ile Arg Gly Ala Phe Tyr Ser Ser Tyr Ser Tyr Trp Ala Trp Phe Ala  
 100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

<210> 33

<211> 717

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 33

atgagtcctg ccagttcct gttctgtta gtgctctgga ttgggaaac caacggtgat 60  
 gttgtgatga ccagactcc actcatttg tcggttacca ttggacaacc agcctccatc 120  
 tcttgcaagt caagtcagag cctcttagat agtgatggaa agacatattt gaattggttg 180  
 ttacagaggg caggccagtc tccaaagcgc ctaatctatc tgggtgtotaa attggactct 240  
 ggagcccctg acaggttcac tggcagtggg tcagggacag atttcacact gaaaatcagt 300  
 agagtggagg ctgaggattt gggaatttat tattgctggc aaggtacaca tttccgctc 360

115

94019

116

acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 420  
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480  
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 540  
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600  
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660  
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttga 717

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; ДНК

<213> *Mus musculus*

&lt;400&gt; 34

gatgttgtga tgaccagtc tccactcact ttgtcgatta ccattggaca accagcctcc 60  
 atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120  
 ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgctaactct atctggtgtc taaactggac 180  
 tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttctc actgaaaatc 240  
 agcagagtgg aggtcgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtag acattttccg 300  
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 717

&lt;212&gt; ДНК

<213> *Mus musculus*

&lt;400&gt; 35

atgagtcctg tccagttcct gtttctgtta atgctctgga ttcaggaaac caacgggtgat 60  
 gttgtgatga cccagactcc actgtctttg tcggttacca ttggacaacc agcctctatc 120  
 tcttgcaagt caagtcagag cctcttatat agtaatgga agacatattt gaattggtta 180  
 caacagaggg ctggccaggc tccaaagcac ctaatgtatc aggtgtccaa actggaccct 240  
 ggcacccctg acaggttcag tggcagtgga tcagaaacag attttactact taaaatcagc 300  
 agagtggagg ctgaagattt gggagtttat tactgcttgc aaagtacata ttatccgctc 360  
 acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 420  
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480  
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 540  
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600  
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660  
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttga 717

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 324

&lt;212&gt; ДНК

<213> *Mus musculus*

&lt;400&gt; 36

gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60  
 atcacttgca aggcgagtca ggacattaat aactatttaa gctggttcca gcagaaacca 120  
 gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggtagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtat 240  
 gaagatatgg gaattaatta ttgtctacag tgtgatgagt ttctccgtg gacgttcggt 300  
 ggaggcacca agctggaaat caaa 324

<210> 37

<211> 336

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 37

gatgttgatg tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagga tcaagcctcc 60  
 atctcttgca gatctagtc gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg 120  
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240  
 agcagagtgg aggtgagga tctgggaggt tatttctgct ctcaaagtac acatgttccg 300  
 tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 38

<211> 705

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 38

atgagaccct ccattcagtt cctggggctc ttgttgttct ggcttcatgg tgttcagtgt 60  
 gacatccaga tgacacagtc tccatctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 120  
 atcacttgca aggcaagtca ggacattaac aagaatatag ttgggtacca acacaagcct 180  
 ggaaaagggtc ctaggctgct catatggtac acatctacat tacagccagg catcccatca 240  
 aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggagcct 300  
 gaagatatgg caacttatta ctgtctacag tatgataatc ttccacggac gttcgggtga 360  
 ggcaccaaac tggaaatcaa acgtacgggtg gctgcacat ctgtcttcat ctcccgccca 420  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgtgaa taacttctat 480  
 ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttga 705

<210> 39

<211> 321

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 39

gacatccaga tgacacagtc tccatctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 60  
 atcacttgca aggcaagtca ggacattaac aagaatataa ttgggtacca acacaagcct 120  
 ggaaaagggtc ctaggctgct catatggtac acatctacat tacagccagg catcccatca 180  
 aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggagcct 240  
 gaagatatgg caacttatta ctgtctacag tatgataatc ttccacggac gttcgggtga 300  
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 720

&lt;212&gt; ДНК

<213> *Mus musculus*

&lt;400&gt; 40

```

atgaggttct ctgctcagct tctggggctg cttgtgctct ggatccctgg atccactgca    60
gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc aatccagtc ctcttggaa atcaacttcc    120
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatacactta tttgtattgg    180
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgattt atcagatgtc caaccttgcc    240
tcaggagtcc cagacaggtt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc    300
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg    360
tatacgttcg gatcggggac caagctggaa ataaaacgt cgggtggctgc accatctgtc    420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg    480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa    540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc    600
agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcttgcgaa    660
gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga    720

```

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; ДНК

<213> *Mus musculus*

&lt;400&gt; 41

```

gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc aatccagtc ctcttggaa atcagcttcc    60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatacactta tttgtattgg    120
tttctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgattt atcagatgtc caaccttgcc    180
tcaggagtcc cagacaggtt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc    240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg    300
tatacgttcg gatcggggac caagctggaa ataaaa                                336

```

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; ДНК

<213> *Mus musculus*

&lt;400&gt; 42

```

gatattgtgc taactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga cagagtcagt    60
ctttcctgca gggccagcca tagtattagc aacttcctac actggtatcc acaaaaatca    120
catgagtctc caaggcttct catcaagtat gcttccagc ccatctctgg gatccctcc    180
agggtcagtg gcaatggatc agggacagat ttactctca gtatcaacag tgtggagact    240
gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtaacatct ggtcgctcac gttcggtgct    300
gggaccaagc tggagctgaa a                                321

```

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 333

&lt;212&gt; ДНК



<213> Mus musculus

<400> 43

```

gacattgtgc tcaccaatc tccaacttct ttggctgtgt ctctagggca gagtgtcacc 60
atctcctgca gagccagtga aagtgttgaa tattatggca ctagttaa gacagtgtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcactatg gtgcatcaa cgtagaatct 180
ggggtccttg ccaggttttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240
cctgtggagg aggatgatat tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaggaa ggttccgtat 300
acgttcggat cggggaccaa gctggaaata aaa 333

```

<210> 44

<211> 238

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

```

Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu
1          5          10         15
Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val
          20         25         30
Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
          35         40         45
Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
          50         55         60
Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
65         70         75         80
Gly Ala Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
          85         90         95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
          100        105        110
Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
          115        120        125
Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
          130        135        140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145        150        155        160
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
          165        170        175
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
          180        185        190
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
          195        200        205
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210        215        220
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

```

123

94019

124

225                    230                    235  
 <210> 45  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 45  
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Ile Thr Ile Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20                    25                    30  
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35                    40                    45  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
 85                    90                    95  
 Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100                    105                    110  
 <210> 46  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 46  
 Met Ser Pro Val Gln Phe Leu Phe Leu Leu Met Leu Trp Ile Gln Glu  
 1                    5                    10                    15  
 Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val  
 20                    25                    30  
 Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu  
 35                    40                    45  
 Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro  
 50                    55                    60  
 Gly Gln Ala Pro Lys His Leu Met Tyr Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro  
 65                    70                    75                    80  
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr  
 85                    90                    95  
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys  
 100                    105                    110  
 Leu Gln Ser Thr Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu  
 115                    120                    125  
 Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

125

94019

126

130

135

140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu

145

150

155

160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn

165

170

175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser

180

185

190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala

195

200

205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

210

215

220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225

230

235

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 47

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

20

25

30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35

40

45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr

65

70

75

80

Glu Asp Met Gly Ile Asn Tyr Cys Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Pro

85

90

95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 48

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20

25

30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

127

94019

128

```

      35          40          45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
      65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
      85          90          95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100         105         110
<210> 49
<211> 234
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 49
Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
1          5          10          15
Gly Val Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
      20          25          30
Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
      35          40          45
Ile Asn Lys Asn Ile Val Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
      50          55          60
Arg Leu Leu Ile Trp Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
      65          70          75          80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
      85          90          95
Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
      100         105         110
Asn Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
      115         120         125
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
      130         135         140
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
      145         150         155         160
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
      165         170         175
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
      180         185         190
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
      195         200         205
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
      210         215         220

```

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Asn

20 25 30

Ile Ile Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Trp Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 51

<211> 239

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 51

Met Arg Phe Ser Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro

20 25 30

Val Thr Leu Gly Thr Ser Thr Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser

35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys

50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala

65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr

100 105 110

Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys

115 120 125

131

94019

132

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
 130 135 140  
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
 165 170 175  
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp  
 180 185 190  
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys  
 195 200 205  
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln  
 210 215 220  
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 52

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn  
 85 90 95  
 Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 53

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Ser Ile Ser Asn Phe  
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Pro Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Asn Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ile Trp Ser Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

<210> 54

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr  
 20 25 30  
 Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His  
 65 70 75 80  
 Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg  
 85 90 95  
 Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 55

<211> 333

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 55

cagatccagt tggagcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60  
 tcttgcaagg cttctgggta tattttcaga gactattcaa tgcactgggt gaagcaggct 120  
 ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacactg agacgggtga gccaacatat 180  
 gcagatgact tcaagggacg gtttgcttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240  
 ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtac tagcctttac 300  
 tggggccaag ggactctggt cactgtctct gca 333

<210> 56

<211> 372

&lt;212&gt; ДНК

<213> *Mus musculus*

&lt;400&gt; 56

```

cagggtcactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtcgt 60
acttggttctt tctctgggtt ttcactgagc acttatggta tgggtgtagg ttggattcgt 120
cagccttcag ggaagggctc ggagtggctg gccaacattt ggtggcatga tgataagtac 180
tataactcag cctgaagag cggctcaca atctccaagg atatctcaa caaccaggta 240
ttcctcaaga tctccagtgt ggacactgca gatactgcca catactactg tgctcaaata 300
gccctcgat ataataagta cgaaggcttt ttgtcttct ggggccaagg gactctggtc 360
actgtctctg ca 372

```

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 345

&lt;212&gt; ДНК

<213> *Mus musculus*

&lt;400&gt; 57

```

caggttcaac tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60
tctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca 120
cctgtgcatg gctaaaaatg gattggagct cttgatccta aaactggtga tactgcctac 180
agtcagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtac aagattctac 300
tctatactt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

```

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; ДНК

<213> *Mus musculus*

&lt;400&gt; 58

```

gaggtgcagc ttgttgagac tgggtggagga ctggtgcagc ctgaagggtc attgaaactc 60
tcatgtgcag cttctggatt cagcttcaat atcaatgcc tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggaaagg gtttggaatg ggttgctcgc ataagaagt aaagtaataa ttatgcaaca 180
tattatggcg attcagtga agacagggtc accatctcca gagatgattc acaaaacatg 240
ctctatctac aaatgaacaa cttgaaaact gaggacacag ccatatatta ctgtgtgaga 300
gaggtaaacta catcgtttgc ttattggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357

```

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 369

&lt;212&gt; ДНК

<213> *Mus musculus*

&lt;400&gt; 59

```

gaggtgcagc ttgttgagac tgggtggagga ttggtgcagc ctgaagggtc attgaaactc 60
tcatgtgcag cctctggatt caccctcaat gccagtcca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggaaagg gtttggaatg ggttgctcgc ataagaagta aaagtaataa ttatgcaata 180
tattatgccg attcagtga agacagggtc accatctcca gagatgattc acaaagcatg 240
ctctatctgc aaatgaacaa cttgaaaact gaggacacag ccatgtatta ctgtgtgaga 300

```



137

94019

138

gatccgggct actatggttaa cccctgggtt gcttactggg gccaaaggac tctgggcact 360  
gtctctgca 369

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 60

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
100 105 110

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 61

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr  
20 25 30

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

Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp His Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ile Ser Asn Asn Gln Val  
65 70 75 80

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

Cys Ala Gln Ile Ala Pro Arg Tyr Asn Lys Tyr Glu Gly Phe Phe Ala  
100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120

<210> 62  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 62  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Lys Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ala  
 115  
 <210> 63  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 63  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ile Asn  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Arg Ser Glu Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Gly Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Asn Met  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg Glu Val Thr Thr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

<210> 64  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 64  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ala Ser  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg Asp Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn Pro Trp Phe Ala Tyr  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

<210> 65  
 <211> 336  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus  
 <400> 65  
 gatgttgatga tgacccagac tccactcact ttgtcgggta cccttggaca accagcctcc 60  
 atctcttgca agtcaagtca gagcctctta catagtgatg gaaagacatt ttggaattgg 120  
 ttattacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaattc atctgggtgc tagactggac 180  
 tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240  
 agcagagtgg aggcctgagga ttggggagtt tattattgct gccaaaggta acatcttcct 300  
 cggacgttcg gtggaggcac caggctggaa atcaaa 336

<210> 66  
 <211> 336  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus  
 <400> 66  
 gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacacctt tttagaatgg 120  
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
 tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
 agcagagtgg aggcctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttcgc 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336  
 <210> 67  
 <211> 336  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus  
 <400> 67  
 gatgttgga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60  
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg 120  
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
 tctggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattctgct ctcaaaatac acatgttcct 300  
 cctacgttcg gatcggggac caagctggaa ataaaa 336  
 <210> 68  
 <211> 336  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus  
 <400> 68  
 gatattgtga tgactcagtc tgcacctct gtacctgtca ctcttgaga gtcagtatcc 60  
 atctcctgca agtctagtaa gactctctg catagtaatg gcaacactta cttgaattgg 120  
 ttctctgaga ggccaggcca gtctcctcaa ctctgattt attggatgtc caaccttgcc 180  
 tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 240  
 agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgta tgcaacatat agaataccct 300  
 ttcacgttcg gcacggggac aaaattggaa ataaaa 336  
 <210> 69  
 <211> 336  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus  
 <400> 69  
 gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc aatccagtc ctcttggaac atcagcttcc 60  
 atctcctgca ggtctagtaa gactctccta catagttatg acatcactta ttgtattgg 120  
 tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctctgattt atcagatgtc caaccttgcc 180  
 tcaggagtcc cagacagggt cagtgcagtc gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaacttcct 300  
 ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336  
 <210> 70  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus  
 <400> 70  
 caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ttccagggga gaaggtcacc 60  
 atgacctgca gtgccagtc aagtgttagt tacatgtact ggtaccagca gaagtcagga 120  
 tcctcccccga gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt cctgttcgc 180

145

94019

146

ttcagtggca gtgggtcttg gacctcttac tctctcaca tcagccgaat ggaggctgaa 240  
 gatgctgcc cttattactg ccagcagtg agtagttacc cgctcacgtt cggtggtggg 300  
 accgagctgg agctgaaa 318

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 71

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asp Gly Lys Thr Phe Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Cys Gln Gly  
 85 90 95  
 Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 72

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95  
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 73

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 74

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 75

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Tyr Asp Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn  
 85 90 95  
 Leu Glu Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 76

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Phe Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Leu Lys  
 100 105

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 345

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Н ланцюг химерного антитіла миша-людина

&lt;400&gt; 77

cagggtgcagc tgggtggagtc tggagctgag gtgaagaagc ctgggggctc agtgaaggtc 60  
 tcoctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggccttgagtg gatgggagct ottgatccta aaactgggtga tactgcoctac 180  
 agtcagaagt tcaagggcag agtcaagatt accgoggacg aatccacgag cacagocctac 240  
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagattctac 300  
 toctatactt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345

<210> 78

<211> 345

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Н ланцюг химерного антитіла миша-людина

<400> 78

caggtgcagc tggaggagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 toctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggccttgagtg gatgggagct ottgatccta aaactgggtga tactgcoctac 180  
 agtcagaagt tcaagggcag agtcaagctg accgoggacg aatccacgag cacagocctac 240  
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300  
 toctatactt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345

<210> 79

<211> 345

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Н ланцюг химерного антитіла миша-людина

<400> 79

caggtgcagc tggaggagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 toctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggccttgagtg gatgggagct ottgatccta aaactgggtga tactgcoctac 180  
 agtcagaagt tcaagggcag agtcaagctg accgoggaca aatccacgag cacagocctac 240  
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300  
 toctatactt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345

<210> 80

<211> 345

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Н ланцюг химерного антитіла миша-людина

<400> 80

caggtgcagc tggaggagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 toctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggccttgagtg gatgggagct ottgatccta aaactgggtga tactgcoctac 180  
 agtcagaagt tcaagggcag agtcaagctg accgoggaca aatccacgag cacagocctac 240  
 atggagctga gcagcctgac atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300



tcctatactt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345  
 <210> 81  
 <211> 345  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Н ланцюг химерного антитіла миша-людина  
 <400> 81  
 cagggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagt gatgggagct cttgatccta aaactgggtga tactgcctac 180  
 agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accggcgacg aatccacgag cacagcctac 240  
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300  
 tcctatactt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345  
 <210> 82  
 <211> 345  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Н ланцюг химерного антитіла миша-людина  
 <400> 82  
 cagggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagt gatgggagct cttgatccta aaactgggtga tactgcctac 180  
 agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accggcgaca aatccacgag cacagcctac 240  
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300  
 tcctatactt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345  
 <210> 83  
 <211> 345  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Н ланцюг химерного антитіла миша-людина  
 <400> 83  
 cagggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagt gatgggagct cttgatccta aaactgggtga tactgcctac 180  
 agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accggcgaca aatccacgag cacagcctac 240  
 atggagctga gcagcctgac atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300  
 tcctatactt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345  
 <210> 84  
 <211> 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Н ланцюг химерного антитіла миша-людина

&lt;400&gt; 84

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 85

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Н ланцюг химерного антитіла миша-людина

&lt;400&gt; 85

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Н ланцюг химерного антитіла миша-людина

&lt;400&gt; 86

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Н ланцюг химерного антитіла миша-людина

&lt;400&gt; 87

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                     85                    90                    95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
                     100                    105                    110

Val Ser Ser

115

<210> 88

<211> 115

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Н ланцюг химерного антитіла миша-людина

<400> 88

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100

105

110

Val Ser Ser

115

<210> 89

<211> 115

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Н ланцюг химерного антитіла миша-людина

<400> 89

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 90

<211> 115

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Н ланцюг химерного антитіла миша-людина

<400> 90

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 91

<211> 336

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> L ланцюг химерного антитіла миша-людина

<400> 91

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc 60  
 atctcctgca gatctagtca gaggcttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg 120

tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt 180  
 tctgggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgct ctcaaaatac acatgttctt 300  
 octacgtttg gccaggggac caagctggag atcaaa 336

<210> 92

<211> 112

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> L ланцюг химерного антитіла миша-людина

<400> 92

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 93

<211> 14

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 93

Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser  
 1 5 10

<210> 94

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 94

Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro  
 1 5

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

```

<213> homo sapiens
<400> 95
Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn
1          5
<210> 96
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 96
Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser
1          5
<210> 97
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 97
Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr
1          5          10
<210> 98
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 98
Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His
1          5          10
<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 99
Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu
1          5          10
<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 100
Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn
1          5          10
<210> 101
<211> 27
<212> PRT

```

<213> homo sapiens  
 <400> 101  
 Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe  
 1 5 10 15  
 His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys  
 20 25  
 <210> 102  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400> 102  
 Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys  
 1 5 10  
 <210> 103  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 103  
 Asn Tyr Ala Met Ser  
 1 5  
 <210> 104  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 104  
 Ala Ile Asn Asn Asn Gly Asp Asp Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val Lys  
 1 5 10 15  
 Asp  
 <210> 105  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 105  
 Gln Gly Gly Ala Tyr  
 1 5  
 <210> 106  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 106  
 Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly



1 5  
<210> 107  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 107  
Asn Ile Trp Trp Tyr Asp Ala Lys Tyr Tyr Asn Ser Asp Leu Lys Ser  
1 5 10 15  
<210> 108  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 108  
Met Gly Leu Ala Trp Phe Ala Tyr  
1 5  
<210> 109  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 109  
Ile Tyr Gly Met Gly Val Gly  
1 5  
<210> 110  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 110  
Asn Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
1 5 10 15  
<210> 111  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 111  
Ile Gly Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr  
1 5  
<210> 112  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 112  
Gly Tyr Trp Met His

171

94019

172

1 5  
<210> 113  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 113  
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15  
Gly  
  
<210> 114  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 114  
Ser Gly Asp Leu Thr Gly Gly Leu Ala Tyr  
1 5 10  
  
<210> 115  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 115  
Ser Tyr Ala Met Ser  
1 5  
  
<210> 116  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 116  
Ala Ile Asn Ser Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Lys  
1 5 10 15  
Asp  
  
<210> 117  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 117  
His Asn Gly Gly Tyr Glu Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10  
  
<210> 118  
<211> 5

173

94019

174

<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 118  
Ser Tyr Trp Met His  
1 5  
<210> 119  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 119  
Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe Arg  
1 5 10 15  
Gly  
  
<210> 120  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 120  
Ser Asn Leu Gly Asp Gly His Tyr Arg Phe Pro Ala Phe Pro Tyr  
1 5 10 15  
<210> 121  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 121  
Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Leu Gln Phe Lys  
1 5 10 15  
Asp  
  
<210> 122  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 122  
Gly Ala Phe Tyr Ser Ser Tyr Ser Tyr Trp Ala Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10 15  
<210> 123  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 123

175

94019

176

Asp Tyr Glu Met His

1 5

&lt;210&gt; 124

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 124

Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

&lt;210&gt; 125

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 125

Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr

1 5

&lt;210&gt; 126

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 126

Ile Asn Ala Met Asn

1 5

&lt;210&gt; 127

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 127

Arg Ile Arg Ser Glu Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Asp

&lt;210&gt; 128

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 128

Glu Val Thr Thr Ser Phe Ala Tyr

1 5

&lt;210&gt; 129

177

94019

178

<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 129  
Ala Ser Ala Met Asn  
1 5  
<210> 130  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 130  
Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser  
1 5 10 15  
Val Lys Asp  
  
<210> 131  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 131  
Asp Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn Pro Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10  
<210> 132  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 132  
Asp Tyr Ser Met His  
1 5  
<210> 133  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 133  
Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys  
1 5 10 15  
Gly  
  
<210> 134  
<211> 2  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 134  
 Leu Tyr  
 1  
 <210> 135  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 135  
 Asn Ile Trp Trp His Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
 1 5 10 15  
 <210> 136  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 136  
 Ile Ala Pro Arg Tyr Asn Lys Tyr Glu Gly Phe Phe Ala Phe  
 1 5 10  
 <210> 137  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 137  
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn  
 1 5 10 15  
 <210> 138  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 138  
 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser  
 1 5  
 <210> 139  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 139  
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Leu Thr  
 1 5  
 <210> 140  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

181

94019

182

&lt;400&gt; 140

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Ser

1 5 10

&lt;210&gt; 141

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 141

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp

1 5

&lt;210&gt; 142

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 142

Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Pro Trp Thr

1 5 10

&lt;210&gt; 143

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 143

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

&lt;210&gt; 144

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 144

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

&lt;210&gt; 145

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 145

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

&lt;210&gt; 146

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

<400> 146  
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr  
1 5 10 15  
<210> 147  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 147  
Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5  
<210> 148  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 148  
Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr  
1 5  
<210> 149  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 149  
Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Asn Ile Ile  
1 5 10  
<210> 150  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 150  
Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro  
1 5  
<210> 151  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 151  
Leu Gln Tyr Asp Asn Leu  
1 5  
<210> 152  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus



<400> 152  
Arg Ala Ser His Ser Ile Ser Asn Phe Leu His  
1 5 10  
<210> 153  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 153  
Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
1 5  
<210> 154  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 154  
Gln Gln Ser Asn Ile Trp Ser Leu Thr  
1 5  
<210> 155  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 155  
Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Met Gln  
1 5 10 15  
<210> 156  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 156  
Gly Ala Ser Asn Val Glu Ser  
1 5  
<210> 157  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 157  
Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr  
1 5  
<210> 158  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 158  
Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr  
1 5  
<210> 159  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 159  
Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn  
1 5 10 15  
<210> 160  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 160  
Trp Met Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5  
<210> 161  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 161  
Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr  
1 5  
<210> 162  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 162  
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Tyr Asp Ile Thr Tyr Leu Tyr  
1 5 10 15  
<210> 163  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 163  
Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Pro Thr  
1 5  
<210> 164  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

189

94019

190

<400> 164  
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr  
1 5 10  
<210> 165  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 165  
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5  
<210> 166  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 166  
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5  
<210> 167  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 167  
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Phe Leu Asn  
1 5 10 15  
<210> 168  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 168  
Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser  
1 5  
<210> 169  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 169  
Cys Gln Gly Thr His Phe  
1 5  
<210> 170  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 170

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

<210> 171

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 171

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr  
1 5

<210> 172

<211> 27

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер ПЛР

<400> 172

cttgtagaca gtgacggaaa cacctat

27

<210> 173

<211> 27

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер ПЛР

<400> 173

ataggtgttt cagtcactgt gtacaag

27

<210> 174

<211> 16

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> L ланцюг мутантного антитіла

<400> 174

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Ala Asn Thr Tyr Leu His  
1 5 10 15

<210> 175

<211> 16

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> L ланцюг мутантного антитіла

<400> 175

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Asp Asn Thr Tyr Leu His  
 1                      5                      10                      15  
 <210> 176  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> L ланцюг мутантного антитіла  
 <400> 176

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His  
 1                      5                      10                      15  
 <210> 177  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> L ланцюг мутантного антитіла  
 <400> 177

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Phe Asn Thr Tyr Leu His  
 1                      5                      10                      15  
 <210> 178  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> L ланцюг мутантного антитіла  
 <400> 178

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn His Asn Thr Tyr Leu His  
 1                      5                      10                      15  
 <210> 179  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> L ланцюг мутантного антитіла  
 <400> 179

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Asn Asn Thr Tyr Leu His  
 1                      5                      10                      15  
 <210> 180  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

195

94019

196

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 180

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 181

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 181

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 182

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 182

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Ile Asn Thr Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 His

&lt;210&gt; 183

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 183

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Lys Asn Thr Tyr Leu His  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 184

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 184

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Leu Asn Thr Tyr Leu His

|     |       |     |
|-----|-------|-----|
| 197 | 94019 | 198 |
|-----|-------|-----|

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

<210> 185  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> L ланцюг мутантного антитіла  
 <400> 185

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Ser Asn Thr Tyr Leu His  
 1 5 10 15

<210> 186  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> L ланцюг мутантного антитіла  
 <400> 186

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Trp Asn Thr Tyr Leu His  
 1 5 10 15

<210> 187  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> L ланцюг мутантного антитіла  
 <400> 187

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Tyr Asn Thr Tyr Leu His  
 1 5 10 15

<210> 188  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> L ланцюг мутантного антитіла  
 <400> 188

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His  
 1 5 10 15

<210> 189  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>

<223> L ланцюг мутантного антитіла

<400> 189

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 190

<211> 16

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> L ланцюг мутантного антитіла

<400> 190

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Pro Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 191

<211> 112

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> L ланцюг мутантного антитіла

<400> 191

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asn Ala Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn

85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 192

<211> 112

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> L ланцюг мутантного антитіла

<400> 192

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly



1                    5                    10                    15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30  
 Asn Asp Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
                   85                    90                    95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

&lt;210&gt; 193

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 193

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30  
 Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
                   85                    90                    95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

&lt;210&gt; 194

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 194

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

203

94019

204

1                    5                    10                    15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30  
 Asn Phe Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
                   85                    90                    95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

&lt;210&gt; 195

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 195

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30  
 Asn His Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
                   85                    90                    95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

&lt;210&gt; 196

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 196

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

205

94019

206

1                    5                    10                    15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30  
 Asn Asn Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
                   85                    90                    95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

&lt;210&gt; 197

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 197

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30  
 Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
                   85                    90                    95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

&lt;210&gt; 198

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 198

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

```

1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
           85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110

```

&lt;210&gt; 199

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 199

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Asn Ile Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
           85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110

```

&lt;210&gt; 200

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 200

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

```

209

94019

210

```

1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
          20           25           30
Asn Lys Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
          65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
          85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

```

&lt;210&gt; 201

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 201

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
          20           25           30
Asn Leu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
          65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
          85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

```

&lt;210&gt; 202

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 202

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

```

211

94019

212

```

1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Asn Ser Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
           85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110

```

&lt;210&gt; 203

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 203

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Asn Trp Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
           85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110

```

&lt;210&gt; 204

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 204

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

```

213

94019

214

1                    5                    10                    15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30  
 Asn Tyr Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
                   85                    90                    95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

&lt;210&gt; 205

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 205

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30  
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
                   85                    90                    95  
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

&lt;210&gt; 206

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

&lt;400&gt; 206

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

215

94019

216

```

1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Asn Val Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
           85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110

```

&lt;210&gt; 207

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L ланцюг мутантного антитіла

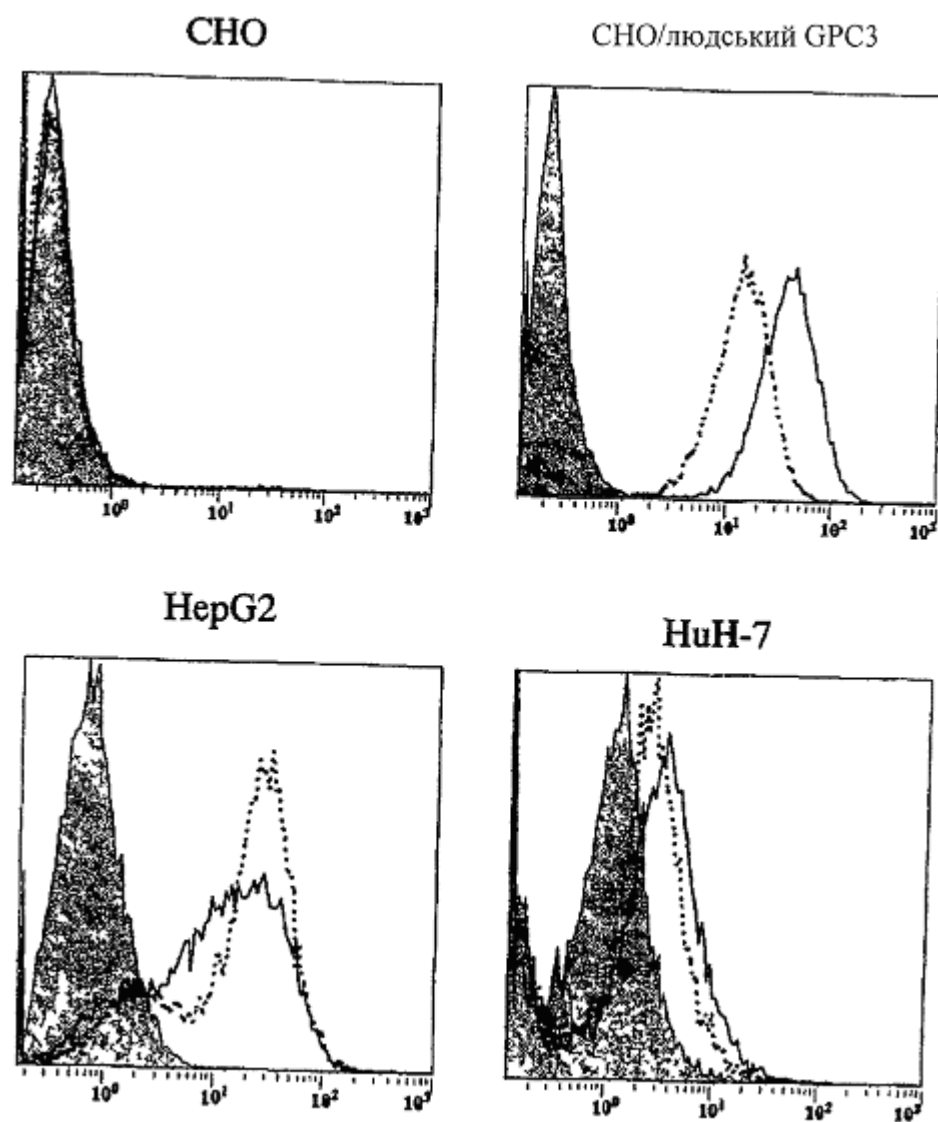
&lt;400&gt; 207

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Asn Pro Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
           85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110

```

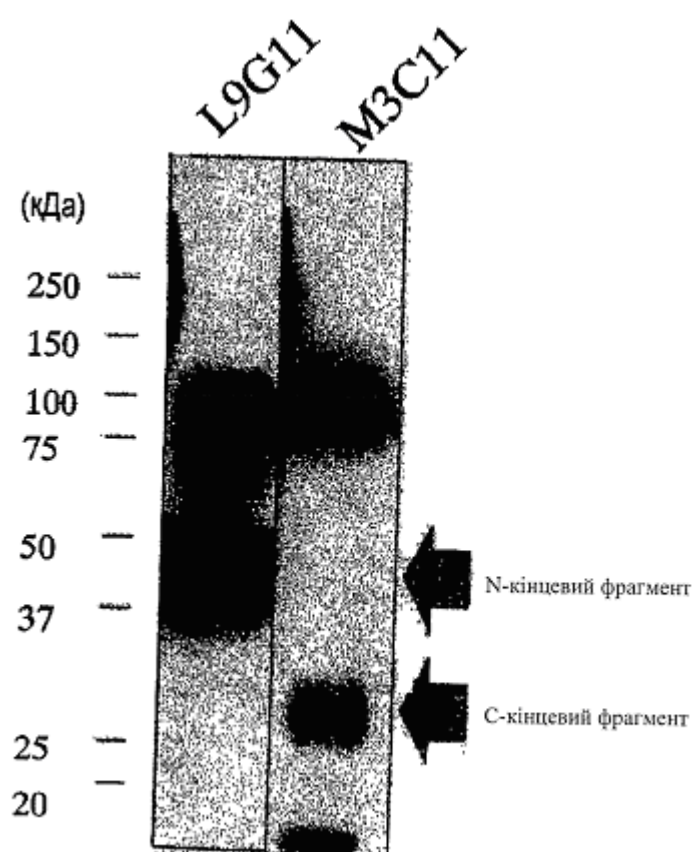




Фіг. 1

| Mab    | Інгібування зв'язування вказаного біотин-Mab з коровим білком SGPC3 (%) |             |             |             |             |             |             |             | Топографічний епітоп |
|--------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|
|        | M3C11   | M1E7        | M11F1       | M6B1        | M18D4       | M5B9        | M10D2       | L9G11       |                      |
| M3C11  | <u>96.8</u>   | <u>96.2</u> | 12.0        | 11.2        | 10.3        | 9.1         | 39.9        | 33.1        | a                    |
| M13B3  | <u>71.3</u>   | <u>95.7</u> | 15.6        | 9.3         | 2.7         | -1.8        | 22.3        | 24.9        |                      |
| M1E7   | 26.0  | <u>83.2</u> | 14.3        | 7.7         | 9.0         | 6.4         | 14.8        | 38.0        |                      |
| M3B8   | 1.8   | 28.4        | <u>97.4</u> | 15.2        | 12.6        | 3.6         | 29.0        | 36.0        | b                    |
| M11F1  | 2.0   | 3.9         | <u>81.8</u> | 5.6         | -1.5        | 5.4         | 24.6        | 20.9        |                      |
| M19B11 | -4.1  | -9.4        | 3.1         | <u>87.6</u> | 44.1        | 31.0        | 14.2        | -9.8        | c                    |
| M6B1   | -5.7  | -2.7        | 13.9        | <u>85.6</u> | <u>51.9</u> | 44.4        | 6.7         | 1.1         |                      |
| M18D4  | 0.2   | 0.5         | -0.3        | 38.6        | <u>89.0</u> | <u>89.4</u> | 19.1        | 6.7         |                      |
| M5B9   | 0.1   | 2.7         | 5.3         | 23.2        | <u>77.3</u> | <u>77.3</u> | 13.4        | 10.3        |                      |
| M10D2  | -7.7  | 0.6         | 7.8         | -5.9        | -21.6       | -10.3       | <u>79.2</u> | 7.2         | d                    |
| L9G11  | 2.1   | -4.8        | 6.0         | 10.1        | 15.7        | 6.4         | 1.2         | <u>92.2</u> | e                    |

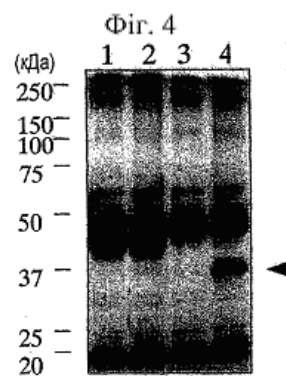
Фіг. 2



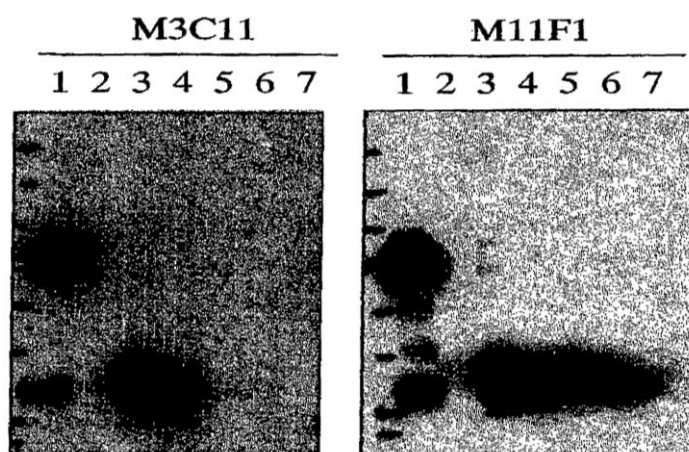
Фіг. 3



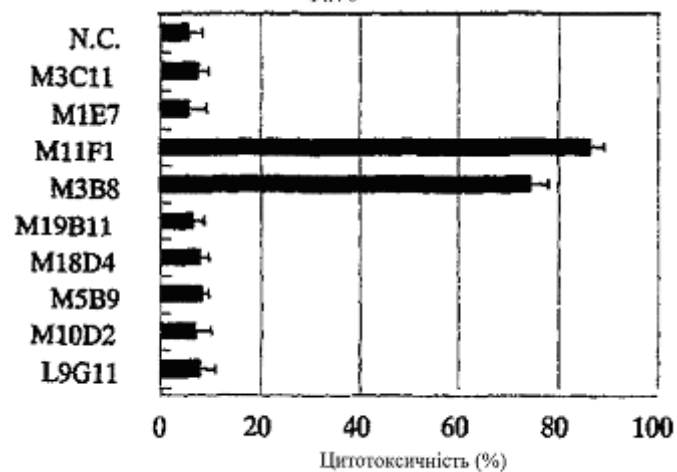
Фіг. 4



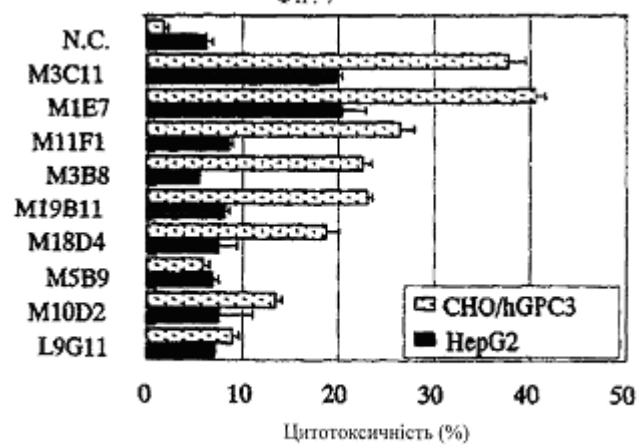
Фіг. 5



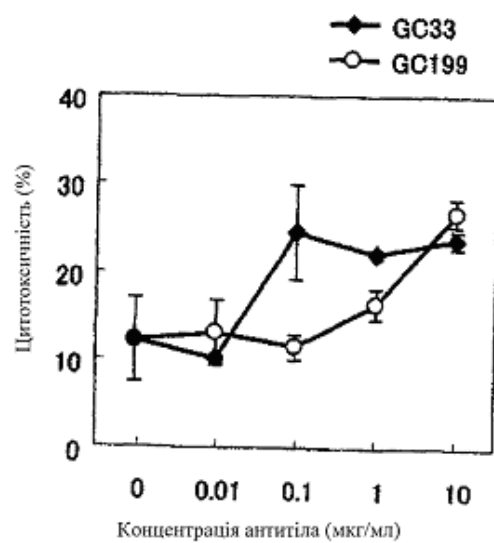
Фиг. 6



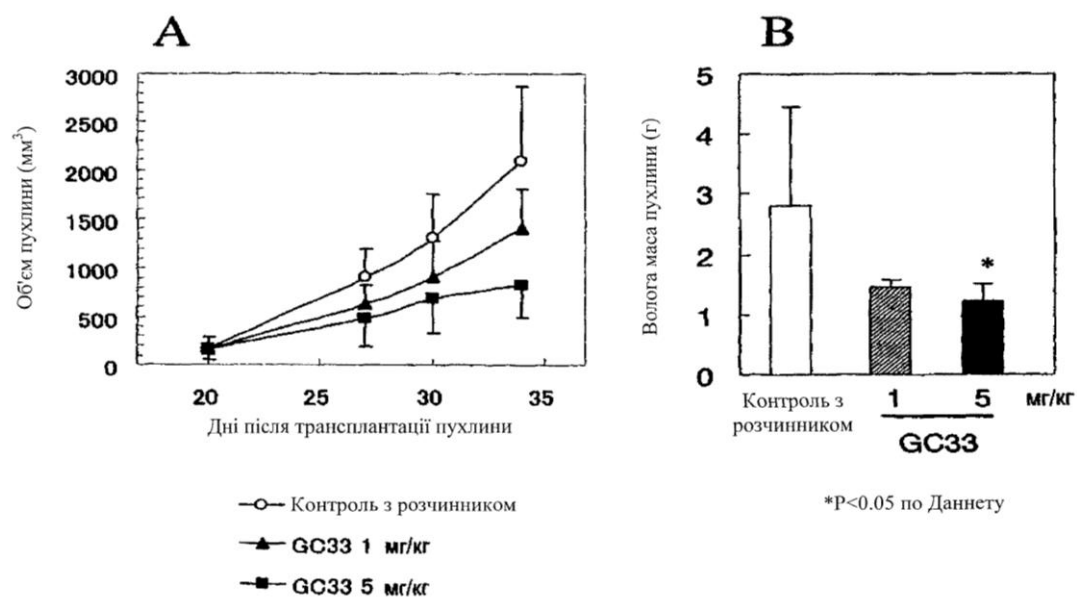
Фиг. 7



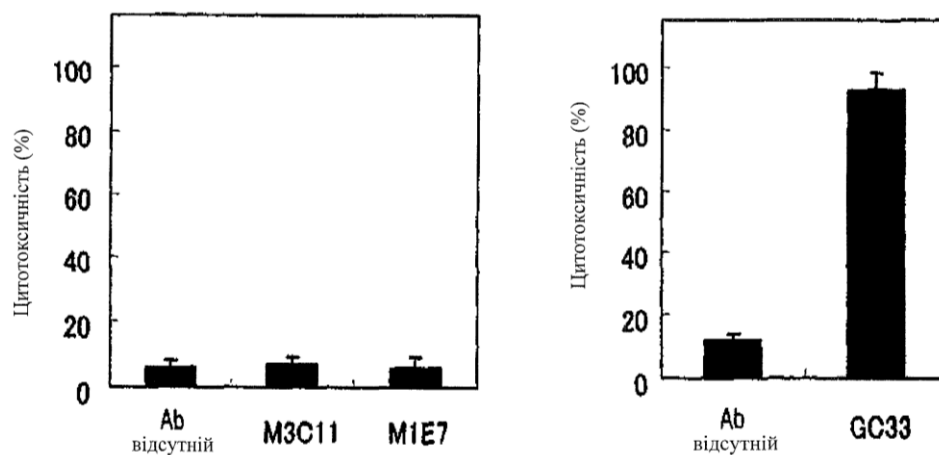
Фиг. 8



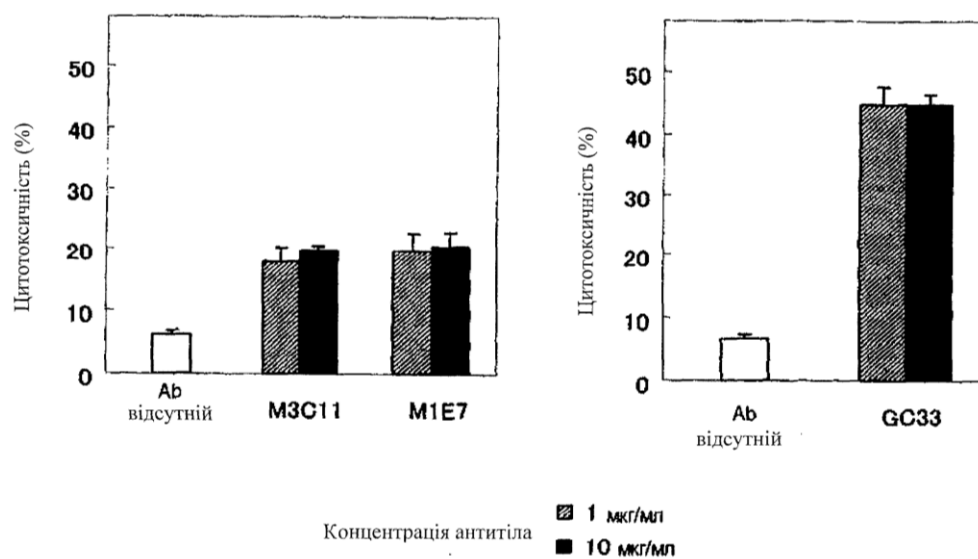
Фіг. 9



Фіг. 10



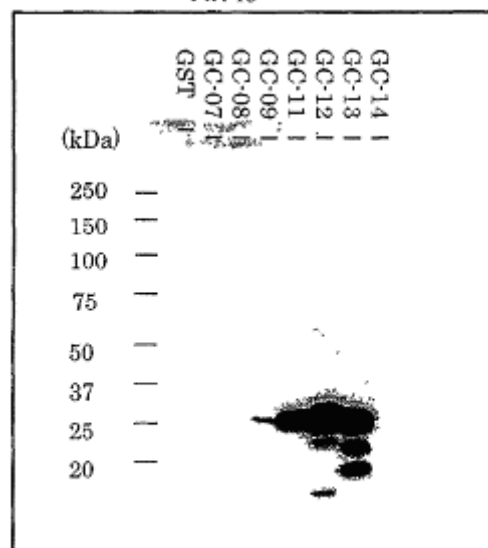
Фіг. 11



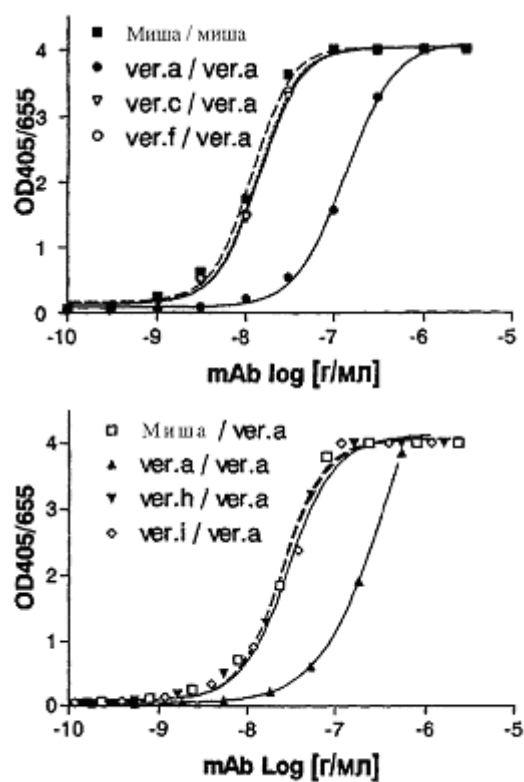
Фіг. 12

|       | GC33 |
|-------|------|
| GC-4  | WB   |
| GC-5  | ○    |
| GC-6  | ×    |
| GC-7  | ×    |
| GC-8  | ×    |
| GC-9  | ×    |
| GC-11 | ×    |
| GC-12 | ○    |
| GC-13 | ○    |
| GC-14 | ×    |

Фіг. 13



Фіг. 14



Фиг. 15

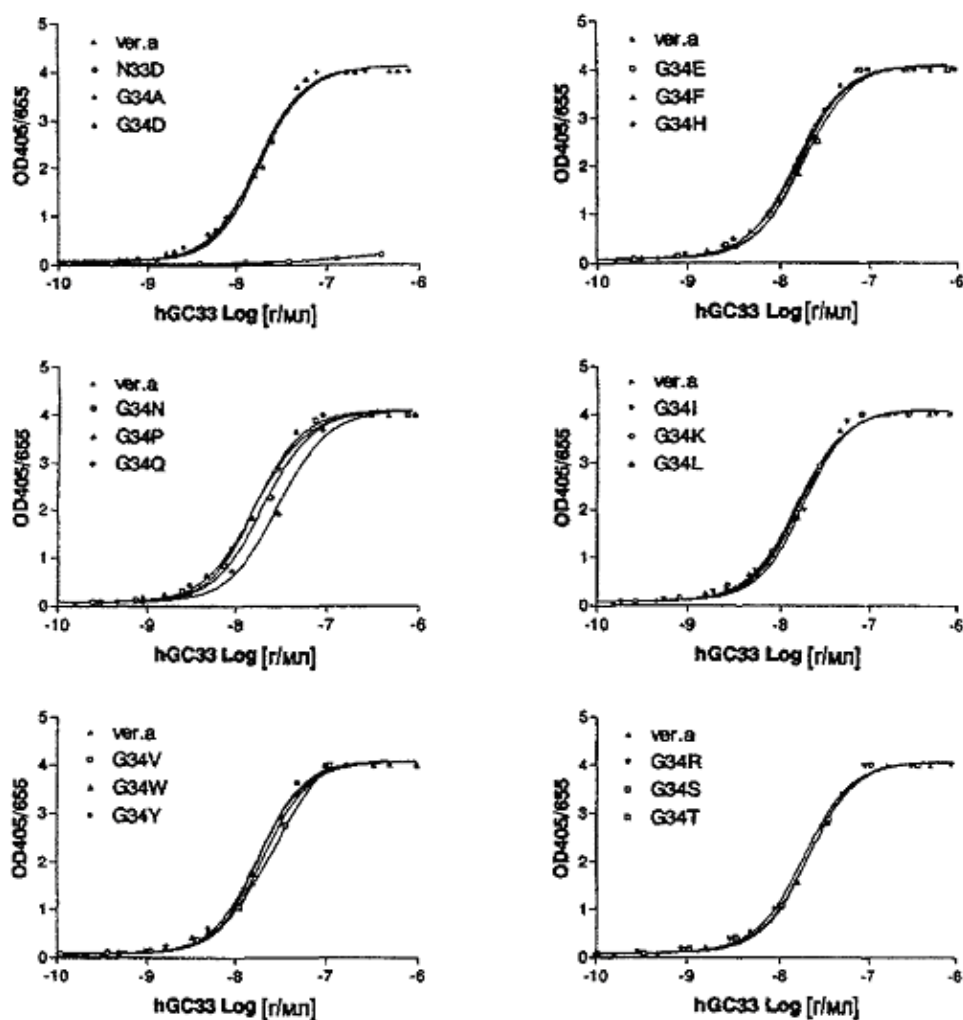
| Ідентифікуючий код клону | Ізотип | ELISA                 | BIACORE                     |                             |         | ЕПІТОП             |                 | FACS              |       |       |     | Імуно-преципітація |
|--------------------------|--------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|--------------------|-----------------|-------------------|-------|-------|-----|--------------------|
|                          |        | EC <sub>50</sub> (нМ) | ka (1/мс/ 10 <sup>5</sup> ) | kd (1/с x 10 <sup>5</sup> ) | KD (нМ) | Конкурентний ELISA | Вестерн-блотинг | CHO/ людськ. GPC3 | НepG2 | HuH-7 | CHO |                    |
| M3C11                    | IgG1   | 0.12                  | 2.5                         | 6.5                         | 0.3     | a                  | GC-2            | 83                | 59    | 9     | -   | Δ                  |
| M13B3                    | IgG1   | 0.25                  | N.D.                        | N.D.                        | N.D.    |                    |                 | N.D.              | N.D.  | N.D.  | -   | N.D.               |
| M1E7                     | IgG1   | 0.96                  | 1.5                         | 42.7                        | 2.8     |                    |                 | 28                | 16    | 5     | -   | x                  |
| M3B8                     | IgG1   | 0.56                  | 2.7                         | 467.0                       | 17.6    | b                  | GC-4            | 12                | 6     | 3     | -   | x                  |
| M11F1                    | IgG2b  | 2.17                  | 1.4                         | 3.5                         | 0.2     |                    |                 | 9                 | 4     | 2     | -   | x                  |
| L9G11                    | IgG1   | 0.62                  | 1.3                         | 140.0                       | 10.7    | c                  | N               | 29                | 26    | 4     | -   | ○                  |
| M19B11                   | IgG1   | 0.18                  | 1.5                         | 17.1                        | 1.1     | c                  |                 | 39                | 44    | 3     | -   | ○                  |
| M6B1                     | IgG1   | 5.51                  | N.D.                        | N.D.                        | N.D.    |                    |                 | 37                | 34    | 3     | -   | ○                  |
| M18D4                    | IgG1   | 0.85                  | 0.8                         | 49.6                        | 6.2     |                    |                 | 22                | 20    | 2     | -   | ○                  |
| M5B9                     | IgG1   | 1.13                  | 0.6                         | 139.0                       | 23.5    |                    |                 | 25                | 23    | 2     | -   | ○                  |
| M10D2                    | IgG1   | 1.04                  | 1.1                         | 49.6                        | 4.7     | d                  |                 | 20                | 29    | 3     | -   | ○                  |

Фиг. 16



| Ідентифікуючий код клону | Ізотип | ELISA                 | ЕПІТОП             |                 | FACS             |       |       |     |
|--------------------------|--------|-----------------------|--------------------|-----------------|------------------|-------|-------|-----|
|                          |        | EC <sub>50</sub> (нМ) | Конкурентний ELISA | Вестерн-блотинг | CHO/людськ. GPC3 | HepG2 | HuH-7 | CHO |
| GC199                    | IgG1   | 0.10                  | b                  | GC-4            | 15.5             | 12.2  | 2.4   | -   |
| GC202                    | IgG1   | 0.10                  |                    |                 | 6.0              | 0.9   | 1.4   | -   |
| GC33                     | IgG2a  | 0.24                  |                    |                 | 82.7             | 52.0  | 8.4   | -   |
| GC179                    | IgG2b  | 5.61                  | f                  | GC-3            | 7.1              | 6.5   | 3.8   | -   |
| GC194                    | IgG1   | 3.83                  |                    |                 | 5.0              | 7.9   | 1.5   | -   |

Фиг. 17



Фиг. 18

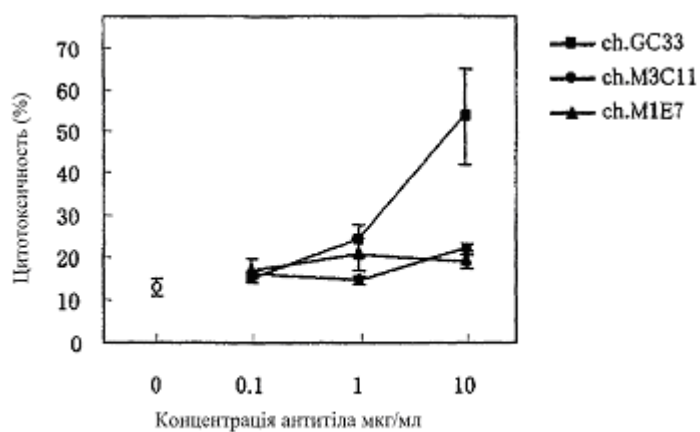


Fig. 19

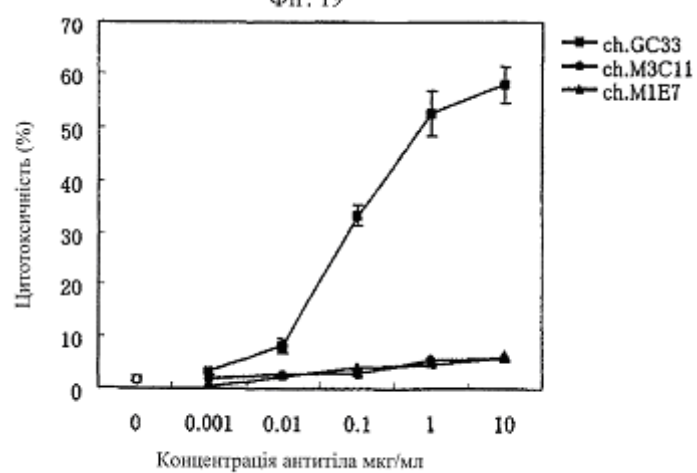


Fig. 20