



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95438 (13) C2  
(51) МПК

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) БІСПЕЦИФІЧНІ АНТИТІЛА, ЩО ЗАМІЩУЮТЬ ФУНКЦІОНАЛЬНІ БІЛКИ

1

2

(21) а200604899

(22) 08.10.2004

(24) 10.08.2011

(86) PCT/JP2004/014911, 08.10.2004

(31) PCT/JP2003/013062

(32) 10.10.2003

(33) JP

(31) PCT/JP2003/013123

(32) 14.10.2003

(33) JP

(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.

(72) ХАТТОРИ КУНІХІРО, JP, КОДЖИМА ТЕЦУО,  
JP, МІЙАЗАКИ ТАРО, JP, СОЄДА ТЕЦУХІРО, JP

(73) ЧУГЕЙ СЕЙЯКУ КАБУСІКІ КАЙСЯ, JP

(56) LU D. ET AL.: 'Fab-scFv fusion protein: an efficient approach to production of bispecific antibody fragments' J. IMMUNOL. METHODS vol. 267, no. 2, 2002, abstract

LU D. ET AL.: 'Di-antibody: a novel tetravalent bispecific antibody molecule by design' J. IMMUNOL. METHODS vol. 279, no. 1-2, August 2003, abstract

FRANCOIS C. ET AL.: 'Construction of a bispecific antibody reacting with the alpha- and beta-chains of the human IL-2 receptor' J. IMMUNOL. METHODS vol. 150, no. 10, 1993, abstract

CARTER P.: 'Bispecific human IgG by design' J. IMMUNOL. METHODS vol. 248, no. 1-2, 2001, abstract

JP 5501543, 25.03.1993, abstract

JP 5203652, 10.08.1993, abstract

(57) 1. Біспецифічне антитіло, яке специфічно зв'язується з активованим фактором згортання крові ІХа та фактором згортання крові Х, однак не нейтралізує їх активності, яке містить гіперваріабельні ділянки (CDR), що включають:

(А) амінокислотні послідовності гіперваріабельних ділянок (CDR) Н-ланцюга антитіла до фактора згортання крові ІХа одного з наступних (a1) - (a3) та гіперваріабельних ділянок (CDR) L-ланцюга наступного (b1) або (b2) та

(В) амінокислотні послідовності гіперваріабельних ділянок (CDR) Н-ланцюга антитіла до фактора згортання крові Х одного з наступних (c1) - (c10) та

гіперваріабельних ділянок (CDR) L-ланцюга наступного (d1) або (d2):

(a1) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 14, 15 та 16, відповідно;

(a2) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 18, 19 та 20, відповідно;

(a3) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 86, 87 та 88, відповідно;

(b1) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 L-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 206, 207 та 208, відповідно;

(b2) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 L-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 214, 215 та 216, відповідно;

(c1) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 22, 23 та 24, відповідно;

(c2) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 26, 27 та 28, відповідно;

(c3) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 30, 31 та 32, відповідно;

(c4) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 34, 35 та 36, відповідно;

(c5) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 38, 39 та 40, відповідно;

(c6) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 42, 43 та 44, відповідно;

(c7) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 46, 47 та 48, відповідно;

(c8) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 50, 51 та 52, відповідно;

(c9) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 54, 55 та 56, відповідно;

(13) C2

(11) 95438

(19) UA

(с10) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 162, 163 та 164, відповідно;

(d1) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 L-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 210, 211 та 212, відповідно;

(d2) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 L-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 218, 219 та 220, відповідно;

при цьому антитіло має активність фактора згортання крові VIII та/або активованого фактора згортання крові VIII.

2. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що містить:

(а) варіабельну ділянку антитіла до фактора згортання крові IXa, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13, 17, 85, 205 або 213, та

(b) варіабельну ділянку антитіла до фактора згортання крові X, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 161, 209 або 217.

3. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що містить варіабельні домени Н-ланцюга та L-ланцюга щодо фактора згортання крові IXa, які містять сукупність з шести послідовностей CDR, вибрану з вказаних нижче (a1) та (a2), та варіабельні домени Н-ланцюга та L-ланцюга щодо фактора згортання крові X, які містять сукупність з шести послідовностей CDR, вибрану з вказаних нижче (b1) та (b2):

(a1) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 14, 15 та 16, відповідно, та амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 L-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 214, 215 та 216, відповідно;

(a2) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 86, 87 та 88, відповідно, та амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 L-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 206, 207 та 208, відповідно;

(b1) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 22, 23 та 24, відповідно, та амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 L-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 218, 219 та 220, відповідно;

(b2) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 162, 163 та 164, відповідно, та амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 L-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 210, 211 та 212, відповідно.

4. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що містить:

(А) варіабельні домени Н-ланцюга та L-ланцюга антитіла до фактора згортання крові IXa, які містять сукупність з шести послідовностей CDR, вибрану з (i) та (ii):

(i) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 14, 15 та 16, відповідно, та амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 L-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 214, 215 та 216, відповідно;

(ii) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 86, 87 та 88, відповідно, та амінокислотні послідовно-

сті CDR 1, 2 та 3 L-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 206, 207 та 208, відповідно, та (В) варіабельні домени антитіла до фактора згортання крові X, які містять амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 161, 209 або 217.

5. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що містить:

(А) варіабельні домени антитіла до фактора згортання крові IXa, які містять амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13, 17, 85, 205 або 213, та

(В) варіабельні домени Н-ланцюга та L-ланцюга антитіла до фактора згортання крові X, які містять сукупність з шести послідовностей CDR, вибрану з (i) та (ii):

(i) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 22, 23 та 24, відповідно, та амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 L-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 218, 219 та 220, відповідно;

(ii) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 162, 163 та 164, відповідно, та амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 L-ланцюга, описані у послідовностях SEQ ID NO: 210, 211 та 212, відповідно.

6. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що містить варіабельний домен антитіла до фактора згортання крові IXa, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13, 17, 85, 205 або 213.

7. Біспецифічне антитіло, яке специфічно зв'язується з активованим фактором згортання крові IXa та фактором згортання крові X, однак не нейтралізує їх активності, причому епітопами, з якими воно зв'язується, є ті ж самі епітопи, з якими зв'язується антитіло у відповідності з будь-яким з пп. 1-6.

8. Композиція, яка містить антитіло у відповідності з п. 1 або п. 7 та фармацевтично прийнятний носій.

9. Композиція за п. 8, де згадана композиція - це фармацевтична композиція для профілактики та/або лікування кровотечі, розладу, що супроводжується кровотечею, або розладу, що спричиняється кровотечею.

10. Композиція за п. 9, яка **відрізняється** тим, що кровотеча, розлад, що супроводжується кровотечею, або розлад, що спричиняється кровотечею, - це розлад, який виникає та/або прогресує внаслідок зменшення або дефіциту активності фактора згортання крові VIII та/або активованого фактора згортання крові VIII.

11. Композиція за п. 10, яка **відрізняється** тим, що згаданий розлад, який виникає та/або прогресує внаслідок зменшення або дефіциту активності фактора згортання крові VIII та/або активованого фактора згортання крові VIII, - це гемофілія А.

12. Композиція за п. 10, яка відрізняється тим, що згаданий розлад, який виникає та/або прогресує внаслідок зменшення або дефіциту активності фактора згортання крові VIII та/або активованого фактора згортання крові VIII, - це розлад, при якому генерується інгібітор фактора згортання крові VIII та/або активованого фактора згортання крові VIII.

13. Композиція за п. 10, яка **відрізняється** тим, що згаданий розлад, який виникає та/або прогресує внаслідок зменшення або дефіциту активності фактора згортання крові VIII та/або активованого фактора згортання крові VIII, - це набута гемофілія.

14. Композиція за п. 10, яка **відрізняється** тим, що згаданий розлад, який виникає та/або прогресує внаслідок зменшення або дефіциту активності фактора згортання крові VIII та/або активованого фактора згортання крові VIII, - це ангіогемофілія.

15. Спосіб профілактики та/або лікування кровотечі, розладу, що супроводжується кровотечею, або розладу, що спричиняється кровотечею, де згаданий спосіб включає етап введення антитіла у відповідності з п. 1 або п. 7 або композиції у відповідності з будь-яким з пп. 8-14.

16. Застосування антитіла у відповідності з п. 1 для приготування композиції для профілактики та/або лікування кровотечі або розладу, що супроводжується кровотечею, або розладу, що спричиняється кровотечею.

17. Застосування антитіла у відповідності з п. 7 для приготування композиції для профілактики

та/або лікування кровотечі або розладу, що супроводжується кровотечею, або розладу, що спричиняється кровотечею.

18. Набір, що використовується у способі профілактики та/або лікування розладів у відповідності з п. 15, де згаданий набір містить принаймні антитіло у відповідності з п. 1 або п. 7 або композицію у відповідності з п. 8.

19. Спосіб профілактики та/або лікування кровотечі, розладу, що супроводжується кровотечею, або розладу, що спричиняється кровотечею, де згаданий спосіб включає етап введення антитіла у відповідності з п. 1 або п. 7 або композиції у відповідності з будь-яким з пп. 8-14 у комбінації з фактором згортання крові VIII.

20. Набір, що використовується у способі профілактики та/або лікування кровотечі, розладу, що супроводжується кровотечею, або розладу, що спричиняється кровотечею, у відповідності з п. 19, де згаданий набір містить принаймні антитіло у відповідності з п. 1 або п. 7 або композицію за п. 8, а також фактор згортання крові VIII.

Цей винахід стосується біспецифічних антитіл, які функціонально заміщують кофактори, які підсилюють ферментативну реакцію, та фармацевтичних композицій, які містять антитіло як активний інгредієнт.

Попередній рівень техніки

Антитіла привернули багато уваги як ліки завдяки їх високій стійкості у крові та низькій антигенності. Серед них є біспецифічні антитіла, які можуть одночасно розпізнавати два типи антигенів. Біспецифічні антитіла були запропоновані деякий час тому; проте, повідомлялося лише про антитіла, які просто з'єднують два типи антигенів, такі, які спроможні перенацілювати природні клітини-кілери (НК-клітини), макрофаги та Т-клітини (дивись непатентний документ 7). Наприклад, MDX-210, що у цей час проходить клінічні дослідження, є біспецифічним антитілом, яке просто перенацілює моноцити, що експресують FcγRI, і таким чином до ракових клітин, які експресують HER-2/neu. Отже, досі не існує прикладу застосування біспецифічного антитіла як альтернативного засобу функціонального заміщення кофактору, який підсилює ферментативну реакцію.

Прикладами кофакторів є фактор тканини (TF), фактор згортання крові V (F.V.), активований фактор згортання крові V (F.Va.), фактор згортання крові VIII (F.VIII), активований фактор згортання крові VIII (F.VIIIa), тромбомодулін (TM), білок S (PS), білок Z (PZ), гепарин, фрагмент C4b комплексу, регуляторний фактор .H комплексу, мембранний білок-кофактор (MCP) та рецептор 1 (CR1) комплексу.

З вище переліченого F.VIII/F.VIIIa є кофактором, необхідним для експресії достатньої активності активованого фактора згортання крові IX (F.IXa). F. Scheifflinger зі співавторами визначили, що певне антитіло до F.IX/F.IXa діє, сприяючи ак-

тивації фактора згортання крові X (F.X) завдяки F.IXa у хромогенному аналізі (патентами Документ 1). Однак, під час аналізу, у якому досліджували спроможність до відновлення згортання у плазмі, позбавленій F.VIII, спроможність до відновлення згортання спостерігали тільки, коли ззовні додавали F.IXa, а не тоді, коли застосовували лише це антитіло.

Відомо, що F.VIIIa взаємодіє не тільки з F.IXa, але також з F.X (дивись непатентні документи 5 та 6). Стосовно цього не можна сказати, що антитіло F. Scheifflinger'a зі співавторами суттєво заміщує функцію F.VIII/F.VIIIa, а також здається, що його активність є недостатньою.

Завдяки навмисному спрямованому дослідженню авторам цього винаходу вдалося отримати біспецифічні антитіла, які функціонально заміщують кофактори, які підсилюють ферментативну активність, та тим самим виконали цей винахід.

Патентний документ 1: WO 01/19992.

Патентний документ 2: патент США № 4,474,893.

Патентний документ 3: EP 404,097.

Патентний документ 4: WO 93/11161.

Патентний документ 5: японська патентна заявка № 2002-112369.

Патентний документ 6: японська патентна заявка № 2003-012648.

Патентний документ 7: викладена японська патентна заявка № (JP-A) H5-304992 (опублікована японська патентна заявка, яка не пройшла експертизу).

Патентний документ 8: JP-A H2-145187.

Патентний документ 9: JP-A H5-213775.

Патентний документ 10: JP-A H10-165184.

Патентний документ 11: JP-A H1-71288.

Патентний документ 12: JP-A 2002-518041.

Патентний документ 13: JP-A H1-506310.

Патентний документ 14: JP-A H5-199894.  
 Патентний документ 15: JP-A H10-511085.  
 Патентний документ 16: JP-A H5-184383.  
 Непатентний документ 1: Nilsson IM et al., "J. Intern. Med." 1992, Vol.235, p.25-32.  
 Непатентний документ 2: Löfqvist T et al. "J. Intern. Med." 1997, Vol.241, p.395-400.  
 Непатентний документ 3: 24<sup>th</sup> Meeting of The Japanese Society on Thrombosis and Hematosis, Special Committee on Examining Hemophilia Standardization, Mini-symposium, 2001, <http://www.jsth.org>.  
 Непатентний документ 4: Medical Bulletin #193 1994.  
 Непатентний документ 5: Mertens K et al., "Thromb. Haemost." 1999, Vol.82, p.209-217.  
 Непатентний документ 6: Lapan KA et al., "Thromb. Haemost." 1998, Vol.80, p.418-422.  
 Непатентний документ 7: Segal DM et al., "Journal of Immunological Methods" 2001, Vol.248, p. 1-6.  
 Непатентний документ 8: Bos R and Nieuwenhuizen W, "Hybridoma" 1992, Vol.11, No.1, p.41-51.  
 Непатентний документ 9: Brennan M et al., "Science" 1985, Vol.229, No. 1708, p.81-3.  
 Непатентний документ 10: Karpovsky B et al., "J. Exp. Med." 1984, Vol.160, No.6, p. 1686-701.  
 Непатентний документ 11: Suresh MR et al., "Methods Enzymol." 1986, Vol.121, p. 210-28.  
 Непатентний документ 12: Massimo YS et al., "J. Immunol. Methods" 1997, Vol.201, p.57-66.  
 Непатентний документ 13: Brennan M et al., "Science" 1985, Vol.229, p. 81.  
 Непатентний документ 14: Shalaby MR et al., "J. Exp. Med." 1992, Vol.175, p.217-25.  
 Непатентний документ 15: Holliner P et al., "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 1993, Vol.90, p. 6444-8.  
 Непатентний документ 16: Ridgway JB et al., "Protein Eng." 1996, Vol.9, p. 617-21.  
 Непатентний документ 17: Hammerling U et al., "J. Exp. Med." 1968, Vol.128, p. 1461-73.  
 Непатентний документ 18: Kurokawa T et al., "Bio/Technology" 1989, Vol.7, p.1163.  
 Непатентний документ 19: Link BK et al., "Blood" 1993, Vol.81, p.3343.  
 Непатентний документ 20: Nitta T et al., "Lancet" 1990, Vol.335, p.368-71.  
 Непатентний документ 21: deLeij L et al., "Foundation Nationale de Transfusion Sanguine, Les Ulis France" 1990, p.249-53.  
 Непатентний документ 22: Le Doussal JM et al., "J. Nucl. Med." 1993, Vol.34, p. 1662-71.  
 Непатентний документ 23: Stickney DR et al., "Cancer Res." 1991, Vol.51, p.6650-5.  
 Непатентний документ 24: Weiner LM et al., "Cancer Res." 1993, Vol.53, p.94-100.  
 Непатентний документ 25: Kroesen BJ et al., "Br. J. Cancer" 1994, Vol.70, p.652-61.  
 Непатентний документ 26: Weiner GJ et al., "J. Immunol." 1994, Vol.152, p.2385.  
 Непатентний документ 27: Suresh MR et al., "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 1986, Vol.83, p.7989-93.  
 Непатентний документ 28: Milstein C and Cuervo AC, "Nature" 1983, Vol.305, p.537.

Непатентний документ 29: Xiang J et al., "Mol. Immunol." 1990, Vol.27, p.809.  
 Непатентний документ 30: Bebbington CR et al., "Biotechnology" 1992, Vol.10, p.169.  
 Непатентний документ 31: Huse WD et al., "Science" 1989, Vol. 246, p. 1275.  
 Непатентний документ 32: McCafferty J et al., "Nature" 1990, Vol.348, p.552.  
 Непатентний документ 33: Kang AS et al., "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 1991, Vol.88, p.4363.

Суть винаходу

Завданням цього винаходу є отримання біспецифічних антитіл, що функціонально заміщують кофактори, які підсилюють ферментативну реакцію.

Завдяки цілеспрямованому дослідженню авторам цього винаходу вдалося відкрити біспецифічні антитіла, які специфічно зв'язуються як з F.IX/F.IXa, так і з F.X, та здійснюють функцію кофактору F. VIIIa (тобто, функцію, що сприяє активації F.X за допомогою F.FXa). А саме, авторам цього винаходу вдалося отримати біспецифічні антитіла, що розпізнають як фермент, так і його субстрат, та функціонально заміщують кофактори ферменту.

Цей винахід стосується біспецифічних антитіл, які функціонально заміщують кофактори, які підсилюють ферментативну реакцію, та більш докладно він стосується:

- 1). Антитіла, яке розпізнає як фермент, так і його субстрат, де згадане антитіло є біспецифічним антитілом, що функціонально заміщує кофактор, який підсилює ферментативну реакцію;
- 2). Антитіла згідно з 1), де згаданий фермент - це протеолітичний фермент;
- 3). Антитіла згідно з 2), де згадані протеолітичний фермент, субстрат та кофактор - це фактори, пов'язані зі згортанням крові/фібринолізмом;
- 4). Антитіла згідно з 3), де фермент фактора, пов'язаного зі згортанням крові/фібринолізмом, - це фактор згортання крові IX та/або активований фактор згортання крові IX; субстрат - це фактор згортання крові X; а кофактор - це фактор згортання крові VIII та/або активований фактор згортання крові VIII;

5). Антитіла згідно з будь-яким від 1) до 4), де згадане антитіло містить гіперваріабельну ділянку, яка включає амінокислотну послідовність CDR3 антитіла до фактора згортання крові ГХЛХа наступного (a1) або (a2) або гіперваріабельну ділянку, яка є функціонально еквівалентною до згаданої, та гіперваріабельну ділянку, яка включає амінокислотну послідовність CDR3 антитіла до фактора згортання крові X, описану у будь-якому з наступних від (b1) до (b9), або гіперваріабельну ділянку, що є функціонально еквівалентною до згаданої:

- (a1) амінокислотна послідовність CDR 3 Н-ланцюга, описана у послідовності № 16;
- (a2) амінокислотна послідовність CDR 3 Н-ланцюга, описана у послідовності № 20;
- (b1) амінокислотна послідовність CDR 3 Н-ланцюга, описана у послідовності № 24;
- (b2) амінокислотна послідовність CDR 3 Н-ланцюга, описана у послідовності № 28;
- (b3) амінокислотна послідовність CDR 3 Н-



ланцюга, описана у послідовності № 32;

(b4) амінокислотна послідовність CDR 3 Н-ланцюга, описана у послідовності № 36;

(b5) амінокислотна послідовність CDR 3 Н-ланцюга, описана у послідовності № 40;

(b6) амінокислотна послідовність CDR 3 Н-ланцюга, описана у послідовності № 44;

(b7) амінокислотна послідовність CDR 3 Н-ланцюга, описана у послідовності № 48;

(b8) амінокислотна послідовність CDR 3 Н-ланцюга, описана у послідовності № 52;

(b9) амінокислотна послідовність CDR 3 Н-ланцюга, описана у послідовності № 56;

6). Антитіла згідно з будь-яким від 1) до 4), де згадане антитіло містить гіперваріабельну ділянку, яка включає амінокислотну послідовність CDR антитіла до фактора згортання крові DC/DCa наступного (a1) або (a2) або гіперваріабельну ділянку, що є функціонально еквівалентною до щойно згаданої, та гіперваріабельну ділянку, яка включає амінокислотну послідовність CDR антитіла до фактора згортання крові X, описану в будь-якому з наступних від (b1) до (b9), або гіперваріабельну ділянку, що є функціонально еквівалентною до щойно згаданої:

(a1) амінокислотні послідовності CDR 1,2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях №№ 14,15, та 16, відповідно;

(a2) амінокислотні послідовності CDR 1,2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях №№ 18,19 та 20, відповідно;

(b1) амінокислотні послідовності CDR 1,2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях №№ 22,23 та 24, відповідно;

(b2) амінокислотні послідовності CDR 1,2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях №№ 26,27 та 28, відповідно;

(b3) амінокислотні послідовності CDR 1,2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях №№ 30,31 та 32, відповідно;

(b4) амінокислотні послідовності CDR 1,2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях №№ 34,35 та 36, відповідно;

(b5) амінокислотні послідовності CDR 1, 2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях №№ 38,39 та 40, відповідно;

(b6) амінокислотні послідовності CDR 1,2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях №№ 42,43 та 44, відповідно;

(b7) амінокислотні послідовності CDR 1,2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях №№ 46,47 та 48, відповідно;

(b8) амінокислотні послідовності CDR 1,2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях №№ 50,51 та 52, відповідно;

(b9) амінокислотні послідовності CDR 1,2 та 3 Н-ланцюга, описані у послідовностях №№ 54,55 та 56, відповідно;

7). Композиції, яка містить антитіло згідно з будь-яким від 1) до 6) та фармацевтично прийнятний носій;

8). Композиції згідно з 7), де згадана композиція - це фармацевтична композиція, що використовується для профілактики та/або лікування кровотечі, розладу, що супроводжується кровотечею,

або розладу, що спричиняється кровотечею;

9). Композиції згідно з 8), де кровотеча, розлад, що супроводжується кровотечею, або розлад, що спричиняється кровотечею, - це розлад, який виникає та/або прогресує внаслідок зменшення або дефіциту активності фактора згортання крові VIII та/або активованого фактора згортання крові VIII;

10). Композиції згідно з 9), де згаданий розлад, який виникає та/або прогресує внаслідок зменшення або дефіциту активності фактора згортання крові VIII та/або активованого фактора згортання крові VIII, - це гемофілія А;

11). Композиції згідно з 9), де згаданий розлад, який виникає та/або прогресує внаслідок зменшення або дефіциту активності фактора згортання крові VIII та/або активованого фактора згортання крові VIII, - це розлад, при якому генерується інгібітор фактора згортання крові VIII та/або активованого фактора згортання крові VIII;

12). Композиції згідно з 9), де згаданий розлад, який виникає та/або прогресує внаслідок зменшення або дефіциту активності фактора згортання крові VIII та/або активованого фактора згортання крові VIII, - це набута гемофілія;

13). Композиції згідно з 9), де згаданий розлад, який виникає та/або прогресує внаслідок зменшення активності фактора згортання крові VIII та/або активованого фактора згортання крові VIII, - це ангіогемофілія;

14). Спосіб профілактики та/або лікування кровотечі, розладу, що супроводжується кровотечею, або розладу, що спричиняється кровотечею, де згаданий спосіб включає етап введення антитіла згідно з будь-яким від 1) до 6) або композиції згідно з будь-якою від 7) до 13);

15). Застосування антитіла згідно з будь-яким від 1) до 6) для приготування композиції згідно з будь-якою від 7) до 13);

16). Набору, що використовується у спосіб профілактики та/або лікування розладів згідно з 14), де згаданий набір містить принаймні антитіло згідно з будь-яким від 1) до 6) або композицію згідно з 7);

17). Спосіб профілактики та/або лікування кровотечі, розладу, що супроводжується кровотечею, або розладу, що спричиняється кровотечею, де згаданий спосіб включає етап введення антитіла згідно з будь-яким від 4) до 6) або композиції згідно з будь-якою від 7) до 13) у комбінації з фактором згортання крові VIII;

18). Набору, що використовується у спосіб профілактики та/або лікування кровотечі, розладу, що супроводжується кровотечею, або розладу, що спричиняється кровотечею, згідно з 17), де згаданий набір містить принаймні антитіло згідно з будь-яким від 4) до 6) або композицію згідно з 7), а також фактор згортання крові VIII.

Стислий опис ілюстративного матеріалу

Фігура 1 зображує інсерційну ділянку pCDNA4-g4H.

Фігура 2 зображує інсерційні ділянки pCDNA4-g4L та pIND-g4L.

Фігура 3 зображує інсерційну ділянку pIND-g4H.

Фігура 4 зображує результати вимірювання F.VIIIa-міметичної активності біспецифічного антитіла до F.IXa/F.X, генерованого з антитіла XB12 до F.IXa та антитіла SB04, SB21, SB42, SB38, SB30, SB07, SB05, SB06 або SB34 до F.X. Концентрація розчинів антитіла становила 10 мкг/мл (кінцева концентрація 1 мкг/мл). Результат для дев'яти типів біспецифічних антитіл, який продемонстрував збільшення F.VIIIa-міметичної активності: XB12/SB04, XB12/SB21, XB12/SB42, XB12/SB38, XB12/SB30, XB12/SB07, XB12/SB05, XB12/SB06 та XB12/SB34, у порядку сили активності.

Фігура 5 зображує результати вимірювання F.VIIIa-міметичної активності біспецифічного антитіла до F.IXa/F.X, генерованого з антитіла XT04 до F.IXa та антитіла SB04, SB21, SB42, SB38, SB30, SB07, SB05, SB06 або SB34 до F.X. Концентрація розчинів антитіла становила 10 мкг/мл (кінцева концентрація 1 мкг/мл). Внаслідок цього XT04/SB04, XT04/SB21, XT04/SB42, XT04/SB38, XT04/SB30, XT04/SB07, XT04/SB05, XT04/SB06 та XT04/SB34 показали збільшення F.VIIIa-міметичної активності.

Фігура 6 зображує результати вимірювання F.VIIIa-міметичної активності різних концентрацій XB12/SB04, що показало найвищу активність на фігурі 4. Внаслідок цього, XB12/SB04 показало залежне від концентрації збільшення F.VIIIa-міметичної активності.

Фігура 7 зображує результати вимірювання часу згортання плазми (активованій частковий тршбопластиновий час (APTT)) у присутності XB12/SB04, XB12/SB21, XB12/SB42, XB12/SB38, XB12/SB30, XB12/SB07, XB12/SB05, XB12/SB06 або XB12/SB34. Концентрація розчинів антитіла, змішаних з плазмою, позбавленою F.VIII., становила 1,7 мкг/мл для XB12/SB06 та 10 мкг/мл для решти. Внаслідок цього XB12/SB04, XB12/SB21, XB12/SB42, XB12/SB38, XB12/SB30, XB12/SB07, XB12/SB05, XB12/SB06 та XB12/SB34 продемонстрували ефект скорочення часу згортання порівняно з випадком, якщо антитіла є відсутніми.

Фігура 8 зображує результати вимірювання часу згортання плазми (APTT) у присутності XT04/SB04, XT04/SB21, XT04/SB42, XT04/SB38, XT04/SB30, XT04/SB07, XT04/SB05, XT04/SB06 та XT04/SB34. Концентрація розчинів антитіла, змішаних з плазмою, позбавленою F.VIII., становила 5 мкг/мл для XT04/SB06 та 10 мкг/мл для решти. Внаслідок цього XT04/SB04, XT04/SB21, XT04/SB42, XT04/SB38, XT04/SB30, XT04/SB07, XT04/SB05 та XT04/SB06 продемонстрували ефект скорочення часу згортання порівняно з випадком, якщо антитіла є відсутніми. XT04/SB34 не продемонструвало ефекту скорочення часу згортання.

Фігура 9 зображує результати вимірювання часу згортання крові з різними концентраціями XB12/SB04, яке показало найвищий ефект скорочення часу згортання (APTT) на фігурах 7 та 8. Внаслідок цього XB12/SB04 показало залежний від концентрації ефект скорочення часу згортання. Концентрація антитіла на фігурі демонструє значення для розчину антитіла, змішаного з плазмою, позбавленою F.VIII.

Фігура 10 зображує результати вестерн-блотингу GST-AP SB04 або SB04, де 1), 2) та 3) є результатами реакції транскрибованого GST-AP з SB04, SB06 та зразком, що не містив антитіла, відповідно. Результати демонструють виявлення лише зв'язувальної реакції SB04 з GST-AP.

Фігура 11 зображує вектор pELBGlacl. ColElori - ділянка початку реплікації серій плазмід ColEl; flori - ділянка початку реплікації фага fl; lacI - кодувальна ділянка репресорного білка лактози; P<sub>lac</sub> - промотор лактози; pelBss - сигнальна послідовність білка E coli PelB; scFv - кодувальна ділянка однокланової молекули антитіла; gene III (gene3) (ген III (ген3)) - кодувальна ділянка білка гена III фага fl; Amp<sup>r</sup> - стійкий до ампіциліну ген та Sfi I - сайт розщеплення Sfi I ферментом рестрикції.

Фігура 12 зображує результати вимірювання F.VIII-міметичної активності із застосуванням культуральних надосадових рідин експресованих біспецифічних антитіл, які є комбінаціями антитіла до F.IXa (A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50, A69 або XB12) та антитіла до F.X (B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19, B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB04, SB15 або SB27). "+" позначає випадки, коли F.VIIIa-міметична активність становить 0,1 або більше.

Фігура 13 зображує результати аналізу згортання плазми, який виконувався із застосуванням очищених препаратів експресованих біспецифічних антитіл, які є результатом комбінації антитіла до F.IXa (A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50, A69 або XB12) та антитіла до F.X (B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19, B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB04, SB15 або SB27). Завдяки додаванню антитіл час згортання скоротився на 10 - 20 секунд ("+"), 20 - 40 секунд ("++"), 40 - 50 секунд ("+++") або 50 секунд ("++++") або більше порівняно з випадком, коли антитіла не додавалися.

Фігура 14 зображує результати вимірювання часу згортання при різних концентраціях антитіла A44/B26, яке мало великий ефект скорочення часу згортання (APTT) на фігурі 13. Час згортання становив 113 секунд, коли антитіло не додавали. Внаслідок цього, A44/B26 продемонструвало залежний від концентрації ефект скорочення часу згортання. Концентрація антитіла на фігурі демонструє значення для розчину антитіла, змішаного з плазмою, позбавленою F.VIII.

Фігура 15 зображує результати вимірювання часу згортання при різних концентраціях антитіла A69/B26, яке мало великий ефект скорочення часу згортання (APTT) на фігурі 13. Час згортання становив 109,6 секунд, коли антитіло не додавали. Внаслідок цього, A69/B26 продемонструвало залежний від концентрації ефект скорочення часу згортання. Концентрація антитіла на фігурі демонструє значення для розчину антитіла, змішаного з плазмою, позбавленою F.VIII.

Фігура 16 зображує результати вимірювання часу згортання (APTT) при сумісному існуванні A44/B26 або XB12/SB04 з F.VIII. Внаслідок цього,

порівнюючи з присутністю лише F.VIII, змішаний розчин A44/B26 або XB12/SB04 з F.VIII продемонстрував ефект скорочення часу згортання.

Фігура 17 зображує результати вимірювання часу згортання (АРТТ) у плазмі з інгібітором у присутності A44/B26 або XB12/SB04. Внаслідок цього, A44/B26 або XB12/SB04 продемонстрували ефект скорочення часу згортання порівняно з випадком, коли антитіла були відсутніми.

Фігура 18 зображує результати вимірювання часу згортання при різних концентраціях XB12/SB04 та людиноподібного XB12/людиноподібного SB04. Час згортання становив 111,3 секунди, коли не додавали жодних антитіл. Внаслідок цього вимірювання людиноподібне XB12/людиноподібне SB04 продемонструвало ефект скорочення часу згортання подібно до XB12/SB04. Концентрація антитіла на фігурі демонструє значення для розчинів антитіла, змішаних з плазмою, позбавленою F.VIII.

Найкращий варіант здійснення винаходу

Біспецифічне антитіло згідно з цим винаходом - це молекула, яка містить два типи антитіл або фрагменти антитіл, які мають специфічність до різних антигенів. Біспецифічне антитіло є, особливо не обмежуючись цим, проте переважно, моноклональним.

Біспецифічні антитіла цього винаходу - це переважно рекомбінантні антитіла, генеровані із застосуванням способів генної рекомбінації (дивись, наприклад, Borrebaeck CAK and Larrick JW, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, опубліковано в Сполученому Королівстві MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Рекомбінантне антитіло можна отримати шляхом клонування ДНК, що кодує антитіло, з клітин, що виробляють антитіло, таких як гібридоми або сенсibiliзовані лімфоцити, шляхом включення ДНК у відповідний вектор та введення вектора в хазяїна для виробництва антитіла.

Крім того, антитіла цього винаходу можуть бути фрагментами антитіла або модифікованими антитілами. Фрагменти антитіла включають діатіло (Db), лінійне антитіло, однокланцеві молекули антитіла (далі також позначаються як scFv) тощо. У цьому описі фрагмент "Fv" представляє найбільш дрібний фрагмент антитіла, який включає сайт розпізнавання та сайт зв'язування повного антигену. Фрагмент "Fv" - це димер ( $V_H$ - $V_L$  димер), у якому варіабельна область ( $V_H$ ) одного важкого (H) ланцюга та варіабельна область ( $V_L$ ) одного легкого (L) ланцюга є міцно з'єднаними шляхом нековалентного зв'язку. Три гіперваріабельні ділянки (CDR) кожної варіабельної області взаємодіють, утворюючи антиген-зв'язувальний сайт на поверхні димеру  $V_H$ - $V_L$ . Шість CDR утворюють антиген-зв'язувальний сайт на антитілі. Проте, навіть одна варіабельна область (або половина Fv, що містить лише три антиген-специфічні CDR) здатна розпізнавати антиген та зв'язуватися з ним, хоча її афінитет є більш низьким порівняно з афінитетом усього зв'язувального сайту.

Крім того, фрагмент Fab (також позначається як "F(ab)") далі містить константну область L-ланцюга та константну область H-ланцюга (CH1).

Фрагмент Fab' відрізняється від фрагмента Fab тим, що попередній фрагмент містить декілька додаткових залишків, що походять з карбоксильного кінця ділянки CH1 H-ланцюга, що включає один або більше цистеїнів з шарнірної ділянки антитіла. Fab'-SH позначає Fab', що має три тіолові групи в одному або більше цистеїнових залишках константної області. Фрагменти F(ab') генеруються шляхом розщеплення дисульфідного зв'язку в цистеїнах шарнірної частини перетравленого пепсином F(ab')<sub>2</sub>. Інші фрагменти антитіл з хімічним зв'язком також відомі фахівцям у цій галузі.

Діатіло позначає двовалентний фрагмент антитіла, побудований шляхом злиття генів (Holliger P et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993); EP 404,097; WO 93/11161 тощо). Діатіло - це димер, який включає два пептидні ланцюги; у кожному пептидному ланцюгу варіабельна область ( $V_L$ ) L-ланцюга з'єднана з варіабельною областю ( $V_H$ ) H-ланцюга на одному й тому ж ланцюгу за допомогою лінкера, який є дуже коротким (наприклад, приблизно 5 залишків), щоб дозволити утворити пару двом областям.  $V_L$  та  $V_H$ , закодовані на одному й тому ж поліпептидному ланцюгу, утворюють димер, оскільки вони не можуть утворити однокланцевий фрагмент варіабельної області через короткий лінкер між ними. Отже, діатіло закінчується двома антиген-зв'язувальними сайтами.

Однокланцеве антитіло або фрагмент scFv містить області  $V_H$  та  $V_L$  антитіла, та ці області існують у єдиному поліпептидному ланцюгу. Загалом, поліпептид Fv далі містить поліпептидний лінкер між областями  $V_H$  та  $V_L$ , так що scFv є здатним утворювати структуру, яка є необхідною для зв'язування антигену (дивись Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113 (Rosenburg and Moore ed (Springer Verlag, New York) pp. 269-315, 1994 для загальної інформації щодо scFv). Лінкери цього винаходу не є особливо обмеженими, доки вони не інгібують експресію варіабельних областей антитіла, зв'язаних з двома кінцями лінкера.

Біспецифічне антитіло типу IgG можна виділити за допомогою гібридної гібридоми (квадри), утвореної шляхом злиття двох типів гібридом, які виробляють антитіла IgG (Milstein C et al., *Nature* 1983, 305: 537-540). Його також можна виділити шляхом введення у клітини генів L-ланцюга та H-ланцюга, які складають два IgG, що нас цікавлять (усього чотири типи генів), для ко-експресії.

Проте, теоретично існує десять комбінацій H-ланцюгів та L-ланцюгів у IgG, які можна отримати цими способами. Важко очистити IgG, яке включає бажану комбінацію H- та L-ланцюгів з десяти різних типів IgG. Крім того, теоретично кількість комбінацій, які представляє інтерес, суттєво зменшується, і внаслідок цього необхідно багато клітинної культури, що, у свою чергу, приведе до подальшого зростання витрат на виробництво.

У цьому випадку шляхом відповідного заміщення амінокислоти (амінокислот) у ділянці CH3 H-ланцюга можна переважно виділити IgG, що мають гетеро логічну комбінацію H-ланцюгів (Ridgway, JB et al. *Protein Engineering* 1996,9:617-

621, Merchant, AM et al. *Nature Biotechnology* 1998,16: 677-681).

Щодо L-ланцюгів, варіабельна область L-ланцюга є менш різноманітною порівняно з варіабельною областю H-ланцюга; завдяки цьому можна очікувати отримання загального L-ланцюга, який має зв'язувальну активність з двома H-ланцюгами. Ефективна експресія біспецифічного IgG стає можливою завдяки введенню генів цього загального L-ланцюга та обох H-ланцюгів у клітину для експресії IgG (*Nature Biotechnology*. 1998, 16, 677-681). Однак, ймовірність двох випадково вибраних типів антитіл, що містять однаковий L-ланцюг, низька; отже, важко втілити вищезгадану ідею на практиці. У цьому відношенні було запропоновано спосіб відбору загального L-ланцюга, який адаптує довільно різні H-ланцюги, щоб продемонструвати високу зв'язувальну активність (WO 2004/065611). H-ланцюг, що має вищеписаний варіант CH3 (*Nature Biotechnology*. 1998, 16,677-681) рідко виділяється у відсутності іншого H-ланцюга. Застосовуючи цю характеристику, щоб, по-перше, індукувати експресію на правому L-ланцюгу та H-ланцюгу та припинити експресію, а потім індукувати експресію на лівому L-ланцюгу та H-ланцюгу, пропорцію IgG, що експресуються у комбінації, яка представляє інтерес, можна збільшити (PCT/JP2004/008585).

Біспецифічне антитіло можна також приготувати шляхом хімічного перехресного зшивання Fab's. Біспецифічний F(ab')<sub>2</sub> можна приготувати, наприклад, шляхом maleїмідування Fab', приготованого з одного антитіла, o-PDM'ом (орто-феніленеді-maleїмідом) та реакції продукту з Fab', приготованого з іншого антитіла, так щоб перехресно зшити Fab', що походять з різних антитіл (Keler T et al. *Cancer Research* 1997, 57:4008-4014). Крім того, є також відомим спосіб хімічного з'єднання фрагментів антитіла, таких як похідне Fab'-тіонітробензойної кислоти (TNB) та Fab'-тіол (SH) (Brennan M et al. *Science* 1985,229: 81-83).

Замість перехресного зшивання можна застосовувати лейцинову "застіжку-блискавку", що походить з Fos та Jun або їм подібних. Хоча Fos та Jun також утворюють гомодимер, застосовується їх переважно гетеродимерне утворення. Для приготування експресується Fab', доповнений лейциновою "блискавкою" Fos, та другий Fab', доповнений лейциновою "блискавкою" Jun. Шляхом змішування та реакції мономерних Fab'-Fos та Fab'-Jun, які були відновлені у помірних умовах, можна утворити біспецифічний F(ab')<sub>2</sub> (Kostelny SA et al. *J. of Immunology*, 1992,148:1547-53). Цей спосіб не обмежується Fab', та його можна застосовувати також для scFv, Fv тощо.

Біспецифічне антитіло можна також приготувати у формі діатіла. Біспецифічне діатіло - це гетеродимер, що включає два фрагменти scFv, що перехрещуються внапусток. Отже, біспецифічне діатіло можна приготувати шляхом побудови гетеродимеру, застосовуючи V<sub>H</sub>(A)-V<sub>L</sub>(B) та V<sub>H</sub>(B)-V<sub>L</sub>(A), що утворили шляхом з'єднання V<sub>H</sub> та V<sub>L</sub>, які походять з двох типів антитіл: A та B, з відносно коротким лінкером з приблизно 5 амінокислотних залишків (Holliger P et al. *Proc. of the National*

*Academy of Sciences of the USA* 1993,90:6444-6448).

У цьому випадку побудові біспецифічного діатіла, що представляє інтерес, можна сприяти шляхом здійснення відповідних амінокислотних заміщень (виступи-в-отвори: Zhu Z et al. *Protein Science*. 1997,6: 781-788), так щоб зшити два типи scFv' з гнучким та відносно довгим лінкером з приблизно 15 амінокислотних залишків (одноланцюгове діатіло: Kipriyanov SM et al. *J. of Molecular Biology*. 1999,293:41-56).

sc(Fv)<sub>2</sub>, що можна приготувати шляхом зшивання двох типів scFv' з гнучким та відносно довгим лінкером з приблизно 15 амінокислотних залишків, може також стати біспецифічним антитілом (Mallender WD et al. *J. of Biological Chemistry*, 1994,269: 199-206).

Модифіковане антитіло може бути, наприклад, антитілом, що зв'язується з різними молекулами, такими як поліетиленгліколь (ПЕГ). У модифікованих антитілах цього винаходу речовини, які слід зв'язувати, не обмежуються. Такі модифіковані антитіла можна отримати шляхом хімічної модифікації вже отриманих антитіл. Ці способи вже застосовувалися у цій галузі.

Антитіла цього винаходу включають антитіло людини, антитіло миші, антитіло щура та їм подібні, в жодному разі не обмежуючись їх походженням, та антитіла цього винаходу можуть бути генетично модифікованими антитілами, такими як химерне антитіло та людиноподібне антитіло.

Способи отримання антитіл людини є відомими, та антитіла людини, що представляють інтерес, можна отримати, наприклад, шляхом імунізації трансгенної тварини, що має спектри генів антитіла людини, антигеном, що представляє інтерес (дивись WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735).

Генетично модифіковані антитіла можна отримати за відомими способами. Більш конкретно, наприклад, химерне антитіло включає варіабельні області від H- та L-ланцюгів антитіла з імунізованої тварини та константні області з H- та L-ланцюгів антитіла людини. Химерне антитіло можна отримати шляхом зшивання ДНК, що кодує варіабельну область антитіла, яке походить з імунізованої тварини, з ДНК, що кодує константну область антитіла людини, шляхом вставки отриманої ДНК у вектор експресії, та введення рекомбінантного вектора в хазяїна для виробництва.

Людиноподібне антитіло - це модифіковане антитіло, яке також позначається як антитіло людини зі зміненою формою. Людиноподібне антитіло будується шляхом трансплантації гіперваріабельної ділянки антитіла (CDR), що походить з імунізованих тварин, у CDR антитіла людини. Загальні технології генної інженерії є також відомими.

Більш конкретно, послідовність ДНК, побудована для зшивання CDR антитіла миші з каркасною ділянкою (FR) антитіла людини, синтезується шляхом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) із застосуванням декількох олігонуклеотидів, які були приготовані так, щоб вони містили перекриваю-

чі частини на їх кінцевих ділянках. Після зшивання отриманої ДНК з ДНК, що кодує константну область антитіла людини, отриману ДНК включають у вектор експресії та вводять хазяїну, щоб отримати людиноподібне антитіло (дивись EP 239400 та WO 96/02576). Коли каркасна ділянка антитіла людини зв'язується за допомогою CDR, вибирається одна область, що є спроможною утворювати антиген-зв'язувальний сайт з належною гіперваріабельною ділянкою. Амінокислоти каркасної ділянки у варіабельній області антитіла за необхідністю можна замінити, так щоб гіперваріабельна ділянка антитіла людини зі зміненою формою утворювала відповідний антиген-зв'язувальний сайт (Sato K et al, Cancer Research 1993, 53: 851-856). Цю каркасну ділянку можна замінювати каркасними ділянками, що походять з різних антитіл людини (дивись WO 99/51743).

Цим винаходом пропонуються біспецифічні антитіла, які функціонально заміщують кофактори, що розпізнають як фермент, так і його субстрат.

Кофактори цього винаходу особливо не обмежуються, доки вони спроможні діяти на фермент з метою підсилення ферментативної реакції. Кофактор цього винаходу - це, наприклад, кофактор протеолітичного ферменту. Специфічні приклади кофактору протеолітичного ферменту - це кофактори для згортання крові та пов'язані з фібринолізмом фактори (F.viii/F.VIIIa, F.V/F.Va, PZ, TM, TM/PS система), кофактори для реакцій комплементу (C4b, MCP, CRI, H фактор) та їм подібні.

Наступні комбінації можна перелічити як специфічні приклади ферменту та субстрату ферменту, а також як кофактори ферментів.

(a) Кофактор для згортання крові та фактор, пов'язаний з фібринолізмом (Приклад 1).

Фермент: F.IXa

Субстрат: F.X

Кофактор: F.VIII/F.VIIIa

Кофактор F.VIIIa зв'язується як з F.IXa, так і з F.X та підсилює активацію F.X за допомогою F.IXa. Серед біспецифічних антитіл, що розпізнають як вищеописаний фермент F.IXa, так і субстрат F.X, деякі мають підсилюючий ефект на активацію F.X. Вважають, що деякі з цих антитіл мають ефект заміщення функції кофактора F.VIII/F.VIIIa.

(b) Кофактор для згортання крові та фактор, пов'язаний з фібринолізмом (Приклад 2).

Фермент: ZPI

Субстрат: F.X/F.Xa Кофактор: PZ

Кофактор PZ зв'язується з ZPI родини серпіну та активованим фактором згортання крові X (F.Xa), підсилюючи F.Xa-інгібуючу активність ZPI. Більш конкретно, вважають, що деякі біспецифічні антитіла, що розпізнають як ZPI, так і F.X/F.Xa, мають ефект заміщення функції PZ.

(c) Кофактор для згортання крові та фактор, пов'язаний з фібринолізмом (Приклад 3).

Фермент: тромбін

Субстрат: TAFI Кофактор: TM

Кофактор TM підсилює активацію TAFI тромбіном. Більш конкретно, вважають, що деякі біспецифічні антитіла, що розпізнають як тромбін, так і TAFI, мають ефект заміщення функції TM.

(d) Кофактор для згортання крові та фактор,

пов'язаний з фібринолізмом (Приклад 4).

Фермент: тромбін

Субстрат: PC Кофактори: TM/PS

Система TM/PS підсилює активацію PC тромбіном. Більш конкретно, вважають, що деякі біспецифічні антитіла, що розпізнають як тромбін, так і PC, функціонально заміщують систему TM/PS.

(e) Кофактор для згортання крові та фактор, пов'язаний з фібринолізмом (Приклад 5).

Фермент: F.Xa

Субстрат: протромбін

Кофактор: F.V/F.Va

Кофактор F.Va зв'язується як з F.Xa, так і з протромбіном, підсилюючи активацію протромбіну за допомогою F.Xa. Серед біспецифічних антитіл, що розпізнають як вищеописаний фермент F.Xa, так і його субстрат протромбін, деякі мають підсилюючий ефект на активацію протромбіну. Вважають, що деякі з цих антитіл мають функцію, що заміщує функцію кофактора F.V/F.Va.

(f) Кофактор для реакції комплементу (Приклад 1).

Фермент: C1s

Субстрат: C2

Кофактор: C4b

C4b має вплив на C1s', що сприяє деструкції C2. Більш конкретно, вважають, що деякі біспецифічні антитіла, що розпізнають як C1s, так і C2, функціонально заміщують C4b.

(g) Кофактори для реакції комплементу (Приклад 2)

Фермент: Регуляторний фактор I комплементу

Субстрат: C3b

Кофактори: Регуляторний фактор H комплементу,

Мембранний білок-кофактор (MCP) та

Рецептор 1 (CR1) комплементу.

Регуляторні фактори H, MCP та CR1 комплементу мають вплив на регуляторний фактор 1 комплементу, сприяючи деградації C3b. Більш конкретно, вважають, що серед біспецифічних антитіл, що розпізнають як регуляторний фактор 1 комплементу, так і C3b, деякі функціонально заміщують регуляторні фактори H, MCP та CR1 комплементу.

Серед вищеописаних кофакторів F.VIII/F.VIIIa є особливо переважним. Незважаючи на те, що F.VIII/F.VIIIa зазнає обмеженого протеолізу від протеолітичних ферментів, таких як тромбін, його форма не має значення, доки він має активність F.VIII/F.VIIIa. Крім того, варіанти F.VIII/F.VIIIa та F.VIII/F.VIIIa, які були штучно модифіковані за способами рекомбінації генів, також включаються у F.VIII/F.VIIIa, доки вони зберігають активність кофактору F.VIII/F.VIIIa.

Способи отримання біспецифічних антитіл, які функціонально заміщують кофактори, цього винаходу особливо не обмежуються, та їх можна отримати будь-якими способами. Наприклад, коли необхідно отримати біспецифічне антитіло, яке функціонально заміщує фермент A та субстрат B, фермент A та субстрат B вводять тварині для імунізації, щоб отримати антитіло до ферменту A та антитіло до субстрату B. Внаслідок цього виробляється біспецифічне антитіло, яке включає H- та

L-ланцюги антитіла до ферменту А та Н- та L-ланцюги антитіла до субстрату В. У цьому описі бажано отримати декілька типів кожного з антитіл до ферменту А та антитіл до субстрату В, так щоб ці антитіла можна було б переважно застосовувати для виробництва як можна більшої кількості комбінацій біспецифічних антитіл. Після виробництва біспецифічних антитіл вибираються антитіла з активністю, яка заміщує функцію кофактору.

Антитіла проти ферменту або субстрату можна отримати за способами, відомими фахівцям у цій галузі. Наприклад, антитіла можна приготувати шляхом імунізації тварин антигенами. Антигени для імунізації тварин - це, наприклад, повні антигени, що мають імуногенність, та неповні антигени (включаючи гаптен) без імуногенності. У цьому винаході фермент, чий кофактор можна функціонально замінити антитілом цього винаходу, яке діє як кофактор, або субстрат ферменту застосовується як вищеописаний антиген (імуноген). Як тварин для імунізації можна застосовувати, наприклад, мишей, щурів, хом'ячків, морських свинок, кролів, курчат, макаку-резус та їм подібних. Імунізацію цих тварин антигенами можна виконувати за способами, відомими фахівцям у цій галузі. У цьому винаході варіабельні області L-ланцюга та Н-ланцюга антитіла переважно беруться від імунізованих тварин або їх клітин. Цю процедуру може виконати фахівець у галузі, застосовуючи загально відомі способи. Імунізовані антигеном тварини експресують антитіла проти цього антигену, особливо у клітинах селезінки. Завдяки цьому, наприклад, можна приготувати мРНК з клітин селезінки імунізованої тварини, та варіабельні області L-ланцюга та Н-ланцюга можна одержати шляхом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскриптазою (RT-PCR), застосовуючи праймери до варіабельних областей тварини.

Більш конкретно, тварин імунізують ферментом або субстратом. Фермент та субстрат, які застосовуються як імуногени, можуть бути цілими білками або їхніми частковими пептидами. Крім того, залежно від обставин, антиген-кандидат, зв'язаний з іншою молекулою, утворюючи розчинний антиген, або його фрагмент можна застосовувати як імуноген для імунізації тварин.

Клітини селезінки видалають з селезінок імунізованих мишей та зливають з клітинами мієломи мишей, утворюючи гібридами. Після відбору гібридом, які зв'язуються з відповідними антигенами, варіабельні області L-ланцюга та Н-ланцюга одержують шляхом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскриптазою, застосовуючи, наприклад, праймери, що відповідають варіабельним областям. Можна також застосовувати праймери до CDR, праймери до каркасних ділянок, які є менш різноманітними порівняно з CDR, або праймери до сигнальних послідовностей та CH1 або константної області L-ланцюга (C<sub>L</sub>).

Альтернативно, мРНК екстрагують з клітин селезінки імунізованих тварин та кДНК варіабельних областей L-ланцюга та Н-ланцюга одержують шляхом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскриптазою, застосовуючи праймери до сусідніх ділянок варіабельних областей. Крім того,

лімфоцити можна також імунізувати *in vitro* та використати їх для побудови бібліотек, що презентують scFv або Fab. Варіабельні області можна отримати шляхом концентрування та клонування клону антиген-зв'язувального антитіла шляхом пенінгу. У цьому випадку можна також здійснити скринінг, застосовуючи подібні бібліотеки, побудовані з мРНК, що походять з таких матеріалів, як моноцити периферійної крові, селезінка, мигдалина та їм подібні органи людини та неімунізованих тварин.

Варіабельні області потім використовують для приготування векторів експресії антитіла. Біспецифічне антитіло можна отримати шляхом введення вектора експресії антитіла до ферменту та вектора експресії антитіла до субстрату в одну й ту ж клітину та експресування антитіл.

Антитіла, що мають активність заміщення функції кофактору, можна відбирати, наприклад, за способами, описаними нижче.

1). У реакційній системі, що включає фермент та субстрат, відбір виконують, використовуючи як показник підвищення ферментативної активності (спроможність до деградації субстрату), де підвищення ферментативної активності є результатом додавання антитіла.

2). У системі для вимірювання або симуляції біологічних функцій, у які залучаються фермент, субстрат та кофактор (наприклад, система для вимірювання згортання плазми), відбір виконують, використовуючи як показник активності функціонального відновлення, де активність функціонального відновлення є результатом додавання антитіла у відсутності кофактору.

Антитіло, отримане таким способом, можна очистити до гомогенності. Виділення та очищення антитіла можна виконувати, застосовуючи способи виділення та очищення, які використовуються для загальних білків. Наприклад, антитіла можна виділяти та очищувати шляхом відповідного відбору та комбінування хроматографічних колонок, так як, наприклад, шляхом афінної хроматографії, фільтрації, ультрафільтрації, знесолювання, діалізу, електрофорезу на поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію, ізоелектричного електрофорезу тощо (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988), проте, ними методи не обмежуються. Колонка, що застосовується під час афінної хроматографії - це, наприклад, колонка з білком А, колонка з білком G тощо.

Наприклад, коли F.VIII/F.VIIIa - це кофактор заміщення, тобто, коли комбінація ферменту та субстрату - це фактори F.IXa та F.X, пов'язані зі згортанням плазми та фібринолізмом, біспецифічне антитіло цього винаходу переважно має структуру, яка включає варіабельну область антитіла до F.IXa та варіабельну область антитіла до F.X.

Біспецифічні антитіла цього винаходу, які функціонально заміщують F.VIII/F.VIIIa, генерували наступним способом. Мишей підшкірно імунізували комерційно доступними F.IXa або F.X. Клітини селезінки виділили з селезінок імунізованих мишей з підвищеним титром антитіла та злили з клітинами мієломи мишей, утворивши гібридами. Гібридами,

що зв'язуються з антигеном F.IXa або F.X, відібрали та варіабельні області L-ланцюга та H-ланцюга одержали шляхом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскриптазою (RT-PCR), застосовуючи праймери до варіабельних областей. Варіабельну область L-ланцюга включили у вектор експресії L-ланцюга, який містив C<sub>L</sub>, а варіабельну область H-ланцюга вставили у вектор експресії H-ланцюга, який містив константну область H-ланцюга. Крім того, мРНК екстрагували з селезінок імунізованих мишей та кожну кДНК варіабельних областей L-ланцюга та H-ланцюга одержали шляхом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскриптазою (RT-PCR), застосовуючи праймери до відповідної варіабельної області. Застосовуючи ці варіабельні області, побудували бібліотеку фатів з присутнім scFv. Клоні антиген-зв'язувальних антитіл концентрували та клонували шляхом пенінгу і утворили вектори експресії антитіла, використовуючи їх варіабельну область. Вектори експресії (H-ланцюг, L-ланцюг) антитіла до F.IXa та вектори експресії (H-ланцюг, L-ланцюг) антитіла до F.X ввели в однакові клітини для експресії антитіла і таким чином отримали біспецифічні антитіла.

Біспецифічні антитіла, отримані таким чином, проаналізували щодо їх ефекту функціонального заміщення F.VIII/F.VIIIa (кофактори активації F.X за допомогою F.IXa) в аналітичній системі, яка включала F.XIa (фермент, що активує F.IX), F.IX, F.X, синтетичний субстрат (S-2222) для F.Xa та фосфоліпід. По суті, як біспецифічне антитіло, що має активність функціонально заміщувати F.VIII/F.VIIIa, відбирали на основі результатів аналізу ті біспецифічні антитіла, що демонстрували F.VIIIa-міметичну активність 0,1 або більше у цій аналітичній системі. F.VIIIa-міметична активність, на яку посилюються у цьому описі, - це значення, яке отримано протягом 30 або 60 хвилин, шляхом віднімання значення зміни поглинання розчинника або культурадньої надосадової рідини, що не експресує антитіло, від значення зміни поглинання розчину антитіла або культуральної надосадової рідини, що експресує антитіло.

У вибраних вище біспецифічних антитіл або біспецифічних антитіл, тісно пов'язаних з ними, вимірювали спроможність відновляти згортання в аналітичній системі часу згортання, яка застосовує плазму людини, позбавлену F.VIII. Як наслідок, отримали біспецифічні антитіла, спроможні скорочувати час згортання порівняно з випадками, коли їх не додають. Час згортання, на який посилюються у цьому описі, - це, як зображено на фігурі 7, активований частковий тромбoplastиновий час (APTT), який вимірювали, застосовуючи плазму людини, позбавлену F.VIII. Серед цих біспецифічних антитіл переважні біспецифічні антитіла мають спроможність скорочувати час згортання на 10 секунд або більше, більш переважно - на 20 секунд або більше, іще більш переважно - на 40 секунд або більше, та найбільш переважно - на 50 секунд або більше.

CDR3 H-ланцюга антитіл цього винаходу особливо не обмежуються, проте вони специфічно мають гіперваріабельну ділянку, яка включає амі-

нокислотну послідовність, описану у будь-якій послідовності CDR3 H-ланцюга (послідовності №№16,20,60,64,68,72,76,80,84,88,92 та 96) XB12, XT04, A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50 та A69, описані у прикладах, наведених нижче, або послідовності, функціонально еквівалентні до них, та гіперваріабельну ділянку, яка включає амінокислотну послідовність, описану у будь-якій послідовності CDR3 H-ланцюга (послідовності №№ 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200 та 204) у SB04, SB05, SB06, SB07, SB21, SB30, SB34, SB38, SB42, B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19, B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB15 та SB27, відповідно, або послідовності, функціонально еквівалентні до них.

Крім того, специфічний приклад вищеописаних антитіл переважно комбінується з антитіла, що має гіперваріабельну ділянку, яка включає одну з амінокислотних послідовностей CDR H-ланцюга XB12, XT04, A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50 та A69 (послідовності №№ 14-16, 18-20, 58-60, 62-64, 66-68, 70-72, 74-76, 78-80, 82-84, 86-88, 90-92 та 94-96) або функціонально еквівалентну до неї гіперваріабельну ділянку, та антитіла, що має гіперваріабельну ділянку, яка включає будь-яку з амінокислотних послідовностей CDR H-ланцюга (послідовності №№ 22-24, 26-28, 30-32, 34-36, 38-40, 42-44, 46-48, 50-52, 54-56, 98-100, 102-106, 106-108, 110-112, 114-116, 118-120, 122-124, 126-128, 130-132, 134-136, 138-140, 142-144, 146-148, 150-152, 154-156, 158-160, 162-164, 166-168, 170-172, 174-176, 178-180, 182-184, 186-188, 190-192, 194-196, 198-200 та 202-204) у SB04, SB05, SB06, SB07, SB21, SB30, SB34, SB38, SB42, B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19; B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB15 та SB27) або функціонально еквівалентну до неї гіперваріабельну ділянку.

Амінокислотні послідовності варіабельних областей H-ланцюга XB12, XT04, A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50, A69, SB04, SB05, SB06, SB07, SB21, SB30, SB34, SB38, SB42, B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19, B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB15 та SB27, описані у цьому винаході, зображено як послідовності №№ 13, 17, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 97, 101, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 141, 145, 149, 153, 157, 161, 165, 169, 173, 177, 181, 185, 189, 193, 197 та 201.

Амінокислотні послідовності варіабельних областей L-ланцюга A44, B26, XB12 та SB04, описані у цьому винаході, зображено як послідовності №№ 205,209,213 та 217. Послідовності CDR L-ланцюга A44, B26, XB12 та SB04 зображено як послідовності №№ 206-208, 210-212, 214-216 та 218-220. Нуклеотидні послідовності CDR H-ланцюга XB12, SB04, A44 та B26 зображено як послідовності №№ 221 (222), 223 (224), 225 (226), 233 (234), 235 (236), 237 (238), 245 (246), 247 (248), 249 (250), 257 (258), 259 (260) та 261 (262) (послідовності у дужках - це

амінокислотні послідовності, що кодуються відповідними нуклеїновими кислотами), а їх нуклеотидні послідовності CDR L-ланцюга зображено як послідовності №№ 227 (228), 229 (230), 231 (232), 239 (240), 241 (242), 243 (244), 251 (252), 253 (254), 255 (256), 263 (264), 265 (266) та 267 (268).

Послідовності №№ 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142, 146, 150, 154, 158, 162, 166, 170, 174, 178, 182, 186, 190, 194, 198, 202, 206, 210, 214, 218, 222, 228, 234, 240, 246, 252, 258 та 264 репрезентують CDR1.

Послідовності №№ 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83, 87, 91, 95, 99, 103, 107, 111, 115, 119, 123, 127, 131, 135, 139, 143, 147, 151, 155, 159, 163, 167, 171, 175, 179, 183, 187, 191, 195, 199, 203, 207, 211, 215, 219, 224, 230, 236, 242, 248, 254, 260 та 266 репрезентують CDR2.

Послідовності №№ 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 216, 220, 226, 232, 238, 244, 250, 256, 262 та 268 ретрепетують CDR3.

Антитіла цього винаходу особливо не обмежуються, проте вони є переважно біспецифічними антитілами, комбінованими з антитіла до фактора IXa та антитіла до фактора X, які мають такі ж самі епітопи, як вищезгадані антитіла, або епітопи, тісно споріднені з ними. Антитіла, що мають однаковий або тісно споріднений епітоп, у цьому описі позначають, наприклад, антитіла, які конкурують один з одним щодо зв'язування антигену у конкурентному ЕЛАЙЗА тощо. Не обмежуючись ним, у цьому способі конкурентного ЕЛАЙЗА фактор IX/IXa або фактор X іммобілізують на планшеті Micro Well з 96 лунками, одночасно додають відповідним чином мічене антитіло та антитіло, яке слід аналізувати, та, застосовуючи мітку, виявляють зв'язане антитіло. Ця мітка особливо не обмежується, та вона включає мітку лужної фосфатази, мітку пероксидази, фермент, що зв'язує стрептавідин, мічений біотином (лужна фосфатаза, пероксидаза тощо), FTTC та їм подібні. Спостерігається епітопне перекривання, якщо спостерігається принаймні 50% конкуренція, коли антитіло є присутнім у концентрації, надмірній у 100000 разів відносно антитіла, яке слід аналізувати.

При приготуванні антитіла з повною довжиною, застосовуючи варіабельні області, описані у цьому винаході, константні області антитіла особливо не обмежуються, та області, відомі фахівцям у галузі, наприклад, можна застосовувати області, описані у "Sequences of proteins of immunological interest, (1991), U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service National Institutes of Health" та "An efficient route to human bispecific IgG, (1998). Nature Biotechnology vol. 16,677-681", та їм подібні.

В одному варіанті здійснення антитіл цього винаходу антитіла мають ефект функціонально заміщувати кофактори, та завдяки цьому очікується, що вони стануть ефективними ліками проти хвороб, які спричиняються зменшенням активності

(функції) цих кофакторів. У випадках, кож кофактор, що функціонально заміщується антитілом цього винаходу, - це фактор, пов'язаний зі згортанням крові та фібринолізом, вищеописані хвороби - це, наприклад, кровотеча, хвороби, що супроводжуються кровотечею, хвороби, що спричиняються кровотечею, та їм подібні. Зокрема відомо, що функціональне зменшення та дефіцит F.VIII/F.VIIIa, F.DC/F.Ka та F.XI/F.XIa спричиняють патологічну кровотечу, яка називається гемофілією.

Серед різновидів гемофілії патологічна кровотеча, яка є наслідком природженої гіпофункції F.VIII/F.VIIIa або дефіциту F.VIII/F.VIIIa, називається гемофілія А. Коли у пацієнта з гемофілією А відбувається кровотеча, здійснюється замісна терапія фармацевтичною композицією з F.VIII. Крім того, профілактичне введення композиції з F.VIII можна здійснювати (дивись непатентні документи 1 та 2) у день інтенсивного фізичного навантаження або під час пішої подорожі, коли виникають часті внутрисуглобні кровотечі, або коли пацієнту ставлять діагноз гострої гемофілії. Оскільки це профілактичне введення композиції з F.VIII помітно зменшує епізоди кровотечі у пацієнтів з гемофілією А, за останні часи воно стало популярним. Зменшення епізодів кровотечі не тільки зменшує ризик летальної та нелегальної кровотечі та агонії, що її супроводжує, але також запобігає гемофілій артропатії, яка є наслідком частої внутрисуглобної кровотечі. Як наслідок, він суттєво впливає на покращення якості життя пацієнтів з гемофілією А.

Період напіврозпаду композиції з F.VIII у кровотоці є коротким та становить від приблизно 12 до приблизно 16 годин. Отже, для тривалої профілактики необхідно вводити композицію з F.VIII приблизно тричі на тиждень. Це еквівалентно підтриманню приблизно 1% активності F.VIII або більше (дивись непатентні документи 3 та 4). Крім того, під час замісної терапії при кровотечі необхідно періодично вводити складні, що підсилюють F.VIII, протягом певного періоду часу за виключенням, коли кровотеча є помірною, з метою запобігти повторній кровотечі та встановити повний гемостаз.

Крім того, композиції з F.VIII вводяться внутрішньо. Існують технічні труднощі щодо виконання внутрішнього введення, та воно стає навіть більш складним особливо, коли введення здійснюється молодим пацієнтам, вени яких є тонкими.

Під час вищеописаного профілактичного введення складу з F.VIII та його введення у невідкладних випадках кровотечі, у більшості випадків застосовується лікування вдома та самоін'єкції. Необхідність частого введення та технічні труднощі не лише спричиняють біль пацієнтам, але також стають тією причиною, яка не сприяє популярності лікування вдома та самоін'єкції.

Отже, беручи до уваги сучасні композиції з фактором згортання крові F.VIII, існує невідкладна потреба у ліках, які мають триваліші інтервали введення, та у ліках, які можна легко вводити.

Крім того, антитіла до F.VIII, які називаються інгібіторами, можна генерувати у пацієнтів з гемо-



філією А, особливо у пацієнтів з гострою формою гемофілії А. Якщо інгібітор генерується, дія композиції з F. VIII затримується інгібітором. Як наслідок, для пацієнтів стає дуже складним контролювати гемостаз.

Коли відбувається кровотеча у такого пацієнта з гемофілією А з інгібітором, звичайно виконують нейтралізуючу терапію, застосовуючи велику дозу композиції з F. VIII, або обхідну терапію, застосовуючи складний концентрат або композицію з F. VIII. Проте, під час нейтралізуючої терапії введення великої дози композиції з F. VIII може шкідливо підвищити титр інгібітору (антитіла до F. VIII). Крім того, при обхідній терапії відносно короткі періоди напіврозпаду (приблизно від 2 до 8 годин) складних концентратів та композиції з F. VIIIa становлять проблему. Крім того, оскільки механізми їх дії не залежать від функції F. VIII/F. VIIIa, тобто функції каталізувати активацію F. X за допомогою F. IXa, механізм гемостазу може не функціонувати належним чином, та він може не реагувати. Отже, у багатьох випадках у пацієнтів з гемофілією А з інгібітором неможливо отримати достатнього гемостатичного ефекту порівняно з пацієнтами без інгібітору гемофілії А.

Отже, існує сильна потреба у ліках, на які не впливає присутність інгібіторів, та які можуть функціонально замінювати F. VIII/F. VIIIa.

Окрім гемофілії та набутої гемофілії, що спричиняється аутоантитілом до F. VIII, хвороба Віллебранда (ангіомемофілія), яка спричиняється функціональною патологією або дефіцитом vWF, відома як розлад патологічної кровотечі, пов'язаний з F. VIII/F. VIIIa. vWF є необхідним не тільки для нормальної адгезії тромбоцитів з субендотеліальними тканинами на ділянках пошкодження судинних стінок, але також для утворення комплексів з F. VIII для підтримки нормального рівня F. VIII у плазмі. У пацієнтів з хворобою Віллебранда ці функції послаблені, та виникає функціональна патологія гемостазу.

Стосовно вищеописаного, способи, які застосовують антитіла, можна розглядати для створення ліків, які (i) мають тривалі інтервали введення, (ii) легко вводити, та (iii) на які не впливає присутність інгібіторів, та (iv) можуть суттєво замінювати F. VIII/F. VIIIa способом, незалежним від F. VIII/F. VIIIa. Взагалі, періоди напіврозпаду антитіл у кровотоці є відносно тривалими - від декількох днів до декількох тижнів. Крім того, відомо, що антитіла мігрують у кровотоці після підшкірного введення. Тобто, ліки антитіл взагалі відповідають вищеописаним вимогам (i) та (ii).

Цим винаходом пропонуються фармацевтичні композиції, які включають антитіло цього винаходу як активний інгредієнт. Наприклад, коли антитіло цього винаходу є одним з антитіл, що розпізнають як F. IX/F. IXa, так і F. X, та можуть функціонально замінювати F. VIIIa, очікується, що це антитіло стане фармацевтичним препаратом (фармацевтичною композицією) або ліками для профілактики або лікування кровотечі, розладів, що супроводжуються кровотечею, або розладів, що спричиняються кровотечею. Крім того, коли антитіло цього винаходу є одним з антитіл, що розпізнають як

F. X/F. Xa, так і протромбін, та можуть функціонально замінювати F. Va, очікується, що це антитіло стане фармацевтичним препаратом (фармацевтичною композицією) або ліками для профілактики або лікування кровотечі, розладів, що супроводжуються кровотечею, або розладів, що спричиняються кровотечею.

Разом з цим очікується, що антитіло, яке зв'язується з ZPI та F. X та функціонально замінює PZ, стане фармацевтичним препаратом (фармацевтичною композицією) або ліками з дією проти утворення тромбів; антитіло, яке зв'язується з тромбіном та TAFI та функціонально замінює TM, стане фармацевтичним препаратом (фармацевтичною композицією) або ліками з ефектом, що сприяє гемостазу, а антитіло, яке зв'язується з тромбіном та PC та функціонально замінює систему PS/TM, стане фармацевтичним препаратом; (фармацевтичною композицією) або ліками з ефектом модуляції згортання.

Окрім того, оскільки дефіцит комплементу C4 спричиняє системний червоний вовчак (SLE), очікується, що антитіло, яке функціонально замінює C4b, стане фармацевтичним препаратом (фармацевтичною композицією) або ліками з ефектом, що пригнічує виникнення системного червоного вовчака. Оскільки дефіцит фактора H спричиняє плинну інфекцію та аутоімунний гломерулонефрит, очікується, що антитіло, яке функціонально замінює фактор H, стане фармацевтичним препаратом (фармацевтичною композицією) або ліками з ефектом пригнічення початку цих хвороб.

Для приготування фармацевтичних препаратів, включаючи фармацевтичні композиції, антитіло цього винаходу, що застосовується для лікування або профілактики як активний інгредієнт, можна, за необхідністю, змішати з відповідним фармацевтично придатним носієм, середовищем та такими речовинами, які є інертними до нього. Наприклад, можна перелічити стерильну воду або фізіологічний розчин, стабілізатор, ексципієнт, антиоксидант (аскорбінова кислота тощо), буфер (фосфорна кислота, лимонна кислота, інші органічні кислоти тощо), антисептик, поверхнево-активну речовину (ПЕГ, Tween тощо), хелатоутворювальний агент (ЕДТК тощо), зв'язувальний агент та їм подібні. Фармацевтичні композиції можуть також містити інші низькомолекулярні поліпептиди, білки, такі як сироватковий альбумін, желатин та імуноглобулін, амінокислоти, такі як гліцин, глютамін, аспарагін, аргінін та лізин, цукри, такі як полісахариди та моносахариди, та вуглеводні, та цукрові спирти, такі як маніт та сорбіт. При приготуванні водних розчинів для ін'єкції, наприклад, солюбілізуювальні агенти включають фізіологічний сольовий розчин, ізотонічні розчини, що містять глюкозу та інші допоміжні агенти, такі як D-сорбіт, D-маноза, D-маніт та хлорид натрію, та їх можна застосовувати у комбінації з відповідними солюбілізуювальними агентами, такими як спирт (етанол тощо), поліспирт (пропіленгліколь, ПЕГ тощо), та неіонними поверхнево-активними речовинами (полісорбат 80, HCO-50 тощо).

Крім того, якщо необхідно, антитіла цього винаходу можна помістити у мікрокапсули (мікрокап-

сули, виготовлені з гідроксиметилцелюлози, желатину, полі(метилметакрилату) тощо), або їх можна включити у колоїдну систему доставки ліків (ліпосома, альбумінова мікросфера, мікроемульсія, нано-частинка та нано-капсула тощо) (дивись "Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980) тощо). Відомі також способи виготовлення фармацевтичних складів ліків з уповільненим вивільненням, та їх можна застосовувати до антитіла цього винаходу (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:267-277 (1981); Langer, Chemtech. 12: 98-105 (1982); патент США № 3,773,919; Європейська заявка на патент (EP): 58,481; Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983); EP133,988).

Антитіла або фармацевтичні композиції цього винаходу можна застосовувати у комбінації з фактором згортання крові VIII. Антитіла або фармацевтичні композиції цього винаходу можна вводити з фактором згортання крові VIII одночасно або з деяким інтервалом між ними. Введення можна виконувати у наборі, який поєднує антитіло або фармацевтичну композицію цього винаходу з фактором згортання крові VIII. Коли антитіло або фармацевтична композиція цього винаходу застосовується у комбінації з фактором згортання крові VIII, за бажанням також можна застосовувати дози нижчі, порівняно з дозами, коли їх застосовують окремо.

Незважаючи на те, що дозування фармацевтичних композицій цього винаходу відповідним чином визначається, враховуючи тип фармацевтичного складу, спосіб введення, вік та вагу тіла пацієнта, симптоми пацієнта, тип та стан розвитку хвороби тощо, та, зрештою, лікарями, взагалі, дози від 0,1 до 2000 мг/день можна розподілити на від одного до декількох введень для дорослих. Дозування становить переважно від 1 до 1000 мг/день, більш переважно від 5 до 500 мг/день та найбільш переважно від 100 до 300 мг/день. Незважаючи на те, що дозування різняться залежно від ваги тіла та віку пацієнтів, способів введення та тому подібного, фахівець у галузі зможе вибрати відповідне дозування. Переважно, період дозування також відповідним чином визначається згідно з, наприклад, процесом одужування пацієнтів.

Крім того, також можливо здійснювати генну терапію шляхом вставки гена, що кодує антитіло цього винаходу у вектори генної терапії. Як спосіб введення за виключенням прямого введення голих плазмід, гени можна вводити запакованими у ліпосому або їй подібне або шляхом вставки у різні вірусні вектори, такі як вектор ретровірусу, вектори аденовірусу, вектори вірусу коров'ячої віспи, вектори поксвірусу, вектори аденоасоційованого вірусу та вектори HVJ (дивись Adolph "Virus Genome Method" CRC Press, Florid (1996)), або шляхом нанесення на гранули-носії, такі як колоїдна частинка золота (WO93/17706 тощо). Проте, ген можна вводити будь-якими способами, доки антитіло може експресуватися *in vivo*, виявляючи свою дію. Переважно, достатня доза вводиться відповідним парентеральним способом, таким як внутрішньовенна, інтраперитоніальна, шдшжірна, ввуфішньошкірна ін'єкція або інфузія, ін'єкція або інфузія крізь жирову тканину, інтрамамарна та внутрішньом'язова

ін'єкція або інфузія, інгаляція, спосіб індукованого газом бомбардування частинками (електронною пушкою або подібним) або крізь слизисту оболонку, застосовуючи носові краплі. Гени, що кодують антитіло цього винаходу, можна вводити шляхом введення гена у кров'яні клітини, клітини, що походять з кісткового мозку таїм подібні, застосовуючи ліпосомну трансфекцію *ex vivo*, спосіб бомбардування частинками (патент США № 4,945,050) або вірусну інфекцію, та повторного введення цих клітин тваринам. Під час генної терапії можна застосовувати будь-який ген, що кодує антитіло цього винаходу, наприклад, гени, які включають нуклеотидні послідовності CDR вищеписаних XB12, SB04, A44 та B26.

Цим винаходом також пропонуються способи профілактики та/або лікування кровотечі, розладів, що супроводжуються кровотечею, або розладів, що спричиняються кровотечею, при цьому спосіб включає етапи введення антитіла або композиції цього винаходу. Антитіла або композиції можна вводити, наприклад, за допомогою вищезгаданих способів.

Цей винахід також стосується застосування антитіла цього винаходу для виробництва (фармацевтичних) композицій цього винаходу.

Крім того, цим винаходом пропонуються набори, які включають принаймні антитіло або композицію цього винаходу, які слід застосовувати у вищеписаних способах. Складений шприць, голку для ін'єкцій, фармацевтично прийнятне середовище, спиртову вату, бинт, інструкцію, яка описує застосування, тощо можна також необов'язково запакувати у набори.

Усі документи з попереднього рівня, які згадані у цьому описі, включено до нього шляхом посилання.

Далі цей винахід буде більш докладно описано з посиланням на Приклади, проте їх не слід вважати обмежувальними.

Приклад 1. Приготування не нейтралізуючого антитіла проти фактора IXa (F.IXa).

1-1. Імунізація та приготування гібридом.

Вісім мишей BALB/c (самці, віком 6 тижнів на початку імунізації (Charles River, Japan)) та п'ять мишей MRL/lpr (самці, віком 6 тижнів на початку імунізації (Charles River, Japan)) імунізували фактором IXa людини (Enzyme Research Laboratories, Inc.) нижчеописаним способом. Як початкову імунізацію, фактор IXa (40 мг/тварину), емульсований в FCA (повний ад'ювант Фрейнда H37 Ra (Difco laboratories)), ввели шляхом підшкірної ін'єкції. За два тижні фактор IXa (40 мг/тварину), емульсований в FIA (неповний ад'ювант Фрейнда (Difco laboratories)), ввели шляхом підшкірної ін'єкції. Після цього здійснювали від трьох до семи підсилюючих імунізацій з інтервалом в один тиждень. Після того, як ЕЛАЙЗА (ELISA - твердофазний імуноферментний аналіз), описаний у 1-2, підтвердив, що титр антитіла у плазмі проти фактора IXa підвищився, фактор IXa (40 мг/тварину), розведений у PBS(-) (сольовому розчині з фосфатним буфером, вільному від іону кальцію та іону магнію), ввели шляхом підшкірної ін'єкції як кінцеву імуноацію. Через три дні після кінцевої імунізації у

мишей видалили селезінки. У той час, коли частини їх застосовувалися у Прикладі 10-2, решту клітин селезінки злили з клітинами мієломи мишей P3X63Ag8U.1 (позначаються як P3U1, ATCC CRL-1597) за стандартним способом, застосовуючи PEG1500 (Roche Diagnosticb). Злиті клітини, суспендовані у середовищі RPMI1640 (Invitrogen), що містило 10% FBS (Invitrogen) (далі позначатиметься як 10% FBS/RPMI1640), висіяли в культуральний планшет з 96 лунками та через 1, 2, 3 та 5 днів після злиття середовище замінили елективним ГАТ-середовищем (HAT) (10% FBS/RPMI1640/2% HAT 50x концентрат (Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd)/ 5% BM-Condimed H1 (Roche Diagnostics), щоб селективно культивувати гібридами. Застосовуючи надосадові рідини, зібрані на 8-ий або 9-ий день після злиття, зв'язувальну активність фактора IXa вимірювали шляхом ЕЛАЙЗА, описаному у 1-2, щоб відібрати гібридами, що мають зв'язувальну активність фактора IXa. Послідовно, активність нейтралізації ферментативної активності фактора IXa вимірювали за способами, описаними у 1-3, щоб відібрати гібридами, які не мають активності щодо нейтралізації фактора IXa. Гібридами клонували двічі, виконуючи обмежувальні розведення, при яких одна клітина висівається у кожен лунку культурального планшета з 96 лунками. Клітини єдиної колонії, визначенні шляхом спостереження під мікроскопом, зазнали ЕЛАЙЗА, та для відбору клонів виконували аналіз нейтралізувальної активності, описаний у 1-2 та 1-3. Асцитну рідину, що містила клоноване антитіло, одержали за способом, описаним в 1-4, та це антитіло очистили від асцитної рідини. Очищене антитіло було неспроможним подовжувати активованій частковий тромбопластиновий час (APTT), та це було підтверджено за способом, описаним в 1-5.

#### 1-2. ЕЛАЙЗА фактора IXa

Фактор IXa розвели до 1 мг/мл буфером покриття (100 мМ бікарбонату натрію, pH 9,6, 0,02% азиду натрію) та розподілили на планшеті Nunc-Immuno (Nunc-Immuno™ 96 Micro Well™ plates MaxiSorp™ (Nalge Nunc International)) по 100 мкл/лунку. Потім планшет інкубували при 4°C протягом ночі. Після триразового промивання планшета PBS(-), що містив Tween® 20, його блокували буфером-розріджувачем (50 мМ Tris-HCl, pH 8,1, 1% альбуміну бичачої сироватки, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,15 М NaCl, 0,05% Tween® 20, 0,02% азид ртрію) при кімнатній температурі протягом 2 годин. Після видалення буфера розведену буфером-розріджувачем антисироватку миші або культуральну надосадову рідину гібрчдами додали по 100 мкл/лунку та інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Після триразового промивання планшета додали антимишачий IgG (H+L) козла, мічений лужною фосфатазою (Zymed Laboratories), який розвели до 1/2000 буфером-розріджувачем, по 100 мкл/лунку та інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Після промивання планшета шість разів колориметричний субстрат Blue-Phos™ Phosphate Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories) додали по 100 мкл/лунку та інкубували при кімнатній температурі протягом 20 хвилин. Після додавання Blue-Phos™

Stop Solution (Kirkegaard & Perry Laboratories) (100 мкл/лунку) вимірювали поглинання при 595 нм за допомогою Model 3550 Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories).

#### 1-3. Вимірювання нейтралізуючої активності фактора IXa

Фосфоліпід (Sigma-Aldrich) розчинили у дистильованій воді для ін'єкцій, а потім піддали ультразвуковому опромінюванню, щоб приготувати фосфоліпідний розчин (400 мкг/мл). Tris-забуферений сольовий розчин, що містив 0,1% альбуміну бичачої сироватки (далі застосовується скорочення TBSB) (40 мкл), 30 нг/мл фактора IXa (Enzyme Research Laboratories) (10 мкл), 400 мкг/мл фосфоліпідного розчину (5 мкл), TBSB, що містив 100 мМ CaCl<sub>2</sub> та 20 мМ MgCl<sub>2</sub> (5 мкл), та культуральну надосадову рідину гібридами (10 мкл), змішали у планшеті з 96 лунками та інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. У цей змішаний розчин додали 50 мкг/мл фактора X (Enzyme Research Laboratories) (20 мкл) та 3 одиниці/мл фактора Villa (American diagnostica) (10 мкл) та залишили реакційну суміш при кімнатній температурі на 30 хвилин. Реакцію припинили шляхом додавання 0,5 М ЕДТК (10 мкл). Після додавання розчину S-2222 (50 мкл; Chromogenix) та інкубації при кімнатній температурі протягом 30 хвилин виміряли поглинання при довжині хвилі вимірювання 405 нм та контрольній довжині хвилі 655 нм на Model 3550 Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

#### 1-4. Одержання асцитної рідини та очищення антитіла

Асцитну рідину, утворення якої викликають отримані гібридами, одержали згідно зі стандартними процедурами. А саме, гібридами культивували in vitro (2 x 10<sup>6</sup>) та трансплантували у черевну порожнину мишей BALB/c (самці, віком від 5 до 7 тижнів на початку експерименту, Japan Charles River) або "голих" мишей BALB/c (самки, віком від 5 до 6 тижнів на початку експерименту, Japan Charles River and Japan CLEA), яким до початку двічі вводили інтраперитонеальним способом пристан (2,6,10,14г тетраметилпентадекан, WAKO Pure Chemical Industries). Через 1 - 4 тижні після трансплантації асцитну рідину зібрили від миші з роздутим животом.

Антитіло очистили від асцитної рідини, застосовуючи колонку Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow (Amersham Biosciences). Асцитну рідину двічі розвели зв'язувальним буфером (20 мМ ацетат натрію, pH 5,0) та перенесли до колонки, яку промили 10 об'ємами колонки зв'язувального буфера. Антитіло елюювали 5 об'ємами колонки буфера елюювання (0,1 М гліцин-HCl, pH 2,5) та нейтралізували буфером нейтралізації (1 М Tris-HCl, pH 9,0). Отриманий розчин концентрували, застосовуючи Centrprep™ 10 (Millipore) та розчинник замінили TBS (50 мМ сольовий розчин з Tris-буфером). Концентрацію антитіла підраховали за поглинанням при 280 нм з A (1%, 1 см) = 13,5. Поглинання вимірювали на приладі DU-650 (Beckman Coulter).

#### 1-5. Вимірювання активованого часткового тромбопластинового часу (APTT)

Активованний частковий тромбопластиновий час вимірювали CR-A (Amelung)-з'єднаним KC10A (Amelung). Суміш розчину антитіла, розведеного TBSB (50 мкл), стандартної плазми людини (Dade Behring) (50 мкл) та реагенту APTT (активованого часткового тромбопластинового часу) (Dade Behring) (50 мкл) нагрівали при температурі 37°C протягом 3 хвилин. У цю суміш додали 20 мМ CaCl<sub>2</sub> (Dade Behring) (50 мкл), щоб розпочати реакцію згортання, та вимірювали час згортання.

Приклад 2. Приготування антитіла, що нейтралізує не-фактор X (F.X)

#### 2-1. Імунізація та приготування гібридоми

Вісім мишей BALB/c (самці, віком 6 тижнів на початку імунізації (Japan Charles River)) та п'ять мишей MRL/lpr (самці, віком 6 тижнів на початку імунізації (Japan Charles River)) імунізували фактором X людини (Enzyme Research Laboratories, Inc.) за нижчеописаним способом. Як початкову імунізацію, фактор X (40 мг/тварину), емульсований в FCA (повний ад'ювант Фрейнда) ввели шляхом підшкірної ін'єкції. Через два тижні фактор X (20 або 40 мг/тварину), емульсований в FIA (неповний ад'ювант Фрейнда), ввели шляхом підшкірної ін'єкції. Після цього здійснювали від трьох до семи підсилюючих імунізацій з інтервалом в один тиждень. Після того, як ЕЛАЙЗА (твердофазний імуноферментний аналіз), описаний у 2-2, підтвердив, що титр антитіла у плазмі проти фактора X підвищився, фактор X (20 або 40 мг/тварину), розведений у PBS(-), ввели шляхом підшкірної ін'єкції як кінцеву імунізацію. Через три дні після кінцевої імунізації у мишей видалили селезінки. У той час, коли частина їх застосовувалася у Прикладі 10-2, решту клітин селезінки злили з клітинами мієломи мишей P3U1 за стандартним способом, застосовуючи PEG 1500. Злиті клітини, суспендовані у середовищі 10%FBS/RPMI1640, висіяли в культивувальний планшет з 96 лунками та гібридами селективно культивували шляхом заміщення середовища елективним ГАТ-середовищем через 1,2,3 та 5 днів після злиття. Застосовуючи надосадові рідини, зібрані на 8-ий або 9-ий день після злиття, зв'язувальну активність стосовно фактора X вимірювали шляхом ЕЛАЙЗА, описаному у 2-2. Гібридами, що мали зв'язувальну активність фактора X, відбирали, та їх активність до нейтралізації ферментативної активності фактора Ха вимірювали способом, описаним у 2-3. Гібридами, що не мали нейтралізуючої активності до фактора Ха, клонували шляхом здійснення; обмежувального розведення двічі.

Асцитну рідину, що містила клоноване антитіло, одержали за способом, описаним в 1-4, та це антитіло очистили від асцитної рідини. Очищене антитіло було неспроможним подовжувати активований частковий тромбопластиновий час (APTT), та це було підтверджено способом, описаним в 1-5.

#### 2-2. ЕЛАЙЗА фактора X.

Фактор X розвели до 1 мг/мл буфером покриття та розподілили на планшеті Nunc-Immuno по 100 мкл/лунку. Потім планшет інкубували при 4°C протягом ночі. Після триразового промивання планшета PBS(-), що містив Tween<sup>(R)</sup> 20, його бло-

кували буфером-розріджувачем при кімнатній температурі протягом 2 годин. Після видалення буфера розведену буфером-розріджувачем антисироватку миші або культуральну надосадову рідину гібридами додали у планшети та інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Після триразового промивання планшета додали антимишачий IgG (H+L) козла, мічений лужною фосфатазою, який розвели до 1/2000 буфером-розріджувачем, та інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Після промивання планшета шість разів колориметричний субстрат Blue-Phos<sup>TM</sup> Phosphate Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories) додали по 100 мкл/лунку та інкубували при кімнатній температурі протягом 20 хвилин. Після додавання Blue-Phos<sup>TM</sup> Stop Solution (Kirkegaard & Perry Laboratories) (100 мкл/лунку) вимірювали поглинання при 595 нм за допомогою Model 3550 Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories).

#### 2-3. Вимірювання активності нейтралізації фактора IXa

Культуральну надосадову рідину гібридами, розведену до 1/5 TBSB (10 мкл), змішали з 40 мкл TBCP (TBSB, що містив 2,78 мМ CaCl<sub>2</sub> та 22,2 мМ фосфоліпідів (фосфатидилхол:фосфатидилсерин = 75:25, Sigma-Aldrich), що містив 250 пг/мл фактора Ха (Enzyme Research Laboratories), та інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. У цей змішаний розчин додали TBCP (50 мкл), що містив протромбін (Enzyme Research Laboratories) (20 мкг/мл) та 100 нг/мл активованого фактора згортання V (фактор Va (Haematologic Technologies)), та реакційну суміш залишили при кімнатній температурі на 10 хвилин. Реакцію припинили шляхом додавання 0,5 М ЕДТК (10 мкл). У цей реакційний розчин додали 1 мМ розчину S-2238 (Chromogenix) (50 мкл), а після інкубації при кімнатній температурі протягом 30 хвилин вимірювали поглинання при 405 нм за допомогою Model 3550 Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories).

Приклад 3. Побудова вектору експресії химерного біспецифічного антитіла.

#### 3-1. Приготування фрагментів ДНК, що кодують варіабельну область антитіла, з гібридом.

Загальну РНК гібридом, які виробляють антитіло до F.IXa або антитіло до F.X, екстрагували, застосовуючи QIAGEN<sup>®</sup> Rneasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN) згідно зі способом, описаним в інструкції. Загальну РНК розчинили у стерильній воді (40 мкл). Одноланцюгову кДНК синтезували шляхом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскриптазою (RT-PCR), застосовуючи систему синтезу кДНК Superscript (Invitrogen) з очищеною РНК (від 1 до 2 мкг) як матриці згідно зі способом, описаним в інструкції.

#### 3-2. Ампліфікація шляхом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) варіабельної області Н-ланцюга антитіла та аналіз послідовності.

Як праймери для ампліфікації кДНК варіабельної області Н-ланцюга (VH) антитіла миші приготували праймерну суміш HB та праймерну суміш HF, які описані у статті Krebber'азі співавторами (J. Immunol. Methods 1997; 201: 35-55). Застосовуючи

по 0,5 мкл кожної з 100 мкМ праймерної суміші HB та 100 мкМ праймерної суміші HF, приготували реакційний розчин (25 мкл) (розчин кДНК, одержаний у 3-1 (2,5 мкл), KOD плюс буфер (TOYOBO), 0,2 мМ dNTP, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,75 одиниці ДНК-полімерази KOD плюс (TOYOBO)). Застосовуючи систему 9700 PCR термолунки GeneAmp (Parkin Elmer), PCR виконували згідно з ефективністю ампліфікації фрагментів кДНК в умовах А (нагрівання протягом 3 хвилин при 98°C з наступними 32 циклами реакції (98°C, 20 секунд, 58°C, 20 секунд, та 72°C, 30 секунд, в одному циклі)) або умовах В (нагрівання протягом 3 хвилин при температурі 94°C з наступними 5 циклами реакції (94°C, 20 секунд, 46°C, 20 секунд, та 68°C, 30 секунд, в одному циклі)) та 30 циклами реакції (94°C, 20 секунд, 58°C, 20 секунд, та 72°C, 30 секунд, в одному циклі)). Після PCR реакційний розчин піддали електрофорезу на 1% агарозному гелі. Ампліфіковані фрагменти бажаного розміру (приблизно 400 п. н.) очистили, застосовуючи набір QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) згідно зі способами, описаними в інструкції, що додається до нього, та елюювали стерильною водою (30 мкл). Нуклеотидні послідовності фрагментів ДНК визначили із застосуванням набору BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) на секвенаторі ДНК ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) згідно зі способом, описаним в інструкції, що додається до нього. Групи послідовностей, визначені цим способом, піддали порівняльному аналізу із застосуванням аналітичного програмного забезпечення GENETYX-SV/RC Version 6.1 (Genetyx) та відбирали ДНК з різними послідовностями.

3-3. Приготування фрагментів ДНК варіабельної області антитіла для клонування.

Наступну процедуру виконували, щоб додати сайти розщеплення Sfi I ферментом рестрикції до обох кінців фрагментів ампліфікації варіабельної області антитіла для клонування.

Для того, щоб ампліфікувати фрагменти VH, доповнені сайтом розщеплення Sfi I (Sfi I-VH), приготували праймер (праймер УН-5'-кінця), у якому послідовність лінкера (Gly4Ser)<sub>2</sub> праймера HB замістили послідовністю, що містить сайт розщеплення Sfi I (послідовність № 5). Застосовуючи 0,5 мкл кожного з 10 мкМ праймеру УН-5'-кінця, специфічного для послідовності, та 10 мкМ праймеру scfor (J. Immunol. Methods 1997; 201: 35-55), приготували реакційний розчин (20 мкл) (очищений розчин фрагмента ампліфікації кДНК VH, одержаного у 3-2 (1 мкл), KOD плюс буфер (TOYOBO), 0,2 мМ dNTPs, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 одиниць ДНК-полімерази KOD плюс (TOYOBO)). Застосовуючи систему 9700 PCR термолунки GeneAmp (Parkin Elmer), PCR виконували згідно з ефективністю ампліфікації фрагментів кДНК в умовах А (нагрівання протягом 3 хвилин при 98°C з наступними 32 циклами реакції (98°C, 20 секунд, 58°C, 20 секунд, та 72°C, 30 секунд, в одному циклі)) або в умовах В (нагрівання протягом 3 хвилин при температурі 94°C з наступними 5 циклами реакції (94°C, 20 секунд, 46°C, 20 секунд, та 68°C, 30 секунд, в одному циклі)) та 30 циклами реакції

(94°C, 20 секунд, 58°C, 20 секунд, та 72°C, 30 секунд, в одному циклі)). Після PCR реакційний розчин піддали електрофорезу на 1% агарозному гелі. Ампліфіковані фрагменти бажаного розміру (приблизно 400 п. н.) очистили, застосовуючи набір QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) згідно зі способами, описаними в інструкції, що додається до нього, та елюювали стерильною водою (30 мкл).

Для того, щоб ампліфікувати фрагменти кДНК варіабельної області L-ланцюга (VL) антитіла миші, по-перше, застосовували по 0,5 мкл кожної з 100 мкМ праймерної суміші LB та 100 мкМ праймерної суміші LF, які описані у статті Krebber'a зі співавторами (J. Immunol. Methods 1997; 201: 35-55), та приготували реакційний розчин (25 мкл) (розчин кДНК, одержаний у 3-1, KOD плюс буфер (TOYOBO), 0,2 мМ dNTP, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,75 одиниці ДНК-полімерази KOD плюс (TOYOBO)). Застосовуючи систему 9700 PCR термолунки GeneAmp (Parkin Elmer), PCR виконували згідно з ефективністю ампліфікації фрагментів в умовах нагрівання протягом 3 хвилин при 94°C з наступними 5 циклами реакції (94°C, 20 секунд, 46°C, 20 секунд, та 68°C, 30 секунд, в одному циклі)) та 30 циклами реакції (94°C, 20 секунд, 58°C, 20 секунд, та 72°C, 30 секунд, в одному циклі)). Після PCR реакційний розчин піддали електрофорезу на 1% агарозному гелі. Ампліфіковані фрагменти бажаного розміру (приблизно 400 п. н.) очистили, застосовуючи набір QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) згідно зі способами, описаними в інструкції, що додається до нього, та елюювали стерильною водою (30 мкл). Фрагменти знаходяться у стані, при якому послідовність лінкера (Gly4Ser)<sub>3</sub>, що походить від праймеру LF, додається до їх С-кінців. Для того, щоб додати сайт розщеплення Sfi I до С-кінців фрагментів, приготували праймер (праймер VL-3'-кінця), у якому послідовність лінкера (Gly4Ser)<sub>3</sub> праймеру LF замістили послідовністю, що має сайт розщеплення Sfi I (послідовність № 6). Для того, щоб ампліфікувати фрагменти VL, доповнені сайтом розщеплення Sfi I (Sfi I-VL), застосовували по 0,5 мкл кожної з 10 мкМ праймерної суміші VL-3'-кінця та 10 мкМ праймеру scback та приготували реакційну суміш (20 мкл) (очищений розчин фрагмента ампліфікації кДНК VL (1 мкл) KOD плюс буфер (TOYOBO), 0,2 мМ dNTP, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 одиниці ДНК-полімерази KOD плюс (TOYOBO)). PCR виконували, застосовуючи систему 9700 PCR термолунки GeneAmp (Parkin Elmer), в умовах нагрівання протягом 3 хвилин при 94°C з наступними 5 циклами реакції (94°C, 20 секунд, 46°C, 20 секунд, та 68°C, 30 секунд, в одному циклі)) та 30 циклами реакції (94°C, 20 секунд, 58°C, 20 секунд, та 72°C, 30 секунд, в одному циклі)). Після PCR реакційний розчин піддали електрофорезу на 1% агарозному гелі. Ампліфіковані фрагменти бажаного розміру (приблизно 400 п. н.) очистили, застосовуючи набір QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) згідно зі способами, описаними в інструкції, що додається до нього, та елюювали стерильною водою (30 мкл).

Очищені фрагменти Sfi I-VH та Sfi I-VL перетравлювали Sfi I (Takara Bio) при 50°C протягом

ночі у реакційному розчині, приготованому згідно зі способом, описаним в доданій інструкції. Далі реакційний розчин очистили, застосовуючи набір QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) способом, описаним в інструкції, що додається до нього, та елюювали буфером Buffer EB (30 мкл), який включено у набір. 3-4. Плазмідна експресія біспецифічного антитіла IgG.

При виробництві біспецифічного антитіла IgG, яке представляє інтерес, посилалися на спосіб "виступи-в-отвори" IgG1 (Ridgway et al., Protein Eng. 1996; 9: 617-621), коли готували IgG4 з частиною CH3, заміщеною амінокислотою, для утворення гетеромолекул для кожного Н-ланцюга. Тип а (IgG4<sub>уа</sub>) заміщується Y349C та T366W, а тип b (IgG4<sub>уb</sub>) заміщується E356C, T366S, L368A та Y407V. Крім того, також вводили заміщення (-rrcrScp- -> -rrcrPcr-) на шарнірних ділянках обох типів. Майже усі Н-ланцюги стали гетеромолекулами завдяки цьому способу; проте, це необов'язково застосовувати до L-ланцюгів, а утворення необов'язкових молекул антитіла може впливати на подальші вимірювання активності. Отже, для того, щоб окремо експресувати гілки кожної молекули антитіла (далі називається "молекула HL"), які мають різну специфічність, та ефективно утворювати тип біспецифічного антитіла IgG, яке представляє інтерес, усередині клітин, ті, які можна індукувати різними ліками, застосовувалися як вектори експресії для кожної молекули HL.

Як вектор експресії для гілки молекули антитіла (для зручності називається права гілка молекули HL) приготували pcDNA4-g4H або pcDNA4-g4L (фігура 1 або фігура 2), у яких відповідна область Н-ланцюга або L-ланцюга, тобто відповідна варіабельна область антитіла миші (VH або VL) та константна область IgG4<sub>уа</sub> людини (послідовність № 7) або константна область κ (послідовність № 8), були включені в індуктивний тетрацикліном вектор pcDNA4 (Invitrogen) після сигнальної послідовності (IL3ss) для тваринних клітин (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984; 81:1075). По-перше, Eco RV та Not I (Takara Bio) застосовували для перетравлення pcDNA4 на сайтах розщеплення ферментом рестрикції, які існують у його багато-клонувальному сайті. Одиницю експресії Н-ланцюга або L-ланцюга правої гілки (приблизно 1,6 т. п. н. або приблизно 1,0 т. п. н. відповідно) химерного біспецифічного антитіла, що має відповідні варіабельні області антитіла, перетравлювали Xho I (Takara Bio). Потім її очистили із застосуванням набору QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) за способом, описаним в інструкції, що додається до нього, та виконали її реакцію з ДНК-полімеразою KOD (TOYOBO) при 72°C протягом 10 хвилин у композиції реакційного розчину, описаному в інструкції, що додається, щоб "затупити" кінці. Фрагменти з тупими кінцями очистили із застосуванням набору QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) за способом, описаним в інструкції, що додається до нього, та перетравили Not I (Takara Bio). Перетравлений Not I фрагменти з тупими кінцями (приблизно 1,6 т. п. н. або 1,0 т. п. н. відповідно) та pcDNA4, перетравлений Eco RV/Not I, піддали реакції зшивання, застосовуючи Ligation High (TOYOBO) згідно зі

способом, описаним в інструкції, що додається. Штам *E. coli* DH5α (компетентний високий DH5α (TOYOBO)) трансформували вищеописаним реакційним розчином. Зі стійких до ампіциліну клонів, отриманих таким способом, виділили відповідні плазмідні ДНК, застосовуючи набір QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

Як вектор експресії для іншої гілки молекули антитіла (для зручності називається ліва гілка молекули HL) приготували pIND-g4H або pIND-g4L (фігура 2 або фігура 3) згідно з вищеописаним способом, у яких відповідна область Н-ланцюга або L-ланцюга, тобто відповідна варіабельна область антитіла миші (VH або VL) та константна область IgG4<sub>уb</sub> людини (послідовність № 9) або константна область κ (послідовність № 8), були включені в індуктивний вектор pIND аналогу екдизону (Invitrogen) після сигнальної послідовності (IL3ss) для тваринних клітин (EMBO. J. 1987; 6:2939), та виділили відповідні плазмідні ДНК.

3-5. Побудова вектора експресії біспецифічного антитіла

Плазмідну експресії такого типу, що індукується тетрацикліном, приготовану у 3-4 (pcDNA4-g4H або pcDNA4-g4L), перетравлювали Sfi I та її піддали електрофорезу на 1% агарозному гелі. Фрагменти (приблизно 5 т. п. н.), що не мали внутрішньої частини варіабельної області антитіла (VH або VL (дивись фігуру 1 або фігуру 2), очистили, застосовуючи набір QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), за способом, описаним в інструкції, що додається до нього, та елюювали стерильною водою (30 мкл). Фрагменти та відповідний фрагмент Sfi I-VH або Sfi-VL, що походить з антитіла до F.IXa, перетравленого Sfi I, приготованого в 3-3, піддали реакції зшивання, застосовуючи набір Quick Ligation Kit (New England Biolabs), за способом, описаним в інструкції, що додається до нього. Штам *E. coli* DH5α (компетентний високий DH5α (TOYOBO)) трансформували вищеописаним реакційним розчином. Далі, подібним способом включили фрагменти, отримані шляхом видалення частини варіабельної області антитіла подібним способом, як описано вище (VH або VL (дивись фігуру 2 або 3)), з перетравленої Sfi I плазмідної експресії (pIND-g4H або pIND-4GL) такого типу, що індукується аналогом екдизону, приготованої у 3-4, та відповідний перетравлений Sfi I фрагмент Sfi I-VH або Sfi I-VL, що походить з антитіла до F.X.

У кожному стійкому до ампіциліну трансформанті, отриманому таким чином, вставку фрагмента, який представляє інтерес, підтвердили методом PCR колонії, застосовуючи праймери, які утворюють "сандвіч" з інсерційного фрагмента. По-перше, для химерного вектора експресії Н-ланцюга або L-ланцюга антитіла до F.IXa синтезували 21-мерний праймер CMVF (послідовність № 10), який гібридизується з переднім сайтом приміювання CMV перед сайтом інсерції, та 18-мерний праймер BGHR (послідовність № 11), який гібридизується зі зворотним сайтом приміювання BGH після сайту інсерції (Sigma Genosys). Для химерного вектора експресії Н-ланцюга або L-ланцюга антитіла до F.X синтезували 24-мерний праймер EcdF (послідовність № 12), який гібридизується

перед сайтом інсерції, та 18-мерний праймер BGHR (послідовність № 11), який гібридується зі зворотним сайтом приміювання BGH після сайту інсерції (Sigma Genosys). Для PCR колонії приготували реакційний розчин (20 мкл) (0,2 мкл праймеру (10 мкМ), штрих-буфер KOD (TOYOBO), 0,2 мМ dNTPs та 0,75 одиниці ДНК-полімерази штрих KOD) (TOYOBO)). У цей реакційний розчин додали клітини штаму трансформанту у відповідній кількості та виконували PCR. PCR виконували, застосовуючи систему 9700 PCR термолунки GeneAmp (Parkin Elmer) в умовах нагрівання протягом 1 хвилини при 96°C з наступними 30 циклами реакції (96°C, 10 секунд, 55°C, 10 секунд, та 72°C, 30 секунд, в одному циклі). Після PCR реакційний розчин піддали електрофорезу на 1% агарозному гелі та після цього відібрали клони, з яких отримали фрагменти ампліфікації бажаного розміру. Продукт PCR обробили ExoSAP-IT (Amersham Biosciences), щоб дезактивувати надлишок праймерів та dNTPs згідно з інструкцією, що додається. Нуклеотидні послідовності фрагментів ДНК визначили, застосовуючи набір BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), на секвенаторі ДНК ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) згідно зі способом, описаним в інструкції, що додається до нього. Групи послідовностей, визначені цим способом, проаналізували за допомогою аналітичного програмного забезпечення GENETYX-SV/RC Version 6.1 (Genetyx). Для VH відібрали клони, які представляють інтерес та які не мали інсерції, делеції або мутації. Для VL, відмінної від псевдогена VL, що походить з P3U1 та застосовується в гібридомах, відібрали клони, які представляють інтерес та які не мали інсерції, делеції або мутації.

З клонів, що представляють інтерес, виділили відповідну плазмідну ДНК, застосовуючи набір QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), а потім розчинили у стерильній воді (100 мкл). Химерний вектор експресії Н-ланцюга антитіла до F.IXa, химерний вектор експресії L-ланцюга антитіла до F.IXa, химерний вектор експресії Н-ланцюга антитіла до F.X та химерний вектор експресії L-ланцюга антитіла до F.X назвали pcDNA4-g4IXaHn, pcDNA4-g4IXaLn, pIND-g4XHn та pIND-g4XLn, відповідно. Кожний плазмідний розчин зберігали при 4°C до застосування.

Приклад 4. Експресія химерних біспецифічних антитіл у тваринних клітинах.

#### 4-1. Приготування розчинів ДНК.

Експресію векторів експресії правої гілки молекули НL антитіла (pcDNA4-g4IXaHn та pcDNA4-g4IXaLn) індукували тетрацикліном. У відсутності тетрацикліну для повної супресії їх експресії необхідна плазміда, що кодує Tet-репресор, pcDNA6/TR (Invitrogen). Далі експресію векторів експресії лівої гілки молекули НL антитіла (pIND-g4XHn та pIND-g4XLn) індукували аналогом гормону екдизону комах (понастерон А). Для цього потрібна плазміда pVgRXR (Invitrogen), яка кодує рецептор екдизону та ретиноїдний рецептор X, які реагують з понастероном А та індукують експресію. Отже, для трансфекції тваринних клітин приготували суміш шести типів плазмідних ДНК. Для 1

мл клітинної культури застосовували pcDNA4-g4IXaHn, pcDNA4-g4IXaLn, pIND-g4XHn та pIND-g4XLn (218,8 нг кожної), а також pcDNA6/TR та pVgRXR (1312,5 нг кожної).

#### 4-2. Трансфекція тваринних клітин

Штам HEK293H (Invitrogen), що походить з зародкових клітин карциноми нирок людини, суспендували у культуральному модифікованому за способом Дульбеко середовищі Ігла (Invitrogen), яке містило 10% FCS (MOREGATE), та його 1 мл висіляли з щільністю клітин  $5 \times 10^5$  клітин/мл у кожну лунку 12-лункового планшета для адгезивних клітин (CORNING) та культивували в інкубаторі з CO<sub>2</sub> (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Суміш плазмідних ДНК, приготувану у 4-1, додали до суміші реагентів трансфекції, Lipofectaine 2000 (Invitrogen) (7 мкл) та середовища Opti-MEM I (Invitrogen) (250 мкл), та залишили при кімнатній температурі на 20 хвилин. Отриману суміш додали до клітин у кожну лунку та інкубували протягом 4-5 годин в інкубаторі з CO<sub>2</sub> (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### 4-3. Індукція експресії біспецифічного антитіла IgG

Культуральне середовище видалили шляхом відсмоктування з культури трансфектованих клітин, описаній вище, а потім додали 1 мл середовища CHO-S-SFM-II (Invitrogen), що містило 1 мкг/мл тетрацикліну (Wako Pure Chemical Industries). Отриману суміш інкубували протягом одного дня в інкубаторі з CO<sub>2</sub> (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), щоб індукувати первинну експресію правої гілки молекули НL антитіла. Потім, після видалення середовища шляхом відсмоктування, промивання 1 мл середовища CHO-S-SFM-II та додавання 1 мл середовища CHO-S-SFM-II, що містило 5 мкМ понастерону А (Invitrogen), суміш інкубували в інкубаторі з CO<sub>2</sub> (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) протягом 2 - 3 днів, та так індукували вторинну експресію лівої гілки молекули НL антитіла, щоб біспецифічне антитіло IgG вивільнюється у середовище. Культуральну надосадову рідину відновили та центрифугували (приблизно 200 г, 5 хвилин, при кімнатній температурі), щоб видалити клітини, та концентрували, застосовуючи Microcon<sup>(R)</sup> YM-50 (Millipore) за необхідністю. Зразок зберігали при 4°C до застосування.

Приклад 5. Кількісний аналіз концентрації IgG людини

Очищене афінне антитіло козла до IgG Fc (Cappel) людини довели до 1 мкг/мл за допомогою буфера покриття та імобілізували на планшеті Nunc-Immuno. Після блокування буфером розведення (D.B.) додали зразок культуральної надосадової рідини, розведеної придатним чином D.B. Далі, як стандартний зразок для рахування концентрації антитіла, подібним чином додали IgG4 людини (людиноподібне антитіло до TF, дивись WO 99/51743), розведене D.B. удвічі у серіях розведення до 11 стадій, починаючи з 1000 нг/мл. Після трьох промивань здійснили реакцію міченого лужною фосфатазою антилюдського IgG козла (Biosource International). Після п'яти промивань планшет забарвили, застосовуючи субстрат фосфатази Sigma 104<sup>(R)</sup> (Sigma-Aldrich) як хромогенний субстрат та вимірювали поглинання при 405 нм на планшет-ридері поглинання Model 3550 (Bio-

Rad Laboratories) з контрольною довжиною хвилі 655 нм. Застосовуючи програмне забезпечення Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories), концентрацію IgG людини у культуральній надосадовій рідині підраховували від стандартної кривої.

Приклад 6. Аналіз F.VIIIa-міметичної активності (активованого фактора згортання VIII)

F.VIIIa-міметичну активність біспецифічного антитіла проаналізували шляхом наступного ферментного аналізу. Усі наступні реакції виконувалися при кімнатній температурі. Суміш 40 мкл фактора IX (3,75 мкг/мл; Enzyme Research Laboratories) та 10 мкл розчину антитіла інкубували у 96-лунковому планшеті протягом 1 години. Потім для того, щоб ініціювати ферментативну реакцію, додали 10 мкл фактора XIa (10 нг/мл; Enzyme Research Laboratories), 20 мкл фактора X (50 мкг/мл; Enzyme Research Laboratories), 5 мкл фосфоліпиду (400 мкг/мл; дивись Приклади 1-3) та 15 мкл TBSB, що містило 5 mM CaCl<sub>2</sub> та 1 mM MgCb (далі скорочено позначається TBSB-S). Через 30 хвилин реакцію припинили шляхом додавання 10 мкл 0,5 ЕДТК.

Після додавання розчину колориметричного субстрату (50 мкл) у кожну лунку вимірювали поглинання при 405 нм (контрольна довжина хвилі 655 нм) одразу та протягом 30 хвилин за допомогою Model 3550 Microplate Reader (Bio Rad Laboratories). F.VIIIa-міметичну активність представили як значення, отримане шляхом віднімання значення зміни поглинання за 30 хвилин без додавання антитіла від такого ж значення, але з додаванням антитіла (дивись фігуру 4 та фігуру 5).

TBSB застосовували як розчинник для фосфоліпідів, тоді як TBSB-S застосовували як розчинник для фактора XIa, фактора IX та фактора X. Розчин колориметричного субстрату був сумішшю 1:1 колориметричного субстрату "Tesutochimu" S-2222 (Chromogenix), розчиненого згідно з інструкцією, що додається, та розчину полібрену (0,6 мг/л гексаметринброміду (Sigma)).

Далі виміряли залежність концентрації F.VIIIa-міметичної активності XB12/SB04, яка була найвищою серед усіх (фігура 6).

Приклад 7. Аналіз згортання плазми

Для того, щоб визначити, чи корегує біспецифічне антитіло спроможність крові згортатися при гемофілії А, досліджували вплив біспецифічного антитіла на активований частковий тромбопластиновий час (АРТТ), застосовуючи плазму, позбавлену F.VIII. Змішаний розчин, що включав розчин антитіла при різних концентраціях (50 мкл), плазму, позбавлену F.VIII (50 мкл; Biomerieux), та реагент АРТТ (50 мкл; Dade Behring), нагрівали при 37°C протягом 3 хвилин. Реакцію згортання ініціювали шляхом додавання 20 mM CaCl<sub>2</sub> (50 мкл; Dade Behring) до вищевказаної суміші. Час, потрібний для згортання, вимірювали KC10A (Amelung), з'єднаним з CR-A (Amelung) (фігура 7 та фігура 8).

Далі XB12/SB04, що демонструвало найвищу активність до скорочення часу згортання, вимірювали щодо його залежності від концентрації (фігура 9).

Приклад 8. Очищення антитіла

Культуральну надосадову рідину (10 мл),

отриману за способом, описаним у Прикладі 4, концентрували до 1 мл за допомогою Centricon<sup>(R)</sup> YM-50 (Millipore). У цей концентрат додали 10% BSA (10 мкл), 1% Tween<sup>(R)</sup> 20 (10 мкл), та rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (Amersham Biosciences) (100 мкл) та розчин змішували шляхом перевертання при 4°C протягом ночі. Розчин перенесли у чашку з фільтром 0,22 мкм Ultrafree<sup>(R)</sup>-MC (Millipore) та після триразового промивання TBS, що містив 0,01% Tween<sup>(R)</sup> 20 (500 мкл), смоли rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> суспендували у 100 мкл 10 mM HCl/0,01% Tween<sup>(R)</sup> 20 (pH 2,0) та залишили настоюватися протягом 3 хвилин. Потім антитіло елюювали та елюат негайно нейтралізували шляхом додавання 5 мкл 1 M Tris-HCl, pH 8,0. Застосовуючи програмне забезпечення Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories), підраховували концентрацію IgG людини зі стандартної кривої. Кількісний аналіз концентрації антитіла здійснювали згідно з Прикладом 5.

Приклад 9. Вестерн-блотинг GST-AP антитіла до F.X

Побудували злитий рекомбінантний білок, що експресує K Coli, активованого пептиду (AP) F.X з глутатіон S-трансферазою (GST). кДНК, що покриває ділянку транскрипції повної довжини F.X людини ампліфікували шляхом PCR з кДНК печінки людини Marathon-Ready (Clontech). Цю кДНК потім застосовували як матрицю для ампліфікації ділянки, що кодує ділянку AP шляхом PCG (Leytus et al., Biochemistry 1986; 25: 5098), яку субклонували у вектор pGEM-T (Promega), щоб отримати GST-AP-кодуючий pGEX-F10AP. E coli, трансформовану цією плазмідною, культивували та при оптичній щільності, яка дорівнювала 0,8, додали 1 mM IPTG, щоб індукувати експресію GST-AP. Після центрифугування культурального розчину (3000 x g, 30 хвилин, 4°C) клітини збирали та зберігали при -20°C до застосування.

Після ресуспендування клітинного осаду у 1/20 об'єму культури фосфатно-сольового буферного розчину (PBS) додали 2,4 мл буфера зразка SDS-PAGE (IWAKI) до кожного 0,1 мл суспензії, а отриману суміш кип'ятили при 95°C протягом 5 хвилин. Цей реакційний розчин (10 мкл) додали до кожної лунки з мінігелем 14% SDS-PAGE (Asahi Technoglass) та його піддали електрофорезу. Гель після електрофорезу перенесли на мембрану Immobilon-P<sup>TM</sup> Transfer Membrane (MILLIPORE), застосовуючи напівсухий блотер (BIO-RAD), та блокували BT-PBS (PBS, що містив 2% BSA (альбумін бичачої сироватки) та 0,05% Tween<sup>(R)</sup> 20). Після того, як блокування завершилося, він реагував протягом 1 години з антитілом SB04 або SB06 миші до F.X, очищеним у Прикладі 1-4 та розведеним BT-PBS до 3 мкг/мл. Після промивання фосфатно-сольовим буферним розчином (PBS), що містив 0,1% Tween<sup>(R)</sup> 20, протягом 1 години виконували реакцію мембрани з міченим лужною фосфатазою антимишачим IgG кози (H+L) (Zymed Laboratories), розведеним у 2000 разів BT-PBS. Після промивання PBS, що містив 0,05% Tween<sup>(R)</sup> 20, мембрану забарвили колориметричним субстратом BCIP/NBT Phosphatase Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories) (дивись фігуру 10).



Приклад 10. Отримання біспецифічного анти-тіла з бібліотеки scFv, яка походить з імунізованої мишачої селезінки

#### 10-1. Антиген та імунізація

Трьох мишей BALB/c (самці, віком 6 тижнів на початку імунізації (Japan Charles River)), 3 мишей MRL/lpr (самці, віком 6 тижнів на початку імунізації (Japan Charles River)) та 3 мишей C57BL/6N (самці, віком 6 тижнів на початку імунізації (Japan Charles River)) імунізували антигенним фактором IXa $\beta$  (Enzyme Research Laboratories, Inc.) або фактором X (Enzyme Research Laboratories, Inc.), як описано нижче. Як початкову імунізацію підшкірно вводили антиген (40 мкг/тварину), емульсований в FCA (повний ад'ювант Фрейнда H37 Ra (Difco laboratories)). Через два тижні підшкірно ввели антиген (40 мкг/тварину), емульсований в FIA (неповний ад'ювант Фрейнда, Difco laboratories).

Після цього здійснювали три підсилюючі імунізації з інтервалами в 1 тиждень та на 8-ий день після кінцевої імунізації у мишей видалили селезінки.

#### 10-2. Побудова бібліотеки фатів

Частину селезінки, які видалили у імунізованих мишей, приготованих у Прикладі 1 -1 та 2-1, та селезінки, які видалили у імунізованих мишей, приготованих у Прикладі 10-1, помістили у реагент Trizol Reagent (Invitrogen) (50 мг селезінки/мл реагенту) та гомогенізували, застосовуючи скляний гомогенізатор. Потім загальну РНК екстрагували згідно зі способом, описаним в інструкції, що додається. З розчину екстракту екстрагували polyA(+)РНК, застосовуючи набір PolyATract System 1000 (Promega) згідно зі способом, описаним в інструкції, що додається до нього. Синтезували кДНК методом RT-PCR (система Superscript Ш First-Strand Synthesis System для RT-PCR, Invitrogen) та зберігали при -20°C до застосування.

Як праймери для ампліфікації кДНК варіабельної області важкого ланцюга (VH) та варіабельної області легкого ланцюга (VL) антитіла миші, приготували праймерну суміш HB, праймерну суміш HF, праймерну суміш LB та праймерну суміш LF, які застосовували у Прикладах 3-2 та 3-3. Для ампліфікації VH приготували 50 мкл реакційного розчину (2,5 мкл розчину кДНК, KOD плюс буфер (TOYOBO), 0,2 мМ dNTP, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3,75 одиниці ДНК-полімерази KOD плюс (TOYOBO)), застосовуючи 1 мкл 100 мМ праймерної суміші HB та 100 мМ праймерної суміші HF. Далі для ампліфікації VL приготували 50 мкл реакційного розчину такого ж складу, як описано вище, застосовуючи 1 мкл 100 мМ праймерної суміші LB та 100 мМ праймерної суміші LF. PCR виконували, застосовуючи систему 9700 PCR термолунки GeneAmp (Parkin Elmer) при нагріванні протягом 3 хвилин при 98°C з наступними 32 циклами реакції (98°C, 20 секунд, 58°C, 20 секунд, та 72°C, 30 секунд, в одному циклі). Після PCR реакційний розчин піддали електрофорезу на 2% агарозному гелі. Ампліфіковані фрагменти такого розміру, який представляє інтерес, (приблизно 400 п. н.) очистили, застосовуючи набір QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) за способом, описаним в інструкції, що додається до нього, та елюювали

стерильною водою (50 мкл). Далі, для ампліфікації фрагмента scFv приготували 10 пробірок з 100 мкл реакційного розчину. (3 мкл розчину фрагмента VH, 3 мкл розчину фрагмента VL, KOD плюс буфер (TOYOBO), 0,2 мМ dNTP, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 одиниць ДНК-полімерази KOD плюс (TOYOBO)). Після першої PCR (нагрівання протягом 3 хвилин при 94°C з наступними 7 циклами реакції (94°C, 1 хвилина, та 63°C, 4 хвилини, в одному циклі)), додали 10 мМ праймера scfor та 10 мМ праймера scback (по 2,5 мкл кожного) до кожної пробірки, що були витримані при 63°C, а потім виконували другу PCR (нагрівання протягом 35 секунд при 94°C з наступними 30 циклами реакції (94°C, 2 хвилини, та 63°C, 2 хвилини, в одному циклі)). Після PCR реакційний розчин очистили, застосовуючи набір для очищення QIAquick PCR (QIAGEN), а очищені продукти перетравлювали ферментом рестрикції Sfi I (Takara Bio) при 50°C протягом ночі. Після того, як продукт перетравлення піддали електрофорезу на 2% агарозному гелі, ампліфіковані фрагменти розміром, який представляє інтерес (приблизно 800 п. н.), очистили, застосовуючи набір QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) за способом, описаним в інструкції, що додається до нього, та елюювали відповідною кількістю стерильної води. Для того, щоб scFv був присутнім на білку гена III фага, застосовували pELBGlacI (дивись фігуру 11) як фагемідний вектор. Після перетравлювання вектора (10 мкг) ферментом рестрикції Sfi I (Takara Bio) при 50°C протягом ночі, очистили фрагменти розщеплення розміром, який представляє інтерес (приблизно 5 п.н.), застосовуючи набір QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) способом, описаним в інструкції, що додається до нього, та елюювали відповідною кількістю стерильної води. Очищений продукт PCR та очищений фрагмент вектора піддали реакції зшивання при 16°C протягом ночі, застосовуючи Ligation High (TOYOBO) за способом, описаним в інструкції, що додається. Електрокомпетентні клітини E. coli XL1 Blue cells (Stratagene) або електромаксимальні DH12s (Invitrogen) трансформували, застосовуючи реакційний розчин, шляхом способу електропорації згідно зі способом, описаним в інструкції, що додається. Усі стійкі до ампіциліну трансформанти, отримані таким чином, зібрали та зберігали як реккомбінантну бібліотеку при -20°C до застосування.

Бібліотеку E. coli (2x10<sup>9</sup> КУО (колонієутворюючих одиниць)) інокулювали у 50 мл 2 x YTAG (2x TY, що містив 100 мкг/мл ампіциліну та 2% глюкози) та культивували при 37°C, доки OD 600 не досягла 0,4 - 0,54 x 10<sup>11</sup> фага-помічника VCSM13 (Stratagene) додали до культури, яку залишили стояти при 37°C протягом 15 хвилин для інфікування клітин. Інфіковані клітини культивували при 30°C протягом 10 годин, а потім додали 450 мл 2x YTAG (2x TY, що містив 100 мкг/мл ампіциліну та 25 мкг/мл канаміцину) та 25 мкл 1 моль/л IPTG. Культуральну надосадову рідину зібрали шляхом центрифугування, змішали з 100 мл розчину PEG-NaCl (10% поліетиленгліколь 8000, 2,5 моль/л NaCl) та залишили настоюватися при 4°C протягом 60 хвилин. Фат осадили шляхом центрифугування при 10800 x g протягом 30 хвилин та осад

суспендували у 40 мл води, змішали з 8 мл розчину PEG-NaCl та залишили настоюватися при 4°C протягом 1 години. Фат осадили шляхом центрифугування при 10800 x g протягом 30 хвилин та суспендували у 5 мл PBS, щоб отримати бібліотеку фата. Фат зберігали при 4°C до застосування.

10-3. Ковдентрація зв'язаного фага шляхом пенінгу

Фактор DCa $\beta$  або фактор X помітили біотином, застосовуючи No-Weigh Premeasured NHS-PEO<sub>4</sub>-Biotin Microtubes (Pierce). Мічені біотином фактор IXa $\beta$  або фактор X (100 пмоль) додали до розчину бібліотеки фата, приготованої у 10-2 (600 мкл) та залишили контактувати з антигеном протягом 60 хвилин. Dynabeads M-280 Streptavidin (600 мкл; DYNAL) промили 5% M-PBS (PBS, що містив 5%, маса/об'єм, знятого молока) та додали для зв'язування протягом 15 хвилин. Зв'язаний з гранулами фат промили декілька разів PBST (PBS, що містив 0,1% Tween 20; 1 мл), а потім PBS. Гранули суспендували у 0,8 мл 0,1 моль/л гліцину /HCl (pH 2,2) протягом 5 хвилин, щоб елювати фат.

Альтернативно, бібліотеку фата (80 мкл/лунку x 5), яку інкубували з 2,5%, маса/об'єм, знятого молока протягом 15 хвилин, додали до фактора Кар або фактора X (10 мкг/лунку x 5), іммобілізованого на імунопланшеті (MaxiSorp, Nunc), а потім концентрували антигеном протягом 60 хвилин. Зв'язаний з антигеном фат промили декілька разів PBST (PBS, що містив 0,1% Tween-20; 1 мл), а потім PBS. Зв'язаний фат інкубували з 0,8 мл 0,1 моль/л гліцину/HCl (pH 2,2) протягом 5 хвилин, щоб елювати фат.

Зібраний таким чином розчин фата нейтралізували шляхом додавання 2 моль/л Tris (45 мкл), додали до 10 мл клітин XL1-Blue у фазі логарифмічного росту (OD 600 = 0,4 - 0,5) та залишили настоюватися на 30 хвилин при 37°C для інфікування клітин. Суміш розташували на планшеті 2x YTAG та культивували при 30°C Колонії збрали, інокулювали у 2x YTAG та культивували при 37°C до OD 600 = 0,4 - 0,5. IPTG (1 моль/л; 5 мкл) та фат-помічник VCSM13 (10<sup>11</sup> одиниць фата) додали до культурального розчину (10 мл) та суміш залишили настоюватися при 37°C протягом 30 хвилин. Клітини збрали шляхом центрифугування, рееуспендували у 2x YTAG (100 мл) та культивували при 30°C протягом 10 годин. Культуральну надосадову рідину відновили шляхом центрифугування, змішали з 10% розчином PEG-5 моль/л NaCl (20 мл) та залишили настоюватися при 4°C протягом 20 хвилин. Фат осадили шляхом центрифугування при 10800 x g протягом 30 хвилин та суспендували у PBS (2 мл) та потім здійснили пенінг.

10-4. ЕЛАЙЗА фата

Вищеописану єдину колонію інокулювали у 2x YTAG (100 мкл) та культивували при 30°C протягом ночі. Після того, як 5 мкл цієї культури інокулювали у 2x YTAG (500 мкл) та культивували при 37°C протягом 5 годин, додали фат-помічник (2 x 10<sup>8</sup> одиниць фата) та культуру потім залишили настоюватися при 37°C протягом 30 хвилин. Далі, після культивування протягом 30 хвилин шляхом збоування при 37°C додали 2x YTAG, що містив 0,5

мМ IPTG (120 мкл). Після культивування протягом ночі при 30°C центрифугувану надосадову рідину піддали ЕЛАЙЗА. Для ЕЛАЙЗА клонів, отриманих шляхом пенінгу мічених біотином антигенів, застосовували титраційний мікропланшет StreptaWell 96 (Roche), покритий 1,0 мкг/мл міченим біотином антигеном. Далі для ЕЛАЙЗА клонів, отриманих шляхом пенінгу природних антигенів, застосовували імунопланшет (MaxiSorp, Nunc), іммобілізований 1,0 мкг/мл природного антигену. Після промивання PBST для видалення антигену реакцію блокували 200 мкл 2% M-PBS або 2% BSA-PBS (PBS, що містив 2% (маса/об'єм) альбуміну бичачої сироватки), що використовували як блокувальний буфер протягом 1 години при кімнатній температурі. Після видалення буфера культуральну надосадову рідину додали до планшета та залишили настоюватися протягом 60 хвилин для зв'язування фата. Після промивання зв'язаний фат виявили за допомогою HRP-зв'язаного антитіла до MI 3 (Amersham Pharmacia Biotech) та субстрату TMB (Zymed). Реакцію припинили шляхом додавання 1 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, та значення A450 вимірювали за допомогою планшет-ридера.

10-5. Визначення послідовності та відбір клонів

Застосовуючи культуральне середовище 2x YTAG ЕЛАЙЗА-позитивного рекомбінантного клону E. Coli, нуклеотидну послідовність ділянки scFv визначили шляхом PCR ампліфікації праймерами PBG3-F1 (5'-CAGCTATGAAATACCTATTGCC-3'/послідовність № 1) та PBG3-R1 (5'-CTTTTCATAATCAAAATCACCGG -3'/послідовність № 2). 15 мкл розчину PCR, що містив 1 мкл культурального середовища, 1,5 мкл буфера 10x KOD Dash, 0,2 мкл кожного з праймерів 10 мкмоль/л та 0,3 мкл полімерази KOD Dash (TOYOBO, 2,5 одиниці/мкл), піддали 30 циклам ампліфікації (96°C, 10 секунд, 55°C, 10 секунд, та 72°C, 30 секунд), застосовуючи PCR систему 9700 термолунки GeneAmp (Parkin Elmer). Після PCR додали 3 мкл ExoSAP-IT (Amersham) до 5 мкл реакційного розчину та суміш витримували теплою при 37°C протягом 15 хвилин, а потім при 80°C протягом 15 хвилин. Реакцію цього зразка виконували, застосовуючи набір BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) за допомогою PBG3-F2 (5'-ATTGCCTACGGCAGCCGCT -3'/послідовність № 3) або PBG3-R2 (5'-AAATCACCGGAACAGAGCC -3'/послідовність № 4) як праймер, та продукти піддали електрофорезу за допомогою секвенатора ДНК Applied Biosystems PRISM 3700 DNA Sequencer. Внаслідок цього клони, що мали різні амінокислотні послідовності CDR3, передбачені з нуклеотидних послідовностей, відбирали для 52 клонів як анти-фактор IX або 33 клонів як анти-фактор X.

10-6. Побудова вектора експресії біспецифічного антитіла IgG

Для того, щоб експресувати антитіло scFv як тип IgG, варіабельні області (VH, VL) антитіла клонували у вектори експресії індуктивного типу за способами, подібними тим, які наведено у Прикладах 3-3,3-4 та 3-5. Варіабельні області (VH та VL) антитіла до F.IXa, кожен окрему, включили у век-

тор такого типу, що індукується тетрацикліном (pcDNA4-g4H та pcDNA4-g4L, відповідно). Варіабельні області (VH та VL) антитіла до F.X, кожну окрему, включили у вектор такого типу, що індукується аналогом екдизону (pIND-g4H та pcDNA4-g4L, відповідно). З клонів, що представляють інтерес, виділили відповідні плазмідні ДНК, застосовуючи набір QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) та розчинили у стерильній воді (100 мкл).

10-7. Експресія химерного біспецифічного антитіла у тваринних клітинах

Застосовуючи розчин ДНК, приготований за способом, подібним до способу, наведеного у Прикладі 4-1, ДНК експресували у тваринних клітинах за способом, подібним до способу, наведеного у Прикладах 4-2 та 4-3, та зібрали культуральну надосадову рідину. Зразок зберігали при 4°C до застосування.

Приклад 11. Очищення антитіла

До 10 мл культуральної надосадової рідини, отриманої за способом, описаним у Прикладі 10-7, додали 100 мкл rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) та змішували шляхом перевертання при 4°C протягом ночі. Розчин перенесли до чашки з фільтром 0,22 мкм Ultrafree<sup>(R)</sup>-MC (Millipore) та після триразового промивання 500 мкл TBS, що містив 0,01% Tween<sup>(R)</sup> 20, смоли rProtein A Sepharose™ суспендували у 100 мкл 10 mM HCl/0,01% Tween<sup>w</sup> 20 (pH 2,0) та залишили настоюватися протягом 3 хвилин. Антитіло потім елюювали та елюат негайно нейтралізували шляхом додавання 5 мкл 1 M Tris-HCl, pH 8,0. Застосовуючи програмне забезпечення Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories), концентрацію IgG людини підраховували зі стандартної кривої IgG4 людини (людиноподібне антитіло до TF, дивись WO 99/51743). Кількісний аналіз концентрації антитіла виконали згідно з Прикладом 5.

Приклад 12. Аналіз VIIIa-міметичної активності (активованого фактора згортання VIII)

F.VIIIa-міметичну активність біспецифічного антитіла проаналізували, застосовуючи ферментний аналіз. Усі наступні реакції виконували при кімнатній температурі. Перемішаний розчин 10 мкл фактора IX (15 мкг/мл; Enzyme Research Laboratories), 5 мкл TBSB, що містив 100 mM CaCl<sub>2</sub> та 20 mM MgCb, та 50 мкл культуральної надосадової рідини, отриманої за способом, описаним у Прикладі 10-7, інкубували у 96-лунковому планшеті протягом 1 години. Потім 10 мкл фактора XIa (10 нг/мл; Enzyme Research Laboratories), 20 мкл фактора X (50 мкг/мл; Enzyme Research Laboratories) та 5 мкл фосфоліпідів (400 мкг/мл) додали, щоб ініціювати ферментативну реакцію. Через 30 хвилин після цього реакцію припинили шляхом додавання 10 мкл 0,5 M EDTK.

Після додавання до кожної лунки 50 мл розчину колориметричного субстрату вимірювали поглинання при 405 нм (контрольна довжина хвилі 655 нм) через 0 та 60 хвилин за допомогою Model 3550 Microplate Reader (Bio Rad Laboratories). F.VIIIa-міметичну активність представили як значення, отримане шляхом віднімання значення зміни поглинання у культуральній надосадовій рідині, яка не експресувала жодного антитіла, від значен-

ня поглинання у культуральній надосадовій рідині, що експресувала антитіло (дивись фігуру 12).

TBSB застосовували як розчинник для фосфоліпідів, фактора XIa, фактора IX та фактора X. Розчин колориметричного субстрату був сумішшю 1:1 колориметричного субстрату "Tesutochimu" S-2222 (Chromogenix), розчиненого згідно з інструкцією, що додається, та розчину полібрену (0,6 мг/л гексаметринбромід; Sigma).

Приклад 13. Аналіз згортання плазми

Для того, щоб визначити, чи відновлює біспецифічне антитіло, приготоване згідно зі способом Прикладу 11, спроможність згортання крові при гемофілії А, проаналізували вплив антитіла на активованій частковий тромбопластиновий час (APTT), застосовуючи плазму, позбавлену F.VIII, за способом, подібним до способу, наданому у Прикладі 7 (дивись фігуру 13). Далі A44/B26 та A69/B26, які є надзвичайно ефективними щодо скорочення часу згортання, вимірювали щодо їх залежності від концентрації (дивись фігури 14 та 15).

Приклад 14. Оцінка сумісного застосування біспецифічного антитіла та F.VIII Сумісне застосування біспецифічного антитіла та F.VIII оцінювали у наступних умовах аналізу згортання крові. Суміш 40 мкл розчину антитіла (25 мкг/мл) та 50 мкл плазми, позбавленої F.VIII (Biomerieux), інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. У цю суміш додали 10 мкл складу рекомбінантного фактора згортання крові VIJJ Kogenate<sup>(R)</sup> FS (BAYER) та 50 мкл реагентів APTT (Dade Behring) та нагрівали при 37°C протягом 3 хвилин. Реакцію згортання ініціювали шляхом додавання 50 мкл 20 mM CaCl<sub>2</sub> (Dade Behring). Час, необхідний для згортання, вимірювали, застосовуючи CR-A (Amelung)-з'єднаний KC10A (Amelung) (дивись фігуру 16).

Приклад 15. Вплив біспецифічного антитіла IgG на інгібіторну плазму Вплив біспецифічного антитіла IgG на інгібіторну плазму проаналізували у наступних умовах аналізу згортання плазми. Суміш 50 мкл плазми, позбавленої F.VIII, (Biomerieux) та 10 мкл нейтралізуючого антитіла до людського F.VIII (100 мкг/мл; номер за каталогом: MAB3440, CHEMICON) інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Плазму застосовували як інгібіторну плазму. У цю інгібіторну плазму додали 40 мкл розчину антитіла (25 мкг/мл) та 50 мкл реагенту APTT (Dade Behring) та нагрівали при 37°C протягом 3 хвилин. Реакцію згортання ініціювали шляхом додавання до цієї суміші 50 мкл 20 mM CaCl<sub>2</sub> (Dade Behring). Час, необхідний для згортання вимірювали, застосовуючи CR-A (Amelung)-з'єднаний KC10A (Amelung) (дивись фігуру 17).

Приклад 16. Гуманізація біспецифічного антитіла

Серед біспецифічних антитіл, отриманих у Прикладах 1 - 7, XB12 (антитіло до фактора DCa Mmni)/SB04 (антитіло до фактора X миші), яке було найбільш ефективним у скороченні часу згортання крові, піддали гуманізації наступним способом.

16-1. Пошук гомології антитіл людини

Базу даних побудували на основі даних амінокислотних послідовностей антитіл людини, отриманих від Kabat Database (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) та IMGT Database (<http://imgt.cines.fr/>), доступних для громадськості, та пошук гомології здійснювали окремо для варіабельної області XB12-Н-ланцюга миші, варіабельної області XB12-Ь-ланцюга миші, варіабельної області SB04-Л-ланцюга миші. Результати підтвердили, що вони мають високу гомологію до послідовностей антитіл людини, наданих далі, та завдяки цьому вирішили, що їх будуть застосовувати як каркасну ділянку (далі позначається скорочено FR) гуманізованих антитіл:

(1) варіабельна область XB12-Н-ланцюга: KABATID-020619 (Kabat Database) (Marette et al., *Arthritis Rheum.* 1993; 36:1315-1324);

(2) варіабельна область XB12-Л-ланцюга: EMBL Accession No. X61642 (IMGT Database) (Mark et al., *J Mol Biol.* 1991; 222: 581-597);

(3) варіабельна область SB04-Н-ланцюга: KABATID-025255 (Kabat Database) (Demaison et al., *Immunogenetics* 1995; 42: 342-352);

(4) варіабельна область SB04-Л-ланцюга: EMBL Accession No. AB064111 (IMGT Database) (Неопубліковані дані).

Для приготування гуманізованих антитіл гіперваріабельні ділянки (у цьому описі скорочено позначаються CDR) кожного антитіла миші трансплантували у каркасні ділянки антитілу людини (1)-(4).

Також доступний для громадськості веб-сайт NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) використовували для пошуку секреторних сигнальних послідовностей антитіла людини, які є надзвичайно гомологічними з антитілами людини (1)-(4). Застосовували наступні секреторні сигнальні послідовності, отримані внаслідок пошуку гомології:

(1) варіабельна область XB12-Н-ланцюга: GenBank Accession No. AF062120;

(2) варіабельна область XB12-Л-ланцюга: GenBank Accession No. M74019;

(3) варіабельна область SB04-Н-ланцюга: GenBank Accession No. BC019337;

(4) варіабельна область SB04-Ь-ланцюга: GenBank Accession No. AY204756.

16-2. Побудова вектора генної експресії гуманізованого антитіла

Дванадцять синтетичних олігонуклеотидів з приблизно 50 основ приготували з нуклеотидної послідовності, що кодує амінокислотну послідовність з секреторної сигнальної послідовності до варіабельної області антитіла, так щоб приблизно 20 основ їх 3'-кінців гібридизувалися одна з одною. Далі приготували праймер, що гібридизується до 5'-кінця гена варіабельної області антитіла та має послідовність розщеплення XhoI, та праймер, що гібридизується до 3'-кінця гена варіабельної області антитіла та має послідовність розщеплення SfiI.

Приготовані синтетичні олігонуклеотиди (2,5 мкМ, 1 мкл кожного) змішали та додали буфер 1x TaKaRa Ex Taq Buffer, 0,4 mM dNTPs та 0,5 одиниці TaKaRa Ex Taq (усі від Takara Shuzo), щоб скласти 48 мкл реакційного розчину. Після промивання

суміші при 94°C протягом 5 хвилин здійснили 2 цикли реакції (94°C, 2 хвилини, 55°C, 2 хвилини, та 72°C, 2 хвилини), щоб зібрати та подовжити кожну з синтетичних оліго-ДНК. Потім додали праймер, що гібридизується до 5'-кінця гена антитіла, та праймер, що гібридизується до 3'-кінця гена антитіла, 10 мкМ, 1 мкл кожного, та гени варіабельної області антитіла ампліфікували шляхом виконання 35 циклів реакції (94°C, 30 секунд, 55°C, 30 секунд, та 72°C, 1 хвилина) та реакції протягом 5 хвилин при 75°C. Після PCR увесь реакційний розчин піддали електрофорезу на 1% агарозному гелі. Ампліфіковані фрагменти очікуваного розміру (приблизно 400 п. н.) очистили за допомогою набору QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) за способом, описаним в інструкції, що додається до нього, та елюювали стерильною водою (30 мкл). Фрагменти клонували, застосовуючи pGEM-T Easy Vector System (Promega) за способом, описаним в інструкції, що додається. Нуклеотидні послідовності фрагментів ДНК визначили, застосовуючи набір BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) на секвенаторі ДНК ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems) за способом, описаним в інструкції, що додається до нього.

Після перетравлювання плазміда, щодо якого підтвердилось, що вона включає правильну послідовність генів варіабельної області гуманізованого антитіла з XhoI та SfiI, реакційний розчин піддали електрофорезу на 1% агарозному гелі. Фрагменти ДНК очікуваного розміру (приблизно 400 п. н.) очистили, застосовуючи набір QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) за способом, описаним в інструкції, що додається до нього, та елюювали стерильною водою (30 мкл). Далі, після перетравлювання плазмід (pcDNA4-g4H, pcDNA4-g4L) експресії такого типу, що індукується тетрацикліном, та плазмід (pIND-g4H, pIND-g4L) експресії такого типу, що індукується аналогом екдизону, одержаних у Прикладі 3-4 з XhoI та SfiI, очистили фрагменти, що включали константну область антитіла (приблизно 5 т. п. н.), застосовуючи набір QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) за способом, описаним в інструкції, що додається до нього, та елюювали стерильною водою (30 мкл). Фрагмент гена гуманізованого антитіла XB12 (варіабельна область Н-ланцюга (у цьому описі позначається VH) або варіабельна область Л-ланцюга (у цьому описі позначається VL), перетравлений XhoI та SfiI, та плазмід (pcDNA4-g4H, pcDNA4-g4L) експресії того типу, що індукується тетрацикліном, перетравлена XhoI та SfiI, піддали реакції зшивання, застосовуючи набір Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics) за способом, описаним в інструкції, що додається до нього. Крім того, фрагмент гена гуманізованого антитіла SB04 (варіабельна область Н-ланцюга або варіабельна область Л-ланцюга), перетравлений XhoI та SfiI, та плазмід експресії такого типу, що індукується аналогом екдизону, перетравлена XhoI та SfiI (pIND-g4H, pIND-g4L), піддали реакції зшивання, використовуючи набір Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics) за способом, описаним в інструкції, що додається до нього. Частину кожної реакційної суміші застосовували для трансформації штаму *E. Coli* DH5 $\alpha$  (TOYOBO).

16-3. Приготування гуманізованого біспецифічного антитіла

Гени трансфектували та експресували у HEK293H за способами, описаними у Прикладах 4-2 та 4-3, застосовуючи чотири типи векторів експресії гуманізованого антитіла, а також pcDNA6/TR та pVgRXR. Далі виконували очищення антитіла та кількісний аналіз антитіла за способами, наведеними у Прикладах 8 та 5.

16-4. Оцінка активності гуманізованого біспецифічного антитіла та модифікація послідовності антитіла

Для того, щоб оцінити спроможність до згортання крові приготованих таким чином гуманізованих біспецифічних антитіл та химерного біспецифічного антитіла XB12/SB04, досліджували вплив антитіл на АРТТ, використовуючи плазму, позбавлену F.VIII. Амінокислоти каркасної ділянки антитіла людини модифікували так, щоб підвищити активність гуманізованих біспецифічних антитіл, здатність згортання крові яких знизилася. Крім того, цистеїнові залишки у CDR3 VH антитіла XB12

модифікували до аланіну, враховуючи можливе зниження його термостійкості. Більш докладно, мутації ввели у вектор експресії гуманізованого антитіла, застосовуючи набір QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) згідно зі способом, описаним в інструкції, що додається до нього. Шляхом повторення амінокислотної модифікації послідовності каркасної ділянки та оцінки здатності згортання крові отримали гуманізоване біспецифічне антитіло (гуманізоване антитіло XB12 (VH:hXB12f-A, VL:hXBVL)/гуманізоване антитіло SB04 (VH:hSB04e, VL:hSBVL-F3f)) (фігура 18).

Промислова придатність

Цим винаходом пропонуються біспецифічні антитіла, що розпізнають як фермент, так і його субстрат, та функціонально заміщують кофактор, який підсилює ферментативну активність.

Вважають, що біспецифічні антитіла згідно з цим винаходом мають високу стійкість у крові та низьку антигенність. Отже, очікується, що вони стануть фармацевтичними препаратами.

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Чугей Сейяку Кабусікі Кайся

<120> ВІСПЕЦИФІЧНІ АНТИТІЛА, ЩО ЗАМІЩУЮТЬ ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВІЛКИ

<130> C1-A0313P3

<150> РСТ/JP03/13062

<151> 2003-10-10

<150> РСТ/JP03/13123

<151> 2003-10-14

<160> 268

<170> PatentIn версія 3.1

<210> 1

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 1

cagctatgaa atacctattg cc

22

<210> 2

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 2

cttttcataa tcaaaatcac cgg

23

<210> 3

<211> 19

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 3

attgcctacg gcagccgct

19

<210> 4

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 4

aaatcacccgg aaccagagcc

20

<210> 5

<211> 24

<212> ДНК  
<213> Штучна

<220>  
<223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 5  
ttactcgcgg cccagccggc catg

24

<210> 6  
<211> 28  
<212> ДНК  
<213> Штучна

<220>  
<223> штучно синтезована послідовність праймера

<400> 6  
ggaattcggc ccccgaggcc cactcacg

28

<210> 7  
<211> 1215  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
ggcctcgggg gccagctttc tggggcaggc caggcctgac cttggctttg gggcaggag 60  
ggggctaagg tgaggcaggt ggcgccagcc aggtgcacac ccaatgccca tgagcccaga 120  
cactggacgc tgaacctcgc ggacagttaa gaaccaggc gcctctgcgc cctgggccc 180  
gctctgtccc acaccgggt cacatggcac cacctctctt gcagcttcca ccaagggccc 240  
atccgtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag ccgccctggg 300  
ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct 360  
gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag 420  
cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag acctacacct gcaacgtaga 480  
tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag tccaaatatg gtcccccag 540  
cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca gtcttcctgt tcccccaaa 600  
acccaaggac actctcatga tctcccgac cctgaggtc acgtgcgtgg tggtagacgt 660  
gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gatggcgtgg aggtgcataa 720  
tgccaagaca aagccgagg aggagcagtt caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct 780  
caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa 840  
aggcctcccg tcctccatcg agaaaacct ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc 900  
acaggtgtgc accctgcccc catcccagga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgtg 960  
gtgcctggtc aaaggcttct accccagcga catgccgtg gaggggaga gcaatgggca 1020  
gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct 1080  
ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag gggaatgtct tctcatgctc 1140  
cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctctggg 1200

taaatgagcg gccgc

1215

<210> 8  
<211> 684  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
ggcctcgggg gccgaattcc taaactctga gggggtcggg tgacgtggcc attctttgcc 60  
taaagcattg agtttactgc aaggctcagaa aagcatgcaa agccctcaga atggctgcaa 120  
agagctccaa caaaacaatt tagaacttta ttaaggaata gggggaagct aggaagaaac 180  
tcaaaacatc aagattttta atacgcttct tggctctcctt gctataatta tctgggataa 240  
gcatgctgtt ttctgtctgt ccctaacatg ccctgtgatt atccgcaaac aacacaccca 300  
agggcagaac tttgttactt aaacaccatc ctgtttgctt ctttcctcag gaactgtggc 360  
tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc 420  
tgttgtgtgc ctgtgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtga 480  
taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag 540  
cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt 600  
ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag 660  
gggagagtgt tagagggcgg ccgc 684

<210> 9  
<211> 1215  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 9  
ggcctcgggg gcctcccagg ctctgggcag gcacaggcta ggtgccccta acccaggccc 60  
tgcacacaaa ggggcagggtg ctgggctcag acctgccaag agccatatcc gggaggaccc 120  
tgcccttgac ctaagccac cccaaaggcc aaactctcca ctccctcagc tcggacacct 180  
tctctcctcc cagattccag taactccaa tcttctctct gcagcttcca ccaagggccc 240  
atcctgtctt cccctggcgc cctgtctcag gagcacctcc gagagcacag ccgccctggg 300  
ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg tcgtggaact caggcgccct 360  
gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag 420  
cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag acctacacct gcaacgtaga 480  
tcacaagccc agcaaacacca aggtggacaa gagagttgag tccaaatatg gtcccccag 540  
cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca gtcttctctgt tcccccaaa 600  
acccaaggac actctcatga tctcccgac ccctgaggtc acgtgcgtgg tgggtgacgt 660  
gagccaggaa gaccccgagg tccagttaa ctggtacgtg gatggcgtgg aggtgcataa 720  
tgccaagaca aagccgoggg aggagcagtt caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct 780  
caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa 840



```

aggcctcccg tctccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc 900
acaggtgtac accctgcccc catcccagtg cgagatgacc aagaaccagg tcagcctgtc 960
ctgcgcgggtc aaaggtttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca 1020
gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct 1080
cgtgagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag gggaatgtct tctcatgctc 1140
cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctctggg 1200
taaagtagcg gccgc 1215

```

```

<210> 10
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна

```

```

<220>
<223> штучно синтезована послідовність праймера

```

```

<400> 10
cgcaaatggg cggtaggcgt g 21

```

```

<210> 11
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна

```

```

<220>
<223> штучно синтезована послідовність праймера

```

```

<400> 11
tagaaggsac agtcgagg 18

```

```

<210> 12
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна

```

```

<220>
<223> штучно синтезована послідовність праймера

```

```

<400> 12
ctctgaatac tttcaacaag ttac 24

```

```

<210> 13
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<400> 13

```

```

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

```

```

Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser
20           25           30

```

```

Gly Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Asn Leu Glu
35           40           45

```

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

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

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

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

Thr Val Ser Ala  
115

<210> 14  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 14

Ser Gly Tyr Tyr Trp Thr  
1 5

<210> 15  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 15

Tyr Ile Ser Phe Asp Gly Thr Asn Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn  
1 5 10 15

<210> 16  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 16

Gly Pro Pro Cys Thr Tyr  
1 5

<210> 17  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 17

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

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp  
20 25 30

61

95438

62

Asp Tyr Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asp Gly Lys Thr Lys Tyr Ala Pro Lys  
 50 55 60

Phe Gln Asp Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala  
 65 70 75 80

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

Cys Val Arg Trp Arg Ile Tyr Tyr Gly Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 18  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 18

Asp Asp Tyr Val His  
 1 5

<210> 19  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 19

Arg Ile Asp Pro Ala Asp Gly Lys Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Asp

<210> 20  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 20

Trp Arg Ile Tyr Tyr Gly Leu Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 21  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 21

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

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

Phe Val Leu His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys  
 50 55 60

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

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 22

His Phe Val Leu His

1 5

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 23

Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 24

Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 25  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 25

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

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Gln Asp  
20 25 30

Asn Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

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

Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Thr  
65 70 75 80

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

Cys Ala Ser Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala  
115

<210> 26  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 26

Asp Asn Tyr Met His  
1 5

<210> 27  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 27

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

67

95438

68

<210> 28  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 28

Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Cys  
 1 5

<210> 29  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 29

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

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

Asn Thr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Ser Ile Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr  
 50 55 60

Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Ser Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser  
 65 70 75 80

Leu Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Gly  
 85 90 95

Arg Gly Lys Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 30  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 30

Glu Asn Thr Ile Tyr  
 1 5

<210> 31  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 31

Ser Ile Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp  
1 5 10

<210> 32  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 32

Ser Gly Gly Arg Gly Lys Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser  
1 5 10

<210> 33  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 33

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

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp  
20 25 30

Asn Tyr Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Ile Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asn Gly Asn Ser Arg Tyr Asp Pro Lys  
50 55 60

Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala  
65 70 75 80

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

Cys Ala Ser Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala  
115

<210> 34  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 34

Asp Asn Tyr Met His  
1 5

<210> 35  
<211> 17

<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 35

Arg Ile Asp Pro Gly Asn Gly Asn Ser Arg Tyr Asp Pro Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

<210> 36  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 36

Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Tyr  
1 5

<210> 37  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 37

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

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp  
20 25 30

Asp Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

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

Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ile Thr Ala  
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

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

Ser Ala

<210> 38  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus



<400> 38

Asp Asp Tyr Ile His  
1 5

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

Arg Ile Asp Pro Thr Asn Gly Asn Pro Ala Tyr Ala Pro Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Asp

<210> 40

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Ser Phe Ala Tyr  
1

<210> 41

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

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

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp  
20 25 30

Asp Tyr Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Ile Gly Arg Ile His Pro Ala Asn Gly Asn Pro Gln Tyr Ala Pro Lys  
50 55 60

Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Ile Ile Gly Thr Ala Ser Asn Thr Thr  
65 70 75 80

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

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

Ser Ala

<210> 42  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 42

Asp Asp Tyr Val His  
 1 5

<210> 43  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 43

Arg Ile His Pro Ala Asn Gly Asn Pro Gln Tyr Ala Pro Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Asp

<210> 44  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 44

Pro Phe Ala Tyr  
 1

<210> 45  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 45

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

Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser  
 20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu  
 35 40 45

Trp Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

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

Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

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

Thr Val Ser Ala  
 115

<210> 46  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 46

Ser Asn Tyr Tyr Trp Asn  
 1 5

<210> 47  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 47

Tyr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn  
 1 5 10 15

<210> 48  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 48

Gly Gly Ala Phe Thr Tyr  
 1 5

<210> 49  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 49

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

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

Asn Lys Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Pro Asn Asn Gly Asp Ile Gly Tyr Asn Arg Lys  
 50 55 60

Phe Arg Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

80

Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp

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

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

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 54  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 54

Thr Tyr Ala Met Ser  
 1 5

<210> 55  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 55

Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 56  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 56

Gly Gly Tyr Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 57  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 57

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly

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

Tyr Trp Met His Trp Val Gln Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp  
                   35                  40                  45

Ile Gly Arg Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Ala Arg Tyr Asn Gln Lys  
                   50                  55                  60

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

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

Cys Ala Arg Arg Gly Glu Tyr Pro Ser Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly  
                   100                  105                  110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
                   115                  120

<210> 58  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 58

Ser Tyr Trp Met His  
 1                  5

<210> 59  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 59

Arg Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Ala Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1                  5                  10                  15

Ser

<210> 60  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 60

Arg Gly Glu Tyr Pro Ser Tyr Thr Met Asp Tyr  
 1                  5                  10

85

95438

86

<210> 61  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 61

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

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

Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Thr Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Asn Tyr Asn Gln Lys  
 50 55 60

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

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Thr Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Cys Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

<210> 62  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 62

Ser Tyr Trp Met His  
 1 5

<210> 63  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 63

Thr Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 64  
 <211> 9

<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 64

Tyr Tyr Gly Asn Tyr Cys Phe Gly Tyr  
1 5

<210> 65  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 65

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

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp  
20 25 30

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

Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asp Gly Arg Thr Lys Tyr Ala Pro Arg  
50 55 60

Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala  
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr  
85 90 95

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

Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 66  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 66

Asp Ser Leu Ile His  
1 5

<210> 67  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 67

Trp Ile Asp Pro Glu Asp Gly Arg Thr Lys Tyr Ala Pro Arg Phe Gln  
1 5 10 15



<210> 68  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 68

Trp Val Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 69  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 69

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

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

Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Glu Ile Asp Ile Ser Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys  
 50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Ser Asn Thr Ala  
 65 70 75 80

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser His Asp Ala Met Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 70  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 70

Asp Tyr Trp Met His  
 1 5

<210> 71

91

95438

92

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 71

Glu Ile Asp Ile Ser Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 72  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 72

Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser His Asp Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 73  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 73

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

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

Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Glu Ile Asp Ile Ser Asp Ser Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys  
 50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Ser Asn Thr Ala  
 65 70 75 80

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Val Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Asn Val Met Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 74  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 74

Asp Tyr Trp Met His

1 5

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 75

Glu Ile Asp Ile Ser Asp Ser Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 76

Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Asn Val Met Asp Tyr  
 1 5 10

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 77

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Gly Glu Leu Val Met Pro Gly  
 1 5 10 15

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

Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Glu Ile Asp Ile Ser Asp Gly His Thr Thr Tyr Asn Gln Glu  
 50 55 60

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

Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp Val Met Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 78  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 78

Asp Tyr Trp Met His  
 1 5

<210> 79  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 79

Glu Ile Asp Ile Ser Asp Gly His Thr Thr Tyr Asn Gln Glu Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 80  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 80

Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp Val Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 81  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 81

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

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

Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Glu Ile Asp Ile Ser Asp Ser His Thr Thr Tyr Asn Gln Lys  
 50 55 60

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

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Val Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser His Asp Val Met Asp Tyr  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 82  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 82

Asp Tyr Trp Met His  
1 5

<210> 83  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 83

Glu Ile Asp Ile Ser Asp Ser His Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 84  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 84

Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser His Asp Val Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 85  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 85

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

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

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

Leu Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys  
 50 55 60

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

Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Tyr Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 86  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 86

Ser Ser Trp Met His  
 1 5

<210> 87  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 87

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe Arg  
 1 5 10 15

Asp

<210> 88  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 88

Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 89  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 89

101

95438

102

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

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

Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys  
 50 55 60

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

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Asp Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Asn Gly Asn Leu Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 90  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 90

Thr Tyr Trp Met His  
 1 5

<210> 91  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 91

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Val

<210> 92  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 92

Gly Asn Leu Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr  
 1 5

103

95438

104

<210> 93  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 93

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

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp  
 20 25 30

Tyr Tyr Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Leu Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys  
 50 55 60

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

Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Tyr Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 94  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 94

Asp Tyr Tyr Met His  
 1 5

<210> 95  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 95

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe Arg  
 1 5 10 15

Asp

<210> 96  
 <211> 9



105

95438

106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 96

Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr  
 1 5

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 97

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

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Leu Ser Asn  
 20 25 30

Asn Trp Ile Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Thr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys  
 50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ala Ser Ser Asn Thr Ala  
 65 70 75 80

Tyr Met Arg Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 98

Asn Asn Trp Ile Gln  
 1 5

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 99

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

107

95438

108

Gly

<210> 100  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 100

Glu Gly Ala Ser Trp Phe Ala Tyr  
 1 5

<210> 101  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 101

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

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

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

Ile Gly Glu Ile Leu Thr Gly Ser Asp Thr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys  
 50 55 60

Leu Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala  
 65 70 75 80

Tyr Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Ser Ser Trp Phe Ala His Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

<210> 102  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 102

Asn His Trp Ile Gln  
 1 5

&lt;210&gt; 103

109

95438

110

<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 103

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

Gly

<210> 104  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 104

Glu Gly Ser Ser Trp Phe Ala His  
1 5

<210> 105  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 105

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

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp  
20 25 30

Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Ile Gly Trp Ser Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys  
50 55 60

Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Ile Ala  
65 70 75 80

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 106  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

111

95438

112

&lt;400&gt; 106

Asp Tyr Tyr Met His  
1 5

&lt;210&gt; 107

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 107

Trp Ser Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

&lt;210&gt; 108

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 108

Gly Gly Arg Arg Ala Met Asp Tyr  
1 5

&lt;210&gt; 109

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 109

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

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 110  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 110

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn  
1 5

<210> 111  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 111

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

<210> 112  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 112

Gly Gly Ser Gly His Ala Met Asp Tyr  
1 5

<210> 113  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 113

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

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

Tyr Leu Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

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

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

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

115

95438

116

Cys Ala Arg Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
                   100                  105                  110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
           115                  120

<210> 114  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 114

Asn Tyr Leu Met His  
   1                  5

<210> 115  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 115

Phe Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
   1                  5                  10                  15

Gly

<210> 116  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 116

Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
   1                  5                  10

<210> 117  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 117

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

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser  
           20                  25                  30

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

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

117

95438

118

Val Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Leu Lys Asn Ile Leu  
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg His Glu Ala Ser Ile Met Ile Thr Thr Gly Arg Ile Trp  
100 105 110

Ala Trp Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120 125

<210> 118  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 118

Ser Asn Ala Met Ser  
1 5

<210> 119  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 119

Thr Ile Ser Ser Ala Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 120  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 120

His Glu Ala Ser Ile Met Ile Thr Thr Gly Arg Ile Trp Ala Trp Phe  
1 5 10 15

Gly Asn

<210> 121  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 121

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

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg  
                   20                  25                  30

Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp  
           35                  40                  45

Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Asn Tyr His Pro Asp Ser  
       50                  55                  60

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

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr  
                   85                  90                  95

Cys Val Arg His Val Leu Leu Thr Thr Ile Gly Tyr Tyr Ala Ile Asp  
                   100                  105                  110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
           115                  120

<210> 122  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 122

Arg Tyr Ala Met Ser  
   1                  5

<210> 123  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 123

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Asn Tyr His Pro Asp Ser Val Lys  
   1                  5                  10                  15

Asp

<210> 124  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 124

His Val Leu Leu Thr Thr Ile Gly Tyr Tyr Ala Ile Asp Tyr  
   1                  5                  10

<210> 125



121

95438

122

<211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 125

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

Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg  
 20 25 30

Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser  
 50 55 60

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

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg His Val Leu Gln Thr Met Ile Gly Tyr Tyr Ala Val Asp  
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 126  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 126

Arg Tyr Thr Met Ser  
 1 5

<210> 127  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 127

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 128  
 <211> 14  
 <212> PRT

123

95438

124

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 128

His Val Leu Gln Thr Met Ile Gly Tyr Tyr Ala Val Asp Tyr  
 1 5 10

&lt;210&gt; 129

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 129

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

Arg Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg  
 20 25 30

Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser  
 50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Leu  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Val Arg His Val Leu Gln Thr Thr Ile Gly Tyr Tyr Ala Val Asp  
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 130

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 130

Arg Tyr Thr Met Ser  
 1 5

&lt;210&gt; 131

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 131

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

125

95438

126

Gly

<210> 132  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

&lt;400&gt; 132

His Val Leu Gln Thr Thr Ile Gly Tyr Tyr Ala Val Asp Tyr  
1 5 10

<210> 133  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

&lt;400&gt; 133

Met Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg  
20 25 30

Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp  
35 40 45

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

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

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg His Leu Leu Gln Thr Met Ile Gly Tyr Tyr Ala Met Asp  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 134  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

&lt;400&gt; 134

Arg Tyr Ala Met Ser  
1 5

&lt;210&gt; 135

127

95438

128

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 135

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 136  
 <211> 14

<212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 136

His Leu Leu Gln Thr Met Ile Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 137  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 137

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

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

His Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Phe Asp Thr Thr Ile Tyr Asn Gln Lys  
 50 55 60

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

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Gly Tyr Tyr Arg Phe Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 138  
 <211> 5

129

95438

130

<212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 138

Asp His Asn Met Asp  
 1 5

<210> 139  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 139

Asp Ile Asn Pro Asn Phe Asp Thr Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Arg  
 1 5 10 15

Gly

<210> 140  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 140

Arg Gly Tyr Tyr Arg Phe Asp Leu Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 141  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 141

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

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp  
 20 25 30

Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Lys  
 50 55 60

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

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Lys Arg Arg Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

131

95438

132

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 142  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 142

Asp Asn Asn Met Asp  
1 5

<210> 143  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 143

Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 144  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 144

Arg Arg Lys Arg Arg Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 145  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 145

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

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

Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp  
35 40 45

Ile Gly Asp Val Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Met Tyr Asn Gln Lys  
50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

133

95438

134

65

70

75

80

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 146  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 146

Asp Asn Asn Met Asp  
1 5

<210> 147  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 147

Asp Val Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Met Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 148  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 148

Arg Ile Arg Arg Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 149  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 149

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

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

Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp

135

95438

136

35

40

45

Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ile Tyr Asn Gln Lys  
 50 55 60

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

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Ile Tyr Tyr Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 150  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 150

Asp Asn Asn Met Asp  
 1 5

<210> 151  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 151

Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 152  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 152

Arg Ile Tyr Tyr Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 153  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 153

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



137

95438

138

1                    5                    10                    15

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

His Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp  
                  35                    40                    45

Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Val Ile Ser Asp Gln Lys  
                  50                    55                    60

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

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
                  85                    90                    95

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
                  115                    120

<210> 154  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 154

Asp His Asn Met Asp  
1                    5

<210> 155  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 155

Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Val Ile Ser Asp Gln Lys Phe Lys  
1                    5                    10                    15

Gly

<210> 156  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 156

Arg Leu Arg Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr  
1                    5                    10

139

95438

140

<210> 157  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 157

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

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

Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ile Tyr Lys Gln Asn  
 50 55 60

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

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Met Arg Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 158  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 158

Asp Tyr Asn Met Asp  
 1 5

<210> 159  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 159

Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ile Tyr Lys Gln Asn Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 160  
 <211> 10  
 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 160

Arg Met Arg Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 161

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 161

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

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

Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Ile Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys  
50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala  
65 70 75 80

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 162

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 162

Asp Asn Asn Met Asp  
1 5

<210> 163

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 163

Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

143

95438

144

Gly

<210> 164  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 164

Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 165  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 165

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

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

Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Lys  
 50 55 60

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

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Val Arg Arg Gly Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 166  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 166

Asp Asn Asn Met Asp  
 1 5

&lt;210&gt; 167

145

95438

146

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 167

Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 168  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 168

Arg Val Arg Arg Gly Tyr His Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 169  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 169

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

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

Asn Ala Leu Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys  
 50 55 60

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

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Ser Gly Gly Arg Gly Gln Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 170  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

147

95438

148

&lt;400&gt; 170

Glu Asn Ala Leu Tyr  
1 5

&lt;210&gt; 171

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 171

Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Asp

&lt;210&gt; 172

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 172

Ser Gly Gly Arg Gly Gln Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

&lt;210&gt; 173

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 173

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

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

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

Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys  
50 55 60

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

Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ala  
115

<210> 174  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 174

Ser Tyr Trp Met Gln  
1 5

<210> 175  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 175

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 176  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 176

Asp Gly Tyr Asp Leu Phe Ala Tyr  
1 5

<210> 177  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 177

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

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

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

Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Arg Ile Thr Gln Lys  
50 55 60

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

152

Gly Tyr Tyr Leu Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly His Lys Leu Glu  
35 40 45



153

95438

154

Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Arg Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

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

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

Cys Ala Ser Phe Phe Tyr Gly Lys His Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 182  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 182

Ser Gly Tyr Tyr Leu Asn  
 1 5

<210> 183  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 183

Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn  
 1 5 10 15

<210> 184  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 184

Phe Phe Tyr Gly Lys His Asp  
 1 5

<210> 185  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 185

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

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

155

95438

156

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

Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys  
 50 55 60

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

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 186  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 186

Arg Ser Trp Met Asn  
 1 5

<210> 187  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 187

Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 188  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 188

Gly Gly Leu Asp Tyr  
 1 5

<210> 189  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 189

157

95438

158

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

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

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

Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys  
50 55 60

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

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe  
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Arg Gly Tyr Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 190  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 190

Arg Tyr Trp Met Asn  
1 5

<210> 191  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 191

Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 192  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 192

Gly Arg Gly Tyr Ser Ala Met Asp Tyr

159

95438

160

1

5

<210> 193  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 193

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

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

Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Asp Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly Ala Leu Tyr Asn Gln Lys  
 50 55 60

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

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Pro Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 194  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 194

Asp Tyr Asn Met Asp  
 1 5

<210> 195  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 195

Asp Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly Ala Leu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

161

95438

162

<210> 196  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 196

Arg Pro Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 197  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 197

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

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

Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys  
 50 55 60

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

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 198  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 198

Asp Asn Asn Met Asp  
 1 5

<210> 199  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 199

163

95438

164

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 200  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 200

Arg Gly Tyr Tyr Gly Arg Thr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

&lt;210&gt; 201

<211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 201

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

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp  
 20 25 30

Asp Tyr Met His Trp Val Asn Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

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

Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala  
 65 70 75 80

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

Cys Thr Tyr Gly Ile Tyr Val Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 202  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 202

Asp Asp Tyr Met His

165

95438

166

1 5

<210> 203  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 203

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

<210> 204  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 204

Gly Ile Tyr Val Arg Gly Tyr  
 1 5

<210> 205  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 205

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 100 105

<210> 206  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 206

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

&lt;210&gt; 207

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 207

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr  
1 5

&lt;210&gt; 208

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 208

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
1 5

&lt;210&gt; 209

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 209

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

&lt;210&gt; 210

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus



&lt;400&gt; 210

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

&lt;210&gt; 211

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 211

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser  
 1 5

&lt;210&gt; 212

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 212

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

&lt;210&gt; 213

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 213

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Ile  
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Asp Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Phe  
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

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

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

&lt;210&gt; 214

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

<400> 214

Arg Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Ile Tyr  
1 5 10

<210> 215

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 215

Thr Ser Asn Leu Ala Pro  
1 5

<210> 216

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 216

Gln Gln Phe Ser Ser Ser Pro Trp Thr  
1 5

<210> 217

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 217

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Arg Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys Arg

173

95438

174

&lt;210&gt; 218

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 218

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
1 5 10 15

Ala

&lt;210&gt; 219

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 219

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

&lt;210&gt; 220

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 220

Gln Gln Tyr Tyr Arg Phe Pro Tyr Thr  
1 5

&lt;210&gt; 221

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DHK

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(18)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 221

agt ggt tat tac tgg acc  
Ser Gly Tyr Tyr Trp Thr  
1 5

18

&lt;210&gt; 222

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 222

Ser Gly Tyr Tyr Trp Thr  
1 5

&lt;210&gt; 223

&lt;211&gt; 48

<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(48)  
<223>

<400> 223  
tac ata tcc ttc gac ggt acc aat gac tac aac cca tct ctc aaa aat 48  
Tyr Ile Ser Phe Asp Gly Thr Asn Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn  
1 5 10 15

<210> 224  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 224

Tyr Ile Ser Phe Asp Gly Thr Asn Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn  
1 5 10 15

<210> 225  
<211> 18  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(18)  
<223>

<400> 225  
ggc ccc ccc tgt act tac 18  
Gly Pro Pro Cys Thr Tyr  
1 5

<210> 226  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 226

Gly Pro Pro Cys Thr Tyr  
1 5

<210> 227  
<211> 30  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(30)  
<223>

<400> 227  
agg gcc acc tca agt gta aat tac att tac 30  
Arg Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Ile Tyr  
1 5 10

<210> 228  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 228

Arg Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Ile Tyr  
1 5 10

<210> 229  
<211> 18  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(18)  
<223>

<400> 229  
aca tcc aac ctg gct cct  
Thr Ser Asn Leu Ala Pro  
1 5

18

<210> 230  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 230

Thr Ser Asn Leu Ala Pro  
1 5

<210> 231  
<211> 27  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(27)  
<223>

<400> 231  
cag cag ttt tct agt tcc cca tgg acg  
Gln Gln Phe Ser Ser Ser Pro Trp Thr  
1 5

27

<210> 232  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 232

Gln Gln Phe Ser Ser Ser Pro Trp Thr  
1 5

<210> 233  
<211> 15  
<212> ДНК

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(15)

<223>

<400> 233

cac ttt gtt ttg cac  
His Phe Val Leu His  
1 5

15

<210> 234

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 234

His Phe Val Leu His  
1 5

<210> 235

<211> 48

<212> DHK

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(48)

<223>

<400> 235

tat att att cct tac aat gat ggt act aag tac aat gag aag ttc aaa  
Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

48

<210> 236

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 236

Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

<210> 237

<211> 39

<212> DHK

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(39)

<223>

<400> 237

ggg aat agg tac gac gta ggt tcc tat gct atg gac tac  
Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

39

<210> 238

181

95438

182

<211> 13  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 238

Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 239  
<211> 51  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(51)  
<223>

<400> 239

aag tcc agt cag agc ctt tta tat agt agc aat caa aag aac tac ttg 48  
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
1 5 10 15

gcc 51  
Ala

<210> 240  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 240

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
1 5 10 15

Ala

<210> 241  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(21)  
<223>

<400> 241

tgg gca tcc act agg gaa tct 21  
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 242  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 242

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 243  
<211> 27  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(27)  
<223>

<400> 243  
cag caa tat tat agg ttt ccg tac acg  
Gln Gln Tyr Tyr Arg Phe Pro Tyr Thr  
1 5

27

<210> 244  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 244

Gln Gln Tyr Tyr Arg Phe Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 245  
<211> 15  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(15)  
<223>

<400> 245  
agc tcc tgg atg cac  
Ser Ser Trp Met His  
1 5

15

<210> 246  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 246

Ser Ser Trp Met His  
1 5

<210> 247  
<211> 51  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(51)  
<223>



<400> 247  
 tac att aat cct agc agt ggt tat act aag tac aat cgg aag ttc agg 48  
 Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe Arg  
 1 5 10 15

gac 51  
 Asp

<210> 248  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 248

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe Arg  
 1 5 10 15

Asp

<210> 249  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(27)  
 <223>

<400> 249  
 ggg ggt aac ggt tac tac ttt gac tac 27  
 Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 250  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 250

Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 251  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(33)  
 <223>

<400> 251  
 aag gcc agt cag gat gtg ggg act gct gta gcc 33  
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala  
 1 5 10

<210> 252  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 252

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

<210> 253  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(21)  
<223>

<400> 253  
tgg gca tcc acc cgg cac act  
Trp Ala Ser Thr Arg His Thr  
1 5

21

<210> 254  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 254

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr  
1 5

<210> 255  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(24)  
<223>

<400> 255  
cag caa tat agc aac tat atc acg  
Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
1 5

24

<210> 256  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 256

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
1 5

<210> 257

<211> 15  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(15)  
 <223>

<400> 257  
 gac aac aac atg gac  
 Asp Asn Asn Met Asp  
 1 5

15

<210> 258  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 258  
 Asp Asn Asn Met Asp  
 1 5

<210> 259  
 <211> 51  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(51)  
 <223>

<400> 259  
 gat att aat act aaa agt ggt ggt tct atc tac aac cag aag ttc aag  
 Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

48

ggc  
 Gly

51

<210> 260  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 260  
 Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 261  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS

191

95438

192

<222> (1)..(30)  
<223>

<400> 261  
agg agg agc tac ggc tac tac ttt gac tac  
Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

30

<210> 262  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 262

Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 263  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(33)  
<223>

<400> 263  
aag gcc agt cag aat gtg ggt act gct gta gcc  
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala  
1 5 10

33

<210> 264  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 264

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

<210> 265  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(21)  
<223>

<400> 265  
tcg gca tcc tac cgg tac agt  
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser  
1 5

21

<210> 266  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 266

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser  
1 5

<210> 267

<211> 27

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 267

cag caa tat aac agc tat cct ctc acg  
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

27

<210> 268

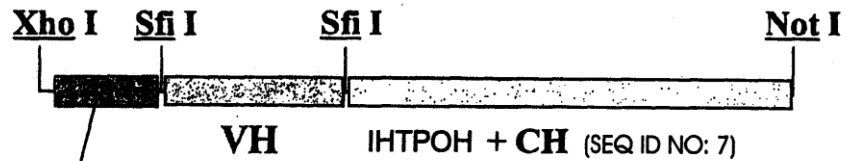
<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

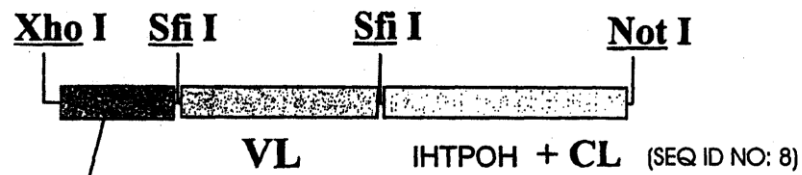
<400> 268

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5



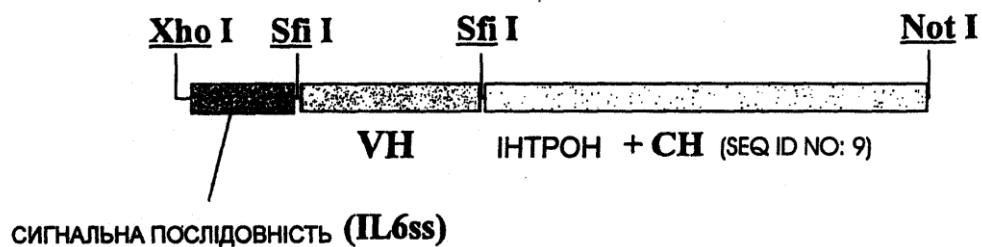
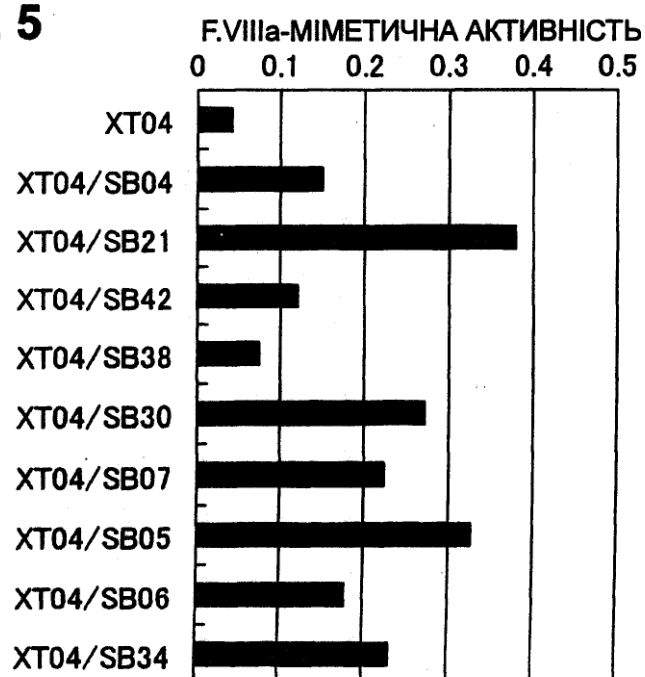
СИГНАЛЬНА ПОСЛІДОВНІСТЬ (IL3ss)

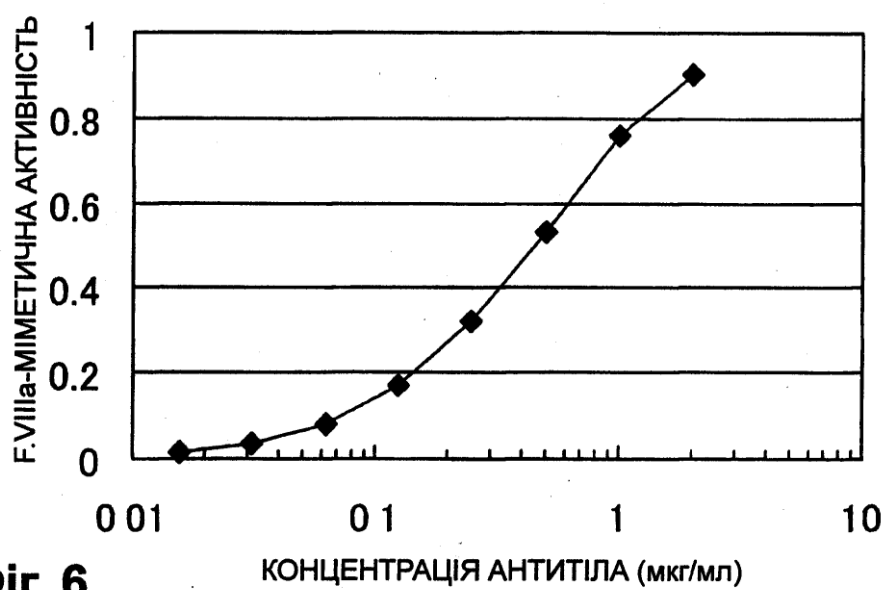
Fig. 1



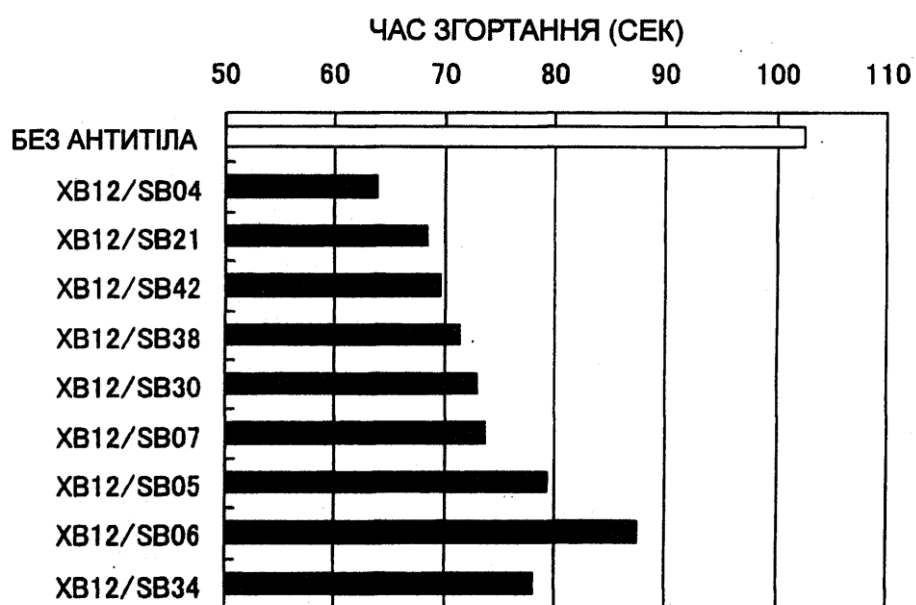
СИГНАЛЬНА ПОСЛІДОВНІСТЬ (IL3ss)

Fig. 2

**Fig. 4****Fig. 5**

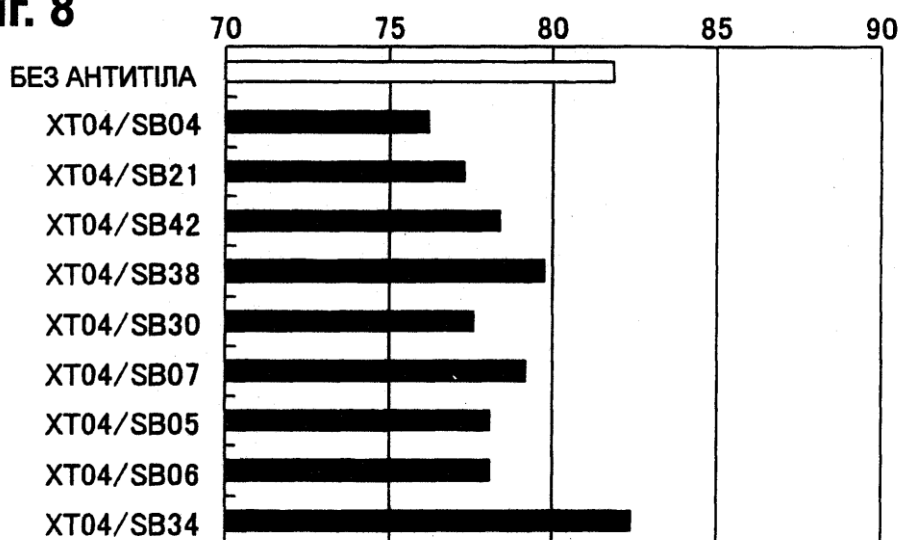


Фіг. 6

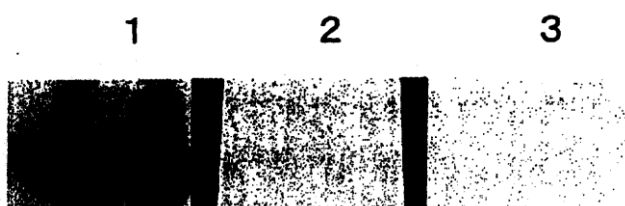


Фіг. 7

Фіг. 8

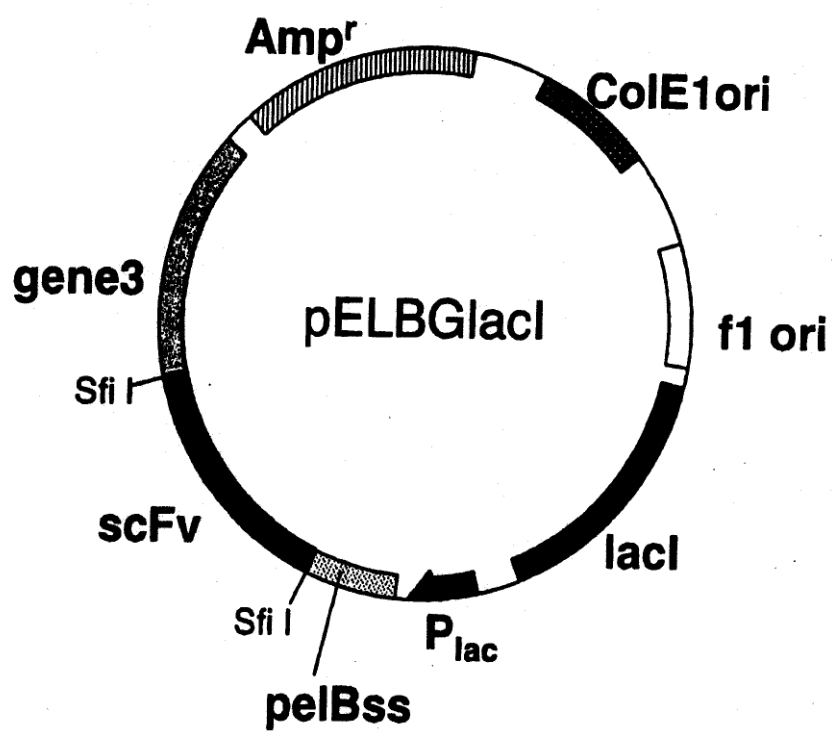


Фіг. 9



Фіг. 10



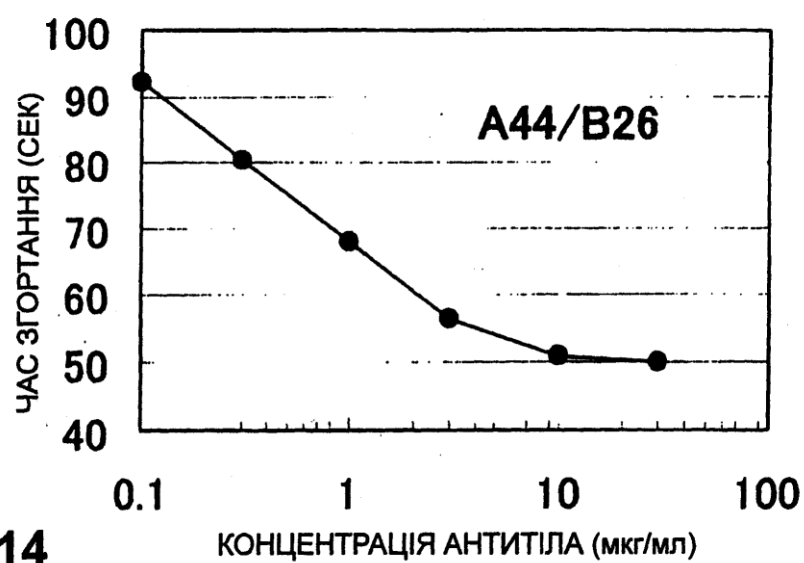
**Fig. 11**

		До F.IXa										
		A19	A25	A31	A38	A39	A40	A41	A44	A50	A69	XB12
До F.X	B2						+					
	B5					+		+				
	B9											+
	B10				+	+	+	+				+
	B11			+	+	+		+		+		+
	B12				+	+	+	+				+
	B13			+		+	+	+				+
	B14				+	+	+	+				+
	B15					+		+				+
	B16			+	+	+		+				+
	B18							+				
	B19								+			
	B20								+			
	B21											
	B23											
	B25											
	B26		+			+		+	+		+	+
	B27					+		+				
	B31	+		+	+	+	+	+				+
	B34-1					+		+				
	B34-2				+	+	+	+				
	B35			+	+	+	+	+		+		+
	B36			+		+		+				
	B38			+	+	+		+				+
	B42							+				
	SB04	+		+	+	+	+	+		+		+
	SB15					+		+				+
	SB27											+

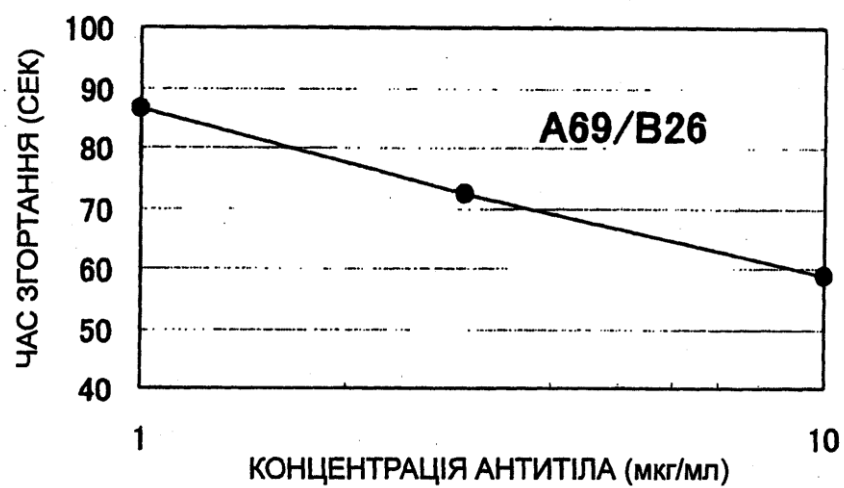
Fig. 12

Фіг. 13

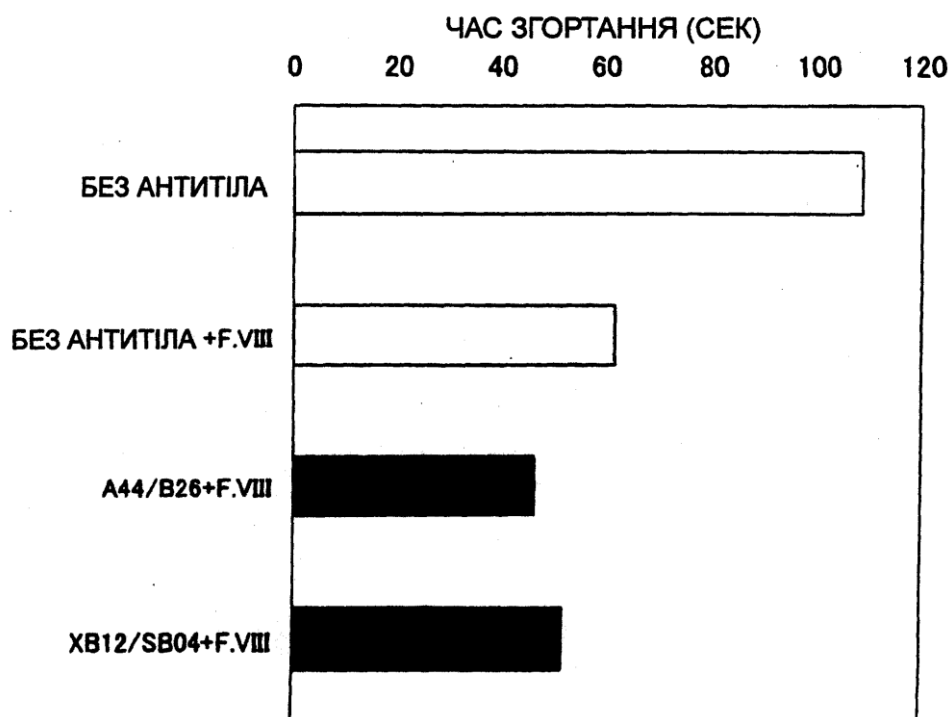
		До F.IXa										
		A19	A25	A31	A38	A39	A40	A41	A44	A50	A69	XB12
До F.X	B2								+			
	B5								++			
	B9											
	B10											++
	B11									++		++
	B12											++
	B13											+++
	B14								+			++
	B15								+			++
	B16			+								+++
	B18								++			
	B19								+			
	B20								++			
	B21								++			
	B23								++			
	B25								++			
	B26							+	++++		++++	
	B27								++			
	B31	++										+++
	B34-1											
	B34-2											
	B35			+						++		++
	B36											
	B38											
	B42											
	SB04	++		+	++	++		++	++	+++		+++
	SB15								++			
	SB27											



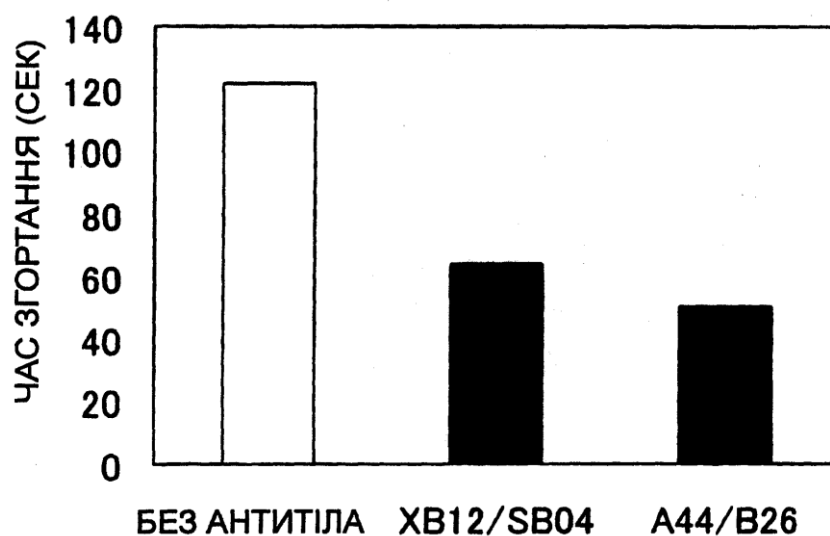
Фіг. 14



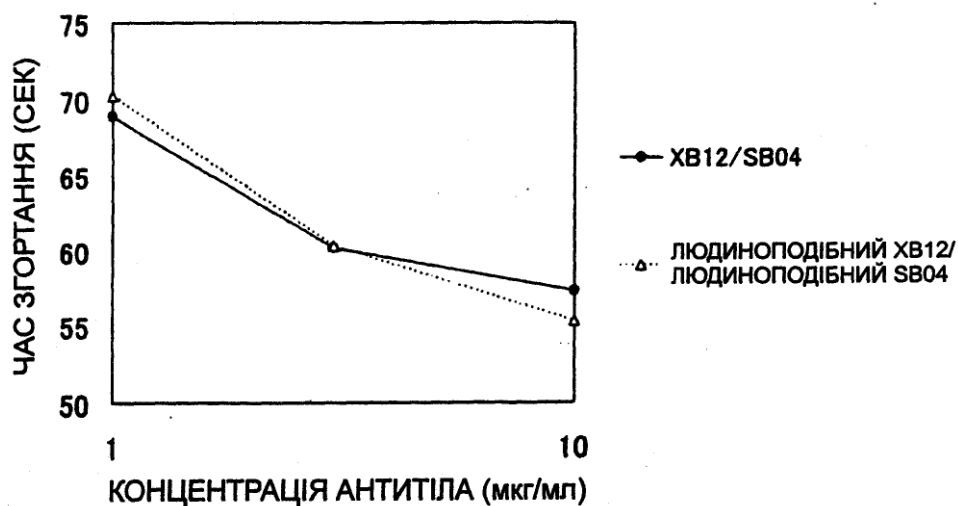
Фіг. 15



Фіг. 16



Фіг. 17



Фіг. 18