



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118332** (13) **C2**

(51) МПК (2018.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

A61P 35/00

A61P 37/00

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2014 04223</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>20.09.2012</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.01.2019</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/538,024</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>22.09.2011</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>25.07.2014, Бюл.№ 14</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.01.2019, Бюл.№ 1</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2012/056429, 20.09.2012</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Делейні Джон М. (US), Фенслоу Уілл'ям Крістіан III (US), Кінг Чедвік Теренс (CA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ЕМДЖЕН ІНК.,</b> One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California, 91320-1799, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: <b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2008/074004 A2, 19.06.2008. WO 2006/113909 A2, 26.10.2006. WO 2009/126934 A2, 15.10.2009. WO 2006/044643 A2, 27.04.2006. Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding / Davies J., Riechman L. // IMMUNOTECHNOLOGY. – 1996. – Vol. 2. – № 3. – P. 169-179. P.J. Carter. Potent antibody therapeutics by design / Carter P.J. // Nature Reviews. Immunology. – 2006. – Vol. 6. – P. 343-357. Wark K.L. et al. Latest technologies for the enhancement of antibody affinity / Wark K.L. et al. // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2006. – Vol. 58. – №5-6. – p. 657-670. WO 2008/070593 A2, 12.06.2008. WO 2004/073656 A2, 02.09.2004. WO 2007/038637 A2, 05.04.2007. US 5 573 924 A, 12.11.1996. WO 2008/051424 A2, 02.05.2008.</p>
---	--

## (54) БЛОК, ЩО ЗВ'ЯЗУЄ АНТИГЕН CD27L

### (57) Реферат:

Винахід належить до сполучних антиген CD27L білків, полінуклеотидів, які кодують зазначені сполучні антиген CD27L білки, композицій, що їх містять, кон'югатів лікарська сполука-антитіло та способів діагностики і лікування захворювань, пов'язаних із експресією CD27L.

UA 118332 C2



## Споріднені заявки

Дана заявка претендує на пріоритет на основі попередньої заявки США № 61/538 024, поданої 22 вересня 2011 р., зміст якої повністю включений в даний документ шляхом посилання.

Дана заявка подається разом із Переліком Послідовностей в електронному форматі. Перелік послідовностей представлений у вигляді файлу під іменем A-1437-US-NP(US Non-Prov)\_ST25.txt, створеного 17 вересня 2012 р., розмір якого становить 94,3 КБ. Інформація, що міститься в електронному поданні Переліку Послідовностей повністю включена в даний документ шляхом посилання.

Область техніки, до якої належить винахід

Даний винахід належить до області композицій антигенсполучних білків, здатних зв'язувати CD27L, а також до пов'язаних із ними способів.

Передумови створення

CD27L (CD70, TNFSF7) являє собою інтегральний мембранний білок II типу, експресія якого в нормальних тканинах суворо обмежена субпопуляцією активованих Т- і В-лімфоцитів, дендритними клітинами та невеликою субпопуляцією клітин в епітелії тимуса. Біологічні функції CD27L, які включають підвищення або регуляцію імунної відповіді, здійснюються за допомогою сполучення з його рецептором, CD27, який експресується в основному на лімфоїдних клітинах. Взаємодії CD27L/CD27 регулюють проліферацію та диференціювання В-лімфоцитів і коstimуляцію/активацію Т-лімфоцитів. Порухення взаємодії CD27L/CD27 у мишей з дефіцитом CD27 під час відсутності імунної стимуляції не дає ніякого фенотипу. (Grewal, Expert Opin. Ther. Targets. 12, 341-351 (2008)).

Крім дуже обмеженої експресії в нормальних тканинах, CD27L на досить високому рівні експресується в деяких підтипах В-клітинних неходжкінських лімфом (В-NHL), при пре-В-клітинному гострому лімфоцитарному лейкозі (ГПЛ) і при хронічних лімфоцитарних лейкозах В-клітинного типу (В-ХЛЛ). Аберрантна експресія CD27L також спостерігається в нирковоклітинній карциномі (НKK), але не в нормальних тканинах нирки або інших нормальних тканинах. Відповідно, CD27L багато в чому проявляє властивості, характерні для "пухлиноспецифічного антигену" (Grewal, Expert Opin. Ther. Targets. 12, 341-351 (2008)).

Щороку з приблизно 49 000 пацієнтів у США, у яких розвивається НKK, у більше ніж 40 000 діагностують прозороклітинну пкНKK (Дані Американського онкологічного товариства: American Cancer Society: Cancer Facts and Figures final (2008). Незважаючи на те, що за останні 4 роки деякі нові терапевтичні засоби були схвалені для лікування НKK, показники 5- літньої виживаності для пацієнтів із метастатичною НKK залишаються низькими на рівні приблизно 10-20 % (Дані Національного Онкологічного Інституту: National Cancer Institute. SEER cancer statistics fact sheet: cancer of the kidney and renal pelvis - доступні з 2008 р.), та існує значне невирішене медичне завдання. Передбачувана щорічна кількість пацієнтів, зі знову поставленим діагнозом пкНKK (Сполучені Штати), в якій, як очікують, буде експресуватися CD27L, становить приблизно 36000. За оцінками, число пацієнтів із активною пкНKK у цей час становить 64 000.

Серед В-клітинних злоякісних захворювань з аберрантною експресією CD27L підтипи В-НХЛ дифузійної В-великоклітинної лімфому (DLBCL) і фолікулярної лімфому (FL, ФЛ) демонструють найвищу частоту експресії, що варіює від 33 % для FL до 71 % для DLBCL за оцінками, зробленими імуногістохімічними методами на заморожених зрізах із використанням валідованого антитіла (Lens et al., Brit. J. Hematol. 106, 491-503 (1999). 50-89 % пухлин В-ХЛЛ також експресують CD27L згідно з оцінками, зробленими імуногістохімічними методами на заморожених зрізах, або методом поточної цитометрії на циркулюючих пухлинних клітинах (Ranheim et al., Blood 85, 3556-3565 (1965); Trentin et al., Cancer Res. 57, 4940-4947 (1997)).

З 127 000 пацієнтів у США, у яких у цей час активна В-НХЛ, приблизно у 50 % пухлина належить до підтипу DLBCL (середній ступінь) (Morton et al., Blood 107, 265-276 (2002)). Незважаючи на застосування стандартної терапії з використанням ритуксану з циклофосфамідом, адриамуцином, вінкристином, преднізоном (CHOP для пацієнтів із DLBCL, приблизно у 50 % відбуваються рецидиви. Відповідно, для цієї хвороби також існують невирішені медичні завдання.

Короткий виклад сутності винаходу

Даний винахід забезпечує антигенсполучні білки до CD27L, наприклад, антитіла та їх функціональні фрагменти. Зазначені антигенсполучні білки до CD27L особливо корисні у способах лікування захворювань та порушень, пов'язаних із аберрантною проліферацією клітин, наприклад, раку, та/або із запаленням.

У першому аспекті сполучний антиген CD27L білок містить а) варіабельну область легкого ланцюга, яка характеризується щонайменше 90 % ідентичністю, щонайменше 95 % ідентичністю або повною ідентичністю з амінокислотою послідовністю, представленою в SEQ ID

NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 або SEQ ID NO:70; б) варіабельну область важкого ланцюга, яка характеризується щонайменше 90 % ідентичністю, щонайменше 95 % ідентичністю або повною ідентичністю з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 або SEQ ID NO:24; або в) варіабельну область легкого ланцюга з а) та варіабельну область важкого ланцюга з б).

[illegible]

У другому аспекті сполучний антиген CD27L білок містить а) варіабельну область легкого ланцюга, що включає не більше десяти або не більше п'яти приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з амінокислотою послідовністю, представленою в SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 або SEQ ID NO:70; б) варіабельну область важкого ланцюга, що включає не більше десяти або не більше п'яти приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з амінокислотою послідовністю, представленою в SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 або SEQ ID NO:24; або в) варіабельну область легкого ланцюга з а) та варіабельну область важкого ланцюга з б).

Переважні антигенсполучні білки згідно з другим аспектом включають білки, які включають варіабельну область легкого ланцюга, що включає не більше десяти або не більше п'яти приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з амінокислотою послідовністю, представленою в SEQ ID NO:63, і варіабельну область важкого ланцюга, що включає не більше десяти або не більше п'яти приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з амінокислотою послідовністю, представленою в SEQ ID NO:17; білки, які включають варіабельну область легкого ланцюга, що включає не більше десяти або не більше п'яти приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з амінокислотою послідовністю.

[illegible]

[illegible]

Переважні сполучні антиген CD27L білки згідно з третім аспектом включають білки, які включають варіабельну область легкого ланцюга з a) та варіабельну область важкого ланцюга з i); білки, які включають варіабельну область легкого ланцюга з b) та варіабельну область важкого ланцюга з j); білки, які включають варіабельну область легкого ланцюга з c) та варіабельну область важкого ланцюга з k); білки, які включають варіабельну область легкого ланцюга з d) та варіабельну область важкого ланцюга з l); білки, які включають варіабельну область легкого ланцюга з e) та варіабельну область важкого ланцюга з m); білки, які

включають варіабельну область легкого ланцюга з f) та варіабельну область важкого ланцюга з n); білки, які включають варіабельну область легкого ланцюга з g) та варіабельну область важкого ланцюга з o); та білки, які включають варіабельну область легкого ланцюга з h) та варіабельну область важкого ланцюга з p).

- 5 У четвертому аспекті винаходу сполучний антиген CD27L білок відповідно до першого, другого або третього аспекту зв'язується з людським CD27L з афінністю, меншою або рівною  $2 \times 10^{-11}$  М. У п'ятому аспекті даного винаходу сполучний антиген CD27L білок відповідно до першого, другого, третього або четвертого аспекту інгібує сполучення CD27L з CD27.
- 10 У шостому аспекті даного винаходу сполучний антиген CD27L білок відповідно до першого, другого, третього, четвертого або п'ятого аспекту являє собою антитіло, таке як антитіло людини (людське антитіло). Переважні антитіла включають ті антитіла, які містять легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID:56, і важкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:10; ті, які містять легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID:57, і важкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:11; ті, які містять легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID:58, і важкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:12; ті, які містять легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID:59, і важкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:13; ті, які містять легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID:60, і важкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:14; ті, які містять легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID:61, і важкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:15; і ті, які містять легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID:62, і важкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:16.
- 20 У сьомому аспекті сполучний антиген CD27L білок відповідно до першого, другого, третього, четвертого, п'ятого або шостого аспекту кон'югований з лікарською сполукою або хіміотерапевтичним агентом. У переважних варіантах реалізації лікарська сполука або хіміотерапевтичний агент кон'юговані з антигенсполучним білком, наприклад, антитілом, з використанням лінкера. Переважні лінкери включають нерозщеплювані лінкери, такі як MCC. Переважним хіміотерапевтичним агентом є DM1. Відповідно, в особливо переважних варіантах реалізації сьомий аспект забезпечує сполучний антиген CD27L білок відповідно до першого, другого, третього, четвертого, п'ятого або шостого аспекту, кон'югований з DM1 лінкером MCC, приєднаним до одного або більшого числа залишків лізину.
- 35 Процес кон'югування DM1 зі сполучним антиген CD27L білком, наприклад, антитілом, забезпечить отримання композиції, що містить популяцію DM1-кон'югованих антитіл із різним числом молекул DM1 на антитіло. Можна виміряти середнє число для популяції. У переважних варіантах реалізації середнє число молекул DM1 на сполучний антиген CD27L білок, наприклад, антитіло, становить від 1 до 10, від 3 до 7 або від 4 до 6. У переважних варіантах реалізації композиція сполучних антиген CD27L білків відповідно до першого, другого, третього, четвертого, п'ятого, шостого або сьомого аспекту даного винаходу характеризується середнім числом молекул DM1 на сполучний антиген CD27L білок, рівним приблизно 4,0, приблизно 4,1, приблизно 4,2, приблизно 4,3, приблизно 4,4, приблизно 4,5, приблизно 4,6, приблизно 4,7, приблизно 4,8, приблизно 4,9, приблизно 5,0, приблизно 5,1, приблизно 5,2, приблизно 5,3, приблизно 5,4, приблизно 5,5, приблизно 5,6, приблизно 5,7, приблизно 5,8, приблизно 5,9 або приблизно 6,0. Такі композиції можуть містити терапевтично ефективну кількість сполучного антиген CD27L білка та можуть бути ліофілізовані.
- 40 У восьмому аспекті винахід забезпечує виділені нуклеїнові кислоти, які кодують один або більше поліпептидних компонентів сполучного антиген CD27L білка, наприклад, легкий ланцюг антитіла та важкий ланцюг антитіла. У переважних варіантах реалізації нуклеїнова кислота кодує поліпептид, який включає:
  - а) варіабельну область легкого ланцюга, що характеризується щонайменше 95 % ідентичністю з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 або SEQ ID NO:70;
  - 55 б) варіабельну область важкого ланцюга, що характеризується щонайменше 95 % ідентичністю з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 або SEQ ID NO:24;
  - с) варіабельну область легкого ланцюга, що включає не більше п'яти приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 або SEQ ID NO:70;
- 60





iv) HCDR1, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR1, представленою в SEQ ID NO:28; HCDR2, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR2, представленою в SEQ ID NO:36; і HCDR3, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR3, представленою в SEQ ID NO:44;

v) HCDR1, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR1, представленою в SEQ ID NO:29; HCDR2, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR2, представленою в SEQ ID NO:37; і HCDR3, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR3, представленою в SEQ ID NO:45;

vi) HCDR1, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR1, представленою в SEQ ID NO:30; HCDR2, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR2, представленою в SEQ ID NO:38; і HCDR3, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR3, представленою в SEQ ID NO:46;

vii) HCDR1, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR1, представленою в SEQ ID NO:31; HCDR2, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR2, представленою в SEQ ID NO:39; і HCDR3, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR3, представленою в SEQ ID NO:47; або

viii) HCDR1, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR1, представленою в SEQ ID NO:32; HCDR2, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR2, представленою в SEQ ID NO:40; і HCDR3, що містить не більше трьох приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з послідовністю HCDR3, представленою в SEQ ID NO:48.

У деяких варіантах реалізації восьмого аспекту поліпептид кодує легкий ланцюг антитіла, який щонайменше 80 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 % або на 100 % ідентичний нуклеотидній послідовності, представлений в SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54 або SEQ ID NO:55. В інших варіантах реалізації восьмого аспекту поліпептид кодує важкий ланцюг антитіла, який щонайменше 80 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 % або на 100 % ідентичний нуклеотидній послідовності, представлений в SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 або SEQ ID NO:9.

У дев'ятому аспекті даний винахід забезпечує експресійний вектор, який містить одну або більше нуклеїнових кислот згідно з восьмим аспектом. У деяких варіантах реалізації експресійний вектор кодує легкий ланцюг антитіла, важкий ланцюг антитіла або і легкий, і важкий ланцюги антитіла.

У десятому аспекті даний винахід забезпечує рекомбінантну клітину-хазяїна, що містить одну або більше нуклеїнових кислот згідно з восьмим аспектом, функціонально пов'язаних із промотором, включаючи рекомбінантні клітини-хазяїни, що містять один або більше експресійних векторів згідно з дев'ятим аспектом даного винаходу. У переважних варіантах реалізації рекомбінантна клітина-хазяїн секретує антитіло, яке зв'язує CD27L. Переважними клітинами-хазяїнами є лінії клітин ссавців, включаючи клітинні лінії CHO.

В одинадцятому аспекті винахід забезпечує способи отримання кон'югату антитіла до CD27L з лікарською сполукою згідно з сьомим аспектом шляхом кон'югування лінкера та лікарського засобу наприклад, хіміотерапевтичного агента, з будь-якими сполучними антиген CD27L білками відповідно до першого, другого, третього, четвертого, п'ятого або шостого аспектів. Можливо спочатку з'єднати лінкер і лікарський засіб, а потім кон'югувати їх із сполучним антиген CD27L білком, або лінкер може бути спочатку кон'югований зі сполучним антиген CD27L білком,

а потім з'єднаний з лікарською сполукою. У переважних варіантах реалізації лінкер являє собою MCC, і DM1. В особливо переважних варіантах реалізації сполучний антиген CD27L білок являє собою антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:63, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:17 (наприклад, Ab1), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:64, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:18 (наприклад, Ab2), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:65, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:19 (наприклад, Ab3), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:66, й амінокислотну

послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:20 (наприклад, Ab4), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:67, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:21 (наприклад, Ab5), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:68, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:22 (наприклад, Ab6), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:69, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:23 (наприклад, Ab7), або антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:70, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:24 (наприклад, Ab8), кон'юговане з DM1 за допомогою MCC шляхом здійснення хімічної реакції одного або більше залишків лізину в антитілі з MCC або MCC-DM1.

У дванадцятому аспекті винахід забезпечує способи лікування раку, які включають введення пацієнту терапевтично ефективної кількості композиції, що містить терапевтично ефективну кількість сполучного антиген CD27L білка відповідно до першого, другого, третього, четвертого, п'ятого або шостого аспектів. У переважних варіантах реалізації сполучний антиген CD27L білок являє собою антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:63, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:17 (наприклад, Ab1), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:64, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:18 (наприклад, Ab2), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:65, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:19 (наприклад, Ab3), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:66, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:20 (наприклад, Ab4), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:67, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:21 (наприклад, Ab5), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:68, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:22 (наприклад, Ab6), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:69, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:23 (наприклад, Ab7), або антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:70, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:24 (наприклад, Ab8). В особливо переважних варіантах реалізації сполучний антиген CD27L білок кон'югований з хіміотерапевтичним агентом (наприклад, DM1) за допомогою лінкера (MCC). В інших переважних варіантах реалізації дванадцятого аспекту антитіло має підвищену ефекторну функцію.

У деяких варіантах реалізації сполучний антиген CD27L білок вводять пацієнту, що страждає від одного з наступних захворювань: нирковоклітинні карциноми (НKK), світлоклітинну НKK, рак голови та шиї, гліобластоми, рак молочної залози, пухлина мозку, назофарингеальну карциному, неходжкінську лімфому (НХЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ), хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), лімфому Беркитта, анапластичні великоклітинні лімфоми (ALCL), множинні мієломи, Т-клітинні лімфоми шкіри, вузликові дрібноклітинні лімфоми з розсіченими ядрами, лімфоцитарні лімфоми, периферичні Т-клітинні лімфоми, лімфоми Ленерта, імунобластну лімфому, Т-клітинний лейкоз/лімфому (ATLL), Т-клітинний лейкоз дорослих (T-ALL), ентробластну/центроцитарну (cb/cc) фолікулярну злоякісну лімфому, дифузійну В-великоклітинну лімфому, Т-клітинну лімфому за типом ангіоімунобластної лімфаденопатії (AILD), асоційовану з ВІЛ лімфому черевної порожнини, ембріональну карциному, недиференційовану карциному носоглотки, хворобу Кастлемана, саркому Капоші, множинні мієломи, макроглобулінемію Вальденстрема або інші В-клітинні лімфоми.

У деяких варіантах реалізації взятий у пацієнта зразок досліджують на експресію CD27L до введення сполучного антиген CD27L білка. Експресія CD27L може бути визначена шляхом дослідження присутності кодуєчої CD27L РНК або присутності білка CD27L у зразку. Зразок може являти собою зразок крові або біоптат.

У тринадцятому аспекті винахід забезпечує способи лікування аутоімунного або запального порушення, причому зазначений спосіб включає введення терапевтично ефективної кількості

сполучного антиген CD27L білка відповідно до першого, другого, третього, четвертого, п'ятого або шостого аспектів пацієнту, що потребує цього. У переважних варіантах реалізації сполучний антиген CD27L білок являє собою антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:63, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:17 (наприклад, Ab1), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:64, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:18 (наприклад, Ab2), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:65, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:19 (наприклад, Ab3), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:66, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:20 (наприклад, Ab4), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:67, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:21 (наприклад, Ab5), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:68, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:22 (наприклад, Ab6), антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:69, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:23 (наприклад, Ab7), або антитіло, яке включає послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:70, й амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:24 (наприклад, Ab8). У переважних варіантах реалізації сполучний антиген CD27L білок інгібує сполучення CD27 з CD27L. В особливо переважних варіантах реалізації аутоімунне або запальне порушення являє собою системну червону вовчанку (СЧВ), інсулінозалежний цукровий діабет (IDDM), запальну хворобу кишечника (ЗХК, IBD), розсіяний склероз (РС), псоріаз, аутоімунний тироїдит, ревматоїдний артрит (РА) або гломерулонефрит. В інших варіантах реалізації лікування пригнічує або запобігає відторгненню трансплантата або хворобу трансплантат проти хазяїна у пацієнта.

Короткий опис графічних матеріалів

ФІГ. 1. Зведена інформація з функціональних і фізичних характеристик типових варіантів реалізації сполучних антиген CD27L білків.

ФІГ. 2. Вимірювання рівня та швидкості інтерналізації Ab4 (A4) і Ab8 (A8) та їх кон'югованих аналогів у клітини 786-0 від часу (A).

ФІГ. 3. Клітини 786-0 культивували протягом 4 днів у присутності зростаючих концентрацій стрептавідину-MCC-DM1, Ab4-MCC-DM1 і Ab8-MCC-DM1. Вплив на ріст клітин вимірювали з використанням реагенту CELL-TITER-GLO, який дозволяє вимірювати число клітин шляхом реєстрації люмінесценції.

ФІГ. 4. Відповідь на дозу Ab4-MCC-DM1 і Ab8-MCC-DM1 у моделі з ксенографтом 786-0.

Внутрішньовенне введення дози в день 24 позначене стрілкою близько відповідних доз.

ФІГ. 5. Відповідь на дозу Ab4-MCC-DM1 і Ab8-MCC-DM1 у моделі з ксенографтом Сакі-1. Графік внутрішньовенного введення доз позначений стрілками.

ФІГ. 6. Відповідь на дозу Ab4-MCC-DM1 у моделі з ксенографтом Raji. Графік внутрішньовенного введення доз позначений стрілками.

ФІГ. 7. Відповідь на різні дози Ab4-MCC-DM1 у моделі з ксенографтом 786-0.

ФІГ. 8. Аналіз антитілозалежної клітинної цитотоксичності (АЗКЦ) Ab4-MCC-DM1 відносно пухлинних клітин Raji.

ФІГ. 9. Аналіз антитілозалежного клітинного фагоцитозу (АЗКФ) Ab4-MCC-DM1 (ADCP) відносно пухлинних клітин Raji та 786-0.

ФІГ. 10. Порівняння експресії CD27L у попередньо заморожених зразках пухлин, які були визначені як "позитивні" у маскованому імуногістохімічному аналізі. Результати вказують на те, що загальна експресія білка CD27L найбільш висока у зразках пацієнтів зі скНKK, потім слідують зразки DLBCL (дифузійної В-великоклітинної лімфоми); В-ХЛЛ і FL.

ФІГ. 11. Результати аналізу експресії мРНК і білка CD27L. Результати вказують на високе переважання експресії CD27L у клітинах НKK, В-НХЛ і ХЛЛ.

На ФІГ. 12 показана структура кон'югатів Ab-MCC-DMADC, описаних у даній заявці у Прикладі 2. Докладний опис переважних варіантів реалізації винаходу

Використовувані тут назви розділів призначені винятково для цілей структурування, їх не слід сприймати як обмеження винаходу, що розкривається. Усі цитовані в тексті опису джерела явним чином повністю включені в опис шляхом посилання.

Стандартні методики можуть бути використані для синтезу рекомбінантних ДНК, олігонуклеотидів, культивування та трансформування тканин, очищення білків і т.п. Ферментативні реакції та методики очищення можуть здійснюватися відповідно до інструкцій виробника, або так, як це зазвичай робиться в даній області, або як описано тут. Описані нижче процедури та методики можуть у цілому бути здійснені як відомо в даній області або як описано в різних загальних або більш спеціальних джерелах, цитованих і обговорюваних у даному описі Див., наприклад, Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., яка включена в даний опис за допомогою посилання для будь-яких цілей. Якщо не дані конкретні визначення, застосовувана номенклатура, пов'язана з методами, а також лабораторні процедури аналітичної хімії, органічної хімії, а також медичної та фармацевтичної хімії, описані тут, добре відомі та широко застосовуються в даній області. Для хімічного синтезу, хімічного аналізу, виготовлення фармацевтичних препаратів, лікарських форм, доставляння та лікування пацієнтів можуть використовуватися стандартні методики.

#### CD27L

Антигенсполучні білки сполучаються з CD27L, також відомим як CD70 і TNFSF7. CD27L був уперше описаний у патенті США № 5 573 924. Приклад амінокислотної послідовності CD27L людини наведений тут як SEQ ID NO:1, що відповідає еталонній послідовності NCBI NP\_001423,1 (GI:4507605). У деяких варіантах реалізації антигенсполучний білок блокує взаємодію CD27L з його рецептором CD27. Приклад амінокислотної послідовності CD27 наведений як SEQ ID NO:2, що відповідає послідовності в базі Swiss-Prot: P26842,2 (GI:269849546). Зріла амінокислотна послідовність CD27 відповідає амінокислотам 20-260 послідовності SEQ ID NO:2.

#### Сполучні антиген CD27L білки

Даний винахід забезпечує антигенсполучні білки, які специфічно сполучають CD27L. Варіанти реалізації антигенсполучних білків включають пептиди та/або поліпептиди, які специфічно сполучають CD27L. Такі пептиди або поліпептиди можуть необов'язково включати одну або більше пост-трансляційних модифікацій. Варіанти антигенсполучних білків включають антитіла та їх фрагменти, різним чином визначені в даному тексті, які специфічно сполучають CD27L. До них відносяться антитіла, які специфічно сполучають CD27L людини, включаючи антитіла, які інгібують сполучення або активацію CD27 антигеном CD27L.

Антигенсполучні білки згідно з даним винаходом специфічно сполучаються з CD27L. "Специфічно сполучаються" у даному тексті означає, що антигенсполучний білок зв'язується з CD27L переважно у порівнянні з іншими білками. У деяких варіантах реалізації "специфічно сполучається" означає, що сполучний антиген CD27L білок має більш високу афінність до CD27L, ніж до інших білків. Сполучні антиген CD27L білки, які специфічно сполучають CD27L, можуть мати афінність сполучення у відношенні CD27L людини, меншу або рівну  $1 \times 10^{-7}$  M, меншу або рівну  $2 \times 10^{-7}$  M, меншу або рівну  $3 \times 10^{-7}$  M, меншу або рівну  $4 \times 10^{-7}$  M, меншу або рівну  $5 \times 10^{-7}$  M, меншу або рівну  $6 \times 10^{-7}$  M, меншу або рівну  $7 \times 10^{-7}$  M, меншу або рівну  $8 \times 10^{-7}$  M, меншу або рівну  $9 \times 10^{-7}$  M, меншу або рівну  $1 \times 10^{-8}$  M, меншу або рівну  $2 \times 10^{-8}$  M, меншу або рівну  $3 \times 10^{-8}$  M, меншу або рівну  $4 \times 10^{-8}$  M, меншу або рівну  $5 \times 10^{-8}$  M, меншу або рівну  $6 \times 10^{-8}$  M, меншу або рівну  $7 \times 10^{-8}$  M, меншу або рівну  $8 \times 10^{-8}$  M, меншу або рівну  $9 \times 10^{-8}$  M, меншу або рівну  $1 \times 10^{-9}$  M, меншу або рівну  $2 \times 10^{-9}$  M, меншу або рівну  $3 \times 10^{-9}$  M, меншу або рівну  $4 \times 10^{-9}$  M, меншу або рівну  $5 \times 10^{-9}$  M, меншу або рівну  $6 \times 10^{-9}$  M, меншу або рівну  $7 \times 10^{-9}$  M, меншу або рівну  $8 \times 10^{-9}$  M, меншу або рівну  $9 \times 10^{-9}$  M, меншу або рівну  $1 \times 10^{-10}$  M, меншу або рівну  $2 \times 10^{-10}$  M, меншу або рівну  $3 \times 10^{-10}$  M, меншу або рівну  $4 \times 10^{-10}$  M, меншу або рівну  $5 \times 10^{-10}$  M, меншу або рівну  $6 \times 10^{-10}$  M, меншу або рівну  $7 \times 10^{-10}$  M, меншу або рівну  $8 \times 10^{-10}$  M, меншу або рівну  $9 \times 10^{-10}$  M, меншу або рівну  $1 \times 10^{-11}$  M, меншу або рівну  $2 \times 10^{-11}$  M, меншу або рівну  $3 \times 10^{-11}$  M, меншу або рівну  $4 \times 10^{-11}$  M, меншу або рівну  $5 \times 10^{-11}$  M, меншу або рівну  $6 \times 10^{-11}$  M, меншу або рівну  $7 \times 10^{-11}$  M, меншу або рівну  $8 \times 10^{-11}$  M, меншу або рівну  $9 \times 10^{-11}$  M, меншу або рівну  $1 \times 10^{-12}$  M, меншу або рівну  $2 \times 10^{-12}$  M, меншу або рівну  $3 \times 10^{-12}$  M, меншу або рівну  $4 \times 10^{-12}$  M, меншу або рівну  $5 \times 10^{-12}$  M, меншу або рівну  $6 \times 10^{-12}$  M, меншу або рівну  $7 \times 10^{-12}$  M, меншу або рівну  $8 \times 10^{-12}$  M або меншу або рівну  $9 \times 10^{-12}$  M. Методи вимірювання афінності антигенсполучного білка добре відомі в даній області. У Прикладі 1 наведений приклад такого методу.

Мається на увазі, що якщо в даному тексті згадуються різні варіанти реалізації CD27L-сполучних антитіл, це також відноситься до їх CD27L-сполучних фрагментів. CD27L-сполучний фрагмент включає будь-який фрагмент антитіла, здатний специфічно зв'язуватися з CD27L. CD27L-сполучний фрагмент може бути у будь-якому описаному тут каркасі.

У деяких терапевтичних варіантах сполучний антиген CD27L білок інгібує сполучення CD27L з CD27 та/або інгібує один або більше видів біологічної активності, асоційованих зі сполученням CD27L з CD27, наприклад, CD27-опосередковувану передачу сигналу. Такі антигенсполучні білки називають "нейтралізуючими". У деяких варіантах реалізації нейтралізуючий сполучний

5 антиген CD27L білок специфічно зв'язує CD27L та інгібує сполучення CD27L з CD27 у будь-якому діапазоні від 10 % до 100 %, наприклад, на щонайменше приблизно 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % або більше.

10 Наприклад, сполучні антиген CD27L білки можуть бути досліджені на нейтралізуючу здатність шляхом визначення здатності антигенсполучного білка блокувати сполучення CD27-fc із клітинами MP-1 (Slack et al., Int. Immunol. (1995) 7(7): 1087-1092)).

Варіанти реалізації антигенсполучних білків включають каркасну структуру (остов), яка різними

15 шляхами визначена тут, з одним або більше визначальними компліментарністю (гіперваріабельними) ділянками (CDR). Варіанти реалізації додатково включають антигенсполучні білки, що включають каркасну структуру з однією або більшим числом варіабельних областей антитіла, важкого або легкого ланцюга. Варіанти реалізації включають антитіла, які включають варіабельну область легкого ланцюга антитіла, що вибрана з групи, яка складається з варіабельної області легкого ланцюга антитіла Ab1 (LCv), LCv антитіла Ab2, LCv

20 антитіла Ab3, LCv антитіла Ab4, LCv антитіла Ab5, LCv антитіла Ab6, LCv антитіла Ab7 і LCv антитіла Ab8 (SEQ ID NO:63-70, відповідно) та/або варіабельну область важкого ланцюга антитіла, вибрану з групи, яка складається з Ab1 Heavy Chain Variable Domain (HCv), HCv антитіла Ab2, HCv антитіла Ab3, Ab4 HCv, HCv антитіла Ab5, HCv антитіла Ab6, HCv антитіла Ab7 і Ab8 HCv (SEQ ID NO:17-24, відповідно), а також їхні фрагменти, похідні, мутеїни та

25 варіанти.

Прикладом легкого ланцюга, що містить LCv антитіла Ab1, є легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:56.

Прикладом легкого ланцюга, що містить LCv антитіла Ab2, є легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:57.

30 Прикладом легкого ланцюга, що містить LCv антитіла Ab4, є легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:58.

Прикладом легкого ланцюга, що містить LCv антитіла Ab5, є легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:59.

Прикладом легкого ланцюга, що містить LCv антитіла Ab6, є легкий ланцюг, що містить

35 амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:60.

Прикладом легкого ланцюга, що містить LCv антитіла Ab7, є легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:61.

Прикладом легкого ланцюга, що містить LCv антитіла Ab8, є легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:62.

40 Прикладом важкого ланцюга, що містить HCv антитіла Ab1, є важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:10.

Прикладом важкого ланцюга, що містить HCv антитіла Ab2, є важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:11.

Прикладом важкого ланцюга, що містить HCv антитіла Ab4, є важкий ланцюг, що містить

45 амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:12.

Прикладом важкого ланцюга, що містить HCv антитіла Ab5, є важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:13.

Прикладом важкого ланцюга, що містить HCv антитіла Ab6, є важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:14.

50 Прикладом важкого ланцюга, що містить HCv антитіла Ab7, є важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:15.

Прикладом важкого ланцюга, що містить Ab8 HCv, є важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:16.

Додаткові приклади передбачених каркасів включають: фібрoneктин, неокарциностанин CBM4-2, ліпокаліні, Т-клітинний рецептор, домен білка-A (білок Z), Im9, TPR-білки, домени "цинкові пальці", pVIII, панкреатичний поліпептид птахів, GCN4, WW-домен гомології Src 3, PDZ-домени, бета-лактамаза TEM-1, тиреодоксин, стафілококова нуклеаза, PHD-пальцеві домени CL-2, BPT1, APPI, HPST1, екотин, LACI-D1, LDT1, MTI-II, токсини скорпіонів, пептид дефенсину-A комах, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, цитохром b-562, домени рецептора Ldl, гамма-кристалін, убіквітин,

60 трансферин, і лектин-подібні домени C-типу. Каркаси неантитільного походження та їх

застосування в терапевтичних цілях описане у Gebauer і Skerra, Curr. Opin. Chem. Biol., 13:245-255 (2009) і Binz et al., Nat. Biotech., 23(10):1257-1268 (2005), які повністю включені в даний опис за допомогою посилання.

Аспекти даного винаходу включають антитіла, які містять наступні варіабельні області: LCv антитіла Ab1 /HCv антитіла Ab1 (SEQ ID NO:63/SEQ ID NO:17), LCv антитіла Ab2 /HCv антитіла Ab2 (SEQ ID NO:64/SEQ ID NO:18), LCv антитіла Ab3 /HCv антитіла Ab3 (SEQ ID NO:65/SEQ ID NO:19), LCv антитіла Ab4 /Ab4 HCv (SEQ ID NO:66/SEQ ID NO:20), LCv антитіла Ab5 /HCv антитіла Ab5 (SEQ ID NO:67/SEQ ID NO:21), LCv антитіла Ab6 /HCv антитіла Ab6 (SEQ ID NO:68/SEQ ID NO:22), LCv антитіла Ab7/HCv антитіла Ab7 (SEQ ID NO:69/SEQ ID NO:23), LCv антитіла Ab8/ HCv антитіла Ab8 (SEQ ID NO:70/SEQ ID NO:24) та їхні комбінації, а також їхні фрагменти, похідні, мутеїни та варіанти.

Приклади антитіл згідно з даним винаходом включають Ab1 (SEQ ID NO:56/SEQ ID NO:10), Ab2 (SEQ ID NO:57/SEQ ID NO:11), Ab4 (SEQ ID NO:58/SEQ ID NO:12), Ab5 (SEQ ID NO:59/SEQ ID NO:13), Ab6 (SEQ ID NO:60/SEQ ID NO:14), Ab7 (SEQ ID NO:61/SEQ ID NO:15), Ab8 (SEQ ID NO:62/SEQ ID NO:16).

Зазвичай кожна варіабельна область легкого або важкого ланцюга антитіла містить три ділянки CDR. Варіабельна область важкого ланцюга включає CDR1 (HCDR1) важкого ланцюга, CDR2 (HCDR2) важкого ланцюга та CDR3 (HCDR3) важкого ланцюга. Варіабельна область легкого ланцюга включає CDR1 (LCDR1) легкого ланцюга, CDR2 (LCDR2) легкого ланцюга та CDR3 (LCDR3) легкого ланцюга. У деяких варіантах реалізації антигенсполучний білок включає один або більше CDR, що містяться в описаних тут переважних варіабельних областях.

Приклади таких ділянок CDR включають наступні, але не обмежені ними:

ділянки CDR варіабельної області легкого ланцюга антитіла Ab1: LCDR1 (SEQ ID NO:71), LCDR2 (SEQ ID NO:79) і LCDR3 (SEQ ID NO:87);

ділянки CDR варіабельної області легкого ланцюга антитіла Ab2: LCDR1 (SEQ ID NO:72), LCDR2 (SEQ ID NO:80) і LCDR3 (SEQ ID NO:88);

ділянки CDR варіабельної області легкого ланцюга антитіла Ab3: LCDR1 (SEQ ID NO:73), LCDR2 (SEQ ID NO:81) і LCDR3 (SEQ ID NO:89);

ділянки CDR варіабельної області легкого ланцюга антитіла Ab4: LCDR1 (SEQ ID NO:74), LCDR2 (SEQ ID NO:82) і LCDR3 (SEQ ID NO:90);

ділянки CDR варіабельної області легкого ланцюга антитіла Ab5: LCDR1 (SEQ ID NO:75), LCDR2 (SEQ ID NO:83) і LCDR3 (SEQ ID NO:91);

ділянки CDR варіабельної області легкого ланцюга антитіла Ab6: LCDR1 (SEQ ID NO:76), LCDR2 (SEQ ID NO:84) і LCDR3 (SEQ ID NO:92);

ділянки CDR варіабельної області легкого ланцюга антитіла Ab7: LCDR1 (SEQ ID NO:77), LCDR2 (SEQ ID NO:85) і LCDR3 (SEQ ID NO:93);

ділянки CDR варіабельної області легкого ланцюга антитіла Ab8: LCDR1 (SEQ ID NO:78), LCDR2 (SEQ ID NO:86) і LCDR3 (SEQ ID NO:94);

ділянки CDR варіабельної області важкого ланцюга антитіла Ab1: HCDR1 (SEQ ID NO:25), HCDR2 (SEQ ID NO:33) і HCDR3 (SEQ ID NO:41);

ділянки CDR варіабельної області важкого ланцюга антитіла Ab2: HCDR1 (SEQ ID NO:26), HCDR2 (SEQ ID NO:34) і HCDR3 (SEQ ID NO:42);

ділянки CDR варіабельної області важкого ланцюга антитіла Ab3: HCDR1 (SEQ ID NO:27), HCDR2 (SEQ ID NO:35), і HCDR3 (SEQ ID NO:43);

ділянки CDR варіабельної області важкого ланцюга антитіла Ab4: HCDR1 (SEQ ID NO:28), HCDR2 (SEQ ID NO:36) і HCDR3 (SEQ ID NO:44);

ділянки CDR варіабельної області важкого ланцюга антитіла Ab5: HCDR1 (SEQ ID NO:29), HCDR2 (SEQ ID NO:37) і HCDR3 (SEQ ID NO:45);

ділянки CDR варіабельної області важкого ланцюга антитіла Ab6: HCDR1 (SEQ ID NO:30), HCDR2 (SEQ ID NO:38) і HCDR3 (SEQ ID NO:46);

ділянки CDR варіабельної області важкого ланцюга антитіла Ab7: HCDR1 (SEQ ID NO:31), HCDR2 (SEQ ID NO:39) і HCDR3 (SEQ ID NO:47); і

ділянки CDR варіабельної області важкого ланцюга антитіла Ab8: HCDR1 (SEQ ID NO:32), HCDR2 (SEQ ID NO:40) і HCDR3 (SEQ ID NO:48).

У деяких варіантах реалізації антигенсполучний білок включає: А) поліпептид, наприклад, легкий ланцюг, який включає LCDR1, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NOS:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77 і 78; LCDR2, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NOS: 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 і 86; та/або LCDR3, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NOS:87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 і 94; і/або В) поліпептид, наприклад, важкий ланцюг, який містить

HCDR1, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NOS:25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 і 32; HCDR2, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NOS:33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 і 40; і/або HCDR3, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NOS:41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 і 48.

В інших варіантах реалізації антигенсполучний білок містить А) амінокислотну послідовність легкого ланцюга, яка включає LCDR1, LCDR2 і LCDR3 будь-якої з LCv антитіла Ab1, LCv антитіла Ab2, LCv антитіла Ab3, LCv антитіла Ab4, LCv антитіла Ab5, LCv антитіла Ab6, LCv антитіла Ab7 і LCv антитіла Ab8, та В) амінокислотну послідовність важкого ланцюга, яка включає HCDR1, HCDR2 і HCDR3 будь-якої з HCv антитіла Ab1, HCv антитіла Ab2, HCv антитіла Ab3, Ab4 HCv, HCv антитіла Ab5, HCv антитіла Ab6, HCv антитіла Ab7 і Ab8 HCv.

У деяких варіантах реалізації ділянки CDR включають не більше однієї, не більше двох, не більше трьох, не більше чотирьох, не більше п'яти або не більше шести приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з прикладом CDR, наведеним тут.

Аспекти даного винаходу включають антитіла, які містять варіабельну область легкого ланцюга антитіла, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NOS:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 і 70. Аспекти даного винаходу включають антитіла, які містять варіабельну область важкого ланцюга антитіла, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NOS:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 і 24. Додаткові аспекти даного винаходу включають антитіла, які містять А) варіабельну область легкого ланцюга антитіла, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NOS:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 і 70, та В) варіабельну область важкого ланцюга антитіла, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NOS:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 і 24.

Антитіла згідно з даним винаходом можуть містити будь-яку константну область, відому в даній області техніки. Константна область легкого ланцюга може являти собою, наприклад, константну область легкого ланцюга типу каппа або лямбда, наприклад, людську константну область легкого ланцюга типу каппа або лямбда. Константна область важкого ланцюга може являти собою, наприклад, константну область важкого ланцюга типу альфа-, дельта-, епсилон-, гамма- або му-, наприклад, людську константну область важкого ланцюга типу альфа-, дельта-, епсилон-, гамма- або му-. В одному варіанті реалізації константна область легкого або важкого ланцюга являє собою фрагмент, похідну, мутеїн, варіант або природну константну область.

Аспекти даного винаходу включають антитіла, які містять варіабельну область легкого ланцюга, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NOS:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 і 70, що включає не більше однієї, не більше двох, не більше трьох, не більше чотирьох, не більше п'яти, не більше шести, не більше семи, не більше восьми, не більше дев'яти або не більше десяти приєднань, делецій або замінів амінокислот. Аспекти даного винаходу включають антитіла, які містять варіабельну область важкого ланцюга, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NOS:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 і 24, що включає не більше однієї, не більше двох, не більше трьох, не більше чотирьох, не більше п'яти, не більше шести, не більше семи, не більше восьми, не більше дев'яти або не більше десяти приєднань, делецій або замінів амінокислот. Інші аспекти даного винаходу включають антитіла, які містять А) варіабельну область легкого ланцюга, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NOS:63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 і 70, що містить не більше однієї, не більше двох, не більше трьох, не більше чотирьох, не більше п'яти, не більше шести, не більше семи, не більше восьми, не більше дев'яти або не більше десяти приєднань, делецій або замінів амінокислот; і В) варіабельну область важкого ланцюга, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NOS:17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 і 24, що містить не більше однієї, не більше двох, не більше трьох, не більше чотирьох, не більше п'яти, не більше шести, не більше семи, не більше восьми, не більше дев'яти або не більше десяти приєднань, делецій або замінів амінокислот. Наприклад, у деяких прикладах реалізації, антитіло містить 1) варіант варіабельної області легкого ланцюга, показаної в SEQ ID NO:66, в якому фенілаланін у положенні 51 замінений на лейцин, і/або пролін у положенні 105 замінений на гліцин або глютамін; 2) варіант варіабельної області важкого ланцюга, показаної в SEQ ID NO:20, в якому глютамін у положенні 1 замінений на глютамінову кислоту, й/або аргінін у положенні 16 замінений на гліцин; або варіант варіабельної області легкого ланцюга, показаної в SEQ ID NO:66, в якому фенілаланін у положенні 51 замінений на лейцин, і/або пролін у положенні 105 замінений на гліцин або глютамін, і варіант варіабельної області важкого ланцюга, показаної в SEQ ID NO:20, в якому глютамін у положенні 1 замінений на глютамінову кислоту, й/або аргінін у положенні 16 замінений на гліцин.

В одному варіанті антигенсполучний білок містить амінокислотну послідовність, яка на щонайменше 80 %, щонайменше 81 %, щонайменше 82 %, щонайменше 83 %, щонайменше 84 %, щонайменше 85 %, щонайменше 86 %, щонайменше 87 %, щонайменше 88 %, щонайменше 89 %, щонайменше 90 %, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % або 100 % ідентична будь-якій з послідовностей, показаних у SEQ ID NOS:1-100.





або не більше шести приєднань, делецій або замінів амінокислот у порівнянні з прикладом послідовності, позначеним SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 і 32. Відповідно, варіанти реалізації даного винаходу включають антигенсполучний білок, що включає амінокислотну послідовність, яка на щонайменше 80 %, щонайменше 81 %, щонайменше 82 %, щонайменше 83 %, щонайменше 84 %, щонайменше 85 %, щонайменше 86 %, щонайменше 87 %, щонайменше 88 %, щонайменше 89 %, щонайменше 90 %, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентична амінокислотній послідовності, що вибрана з групи послідовностей, позначених SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 і 32.

Антигенсполучні білки згідно з даним винаходом включають каркаси звичайних антитіл, включаючи антитіла людини та моноклональні антитіла, біспецифічні антитіла, діатіла, мінітіла, доменні антитіла, синтетичні антитіла (які іноді називають тут "міметиками антитіл"), химерні антитіла, гібриди антитіл (які іноді називають тут "кон'югати антитіл") і фрагменти кожного з них, відповідно. Описані вище CDR, включаючи різні комбінації CDR, можуть бути прищеплені на будь-який з наступних каркасів.

У даному тексті термін "антитіло" відноситься до різних форм мономірних або мультимірних білків, що містять один або більше поліпептидних ланцюгів, які специфічно сполучаються з антигеном, різними способами описаним тут. У деяких варіантах реалізації антитіла отримані за технологією рекомбінантної ДНК. У додаткових варіантах реалізації антитіла отримані шляхом ферментативного або хімічного розщеплення природних антитіл. В іншому аспекті антитіло вибране з групи, яка складається з: а) антитіла людини; b) гуманізованого антитіла; c) химерного антитіла; d) моноклонального антитіла; e) поліклонального антитіла; f) рекомбінантного антитіла; g) антигенсполучного фрагмента; h) одноланцюгового антитіла; i) діатіла; j) триатіла, k) тетратіла, l) Fab-фрагмента; m) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, n) антитіла IgA, o) антитіла IgD, p) антитіла IgE, q) антитіла IgG1, r) антитіла IgG2, s) антитіла IgG3, t) антитіла IgG4 й u) антитіла IgM.

Варіабельна область включає щонайменше три гіперваріабельних ділянки (CDR) легкого або важкого ланцюга, розташованих між каркасними ділянками (що позначаються як каркасні ділянки FR1, FR2, FR3 і FR4). Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD. Структурні блоки звичайного антитіла зазвичай містять тетрамер. Кожний тетрамер зазвичай складається з двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, де кожна пара містить один "легкий" та один "важкий" ланцюг. Аміно-кінцеві частини кожного ланцюга включають варіабельну область розміром приблизно від 100 до 110 або більше амінокислот, яка в основному відповідає за розпізнавання антигену. Карбокси-кінцева частина кожного ланцюга визначає константну область, яка відповідає в основному за ефекторну функцію. У людини варіабельні області діляться на каппа і лямбда легкі ланцюги. Важкі ланцюги діляться на типи мю, дельта, гамма, альфа або епсилон і визначають ізотип антитіла: IgM, IgD, IgG, IgA та IgE, відповідно. IgG включає декілька підкласів, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4. IgM ділиться на підкласи, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: IgM1 та IgM2. Варіанти реалізації даного винаходу включають всі такі класи та підкласи антитіл, які містять варіабельну область або CDR антигенсполучних білків, описані в даному тексті.

Деякі природні антитіла, такі як антитіла, що зустрічаються у верблюдів і лам, являють собою димери, які складаються з двох важких ланцюгів, і не містять легких ланцюгів. Даний винахід включає димерні антитіла з двох важких ланцюгів або їхні фрагменти, здатні сполучати CD27L.

Варіабельні області важкого та легкого ланцюгів зазвичай демонструють загальну структуру, яка складається з порівняно консервативних каркасних ділянок (FR), з'єднаних трьома гіперваріабельними ділянками, тобто ділянками, що визначають компліментарність або CDR.

Ділянки CDR у першу чергу відповідають за розпізнавання та сполучення антигенів. CDR із двох ланцюгів кожної пари вирівнюються каркасними ділянками, що забезпечує сполучення конкретного епітопу. Від N-кінця до C-кінця, і легкий, і важкий ланцюги містять домени s FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4. Віднесення амінокислот до кожного домена здійснюється відповідно до системи Kabat.

CDR складають основні поверхневі контактні точки для сполучення антигену. CDR3 легкого ланцюга, та, особливо, CDR3 важкого ланцюга можуть утворювати найбільш важливі детермінанти для сполучення антигену у варіабельних областях легкого та важкого ланцюгів. У деяких антитілах важкий ланцюг CDR3 очевидно утворює основну зону контакту між антигеном і антитілом. Схеми селекції *in vitro*, в яких змінюється тільки CDR3, можна використовувати для

зміни властивостей сполучення антитіла або визначення, які залишки беруть участь у зв'язуванні з антигеном.

Природні антитіла зазвичай включають сигнальну послідовність, яка направляє антитіло в клітинний апарат секреції білків і яка зазвичай не є присутньою у зрілих антитілах.

5 Полінуклеотид, що кодує антитіло згідно з даним винаходом, може кодувати присутню в природніх умовах сигнальну послідовність або гетерологічну сигнальну послідовність, описані нижче.

В одному варіанті реалізації антигенсполучний білок являє собою антитіло, що містить від одного до шести типових CDR, описаних тут. Антитіла згідно з даним винаходом можуть належати до будь-якого типу, включаючи антитіла IgM, IgG (включаючи IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgD, IgA або IgE. В одному конкретному варіанті реалізації антигенсполучний білок являє собою антитіло типу IgG, наприклад, антитіло IgG1.

У деяких варіантах реалізації, наприклад, коли антигенсполучний білок являє собою антитіло з повними легким та важким ланцюгом, усі CDR отримані з одного виду, наприклад, людини. В альтернативному варіанті, наприклад, у тих варіантах реалізації, де антигенсполучний білок містить менше шести CDR із наведених вище послідовностей, додаткові CDR можуть бути або з іншого виду, або можуть являти собою людські CDR, відмінні від охарактеризованих у прикладах послідовностей. Наприклад, ділянки HCDR3 і LCDR3 із відповідних послідовностей, ідентифікованих тут, можна застосовувати з HCDR1, HCDR2, LCDR1 і LCDR2, які необов'язково можуть бути вибрані з послідовностей іншого виду або послідовностей інших антитіл людини, або їх комбінацій. Наприклад, ділянками CDR згідно з даним винаходом можна замінити ділянки CDR комерційних химерних або гуманізованих антитіл.

У конкретних варіантах реалізації використовуються каркасні компоненти антигенсполучних білків, які є людськими компонентами. У деяких варіантах реалізації, однак, каркасні компоненти можуть являти собою суміш із різних видів. Відповідно, якщо антигенсполучний білок являє собою антитіло, таке антитіло може бути химерним антитілом і/або гуманізованим антитілом. Зазвичай, і "химерні антитіла", і "гуманізовані антитіла" відносяться до антитіл, у яких суміщені області з більше ніж одного виду. Наприклад, "химерні антитіла" зазвичай містять варіабельну область (області) миші (або, у деяких випадках, пацюка) та константну область (області) людини.

"Гуманізовані антитіла" - це зазвичай антитіла не-людського походження, в яких каркасні ділянки варіабельних областей були замінені на послідовності з людських антитіл. Зазвичай у випадку гуманізованого антитіла все антитіло, за винятком одного або більше CDR, кодується полінуклеотидом людського походження або ідентично такому антитілу за винятком одного або більше CDR. Ділянки CDR, деякі або всі з яких кодуються нуклеїновими кислотами, що походять з організму, відмінного від людини, прищеплюють на бета-складчастий каркас варіабельної області антитіла людини, специфічність якого визначається прищепленими CDR. Створення таких антитіл описане у, наприклад, WO 92/11018, Jones 1986, Nature 321:522-525, Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-1536. Гуманізовані антитіла також можуть бути отримані з використанням мишей з генетично модифікованою імунною системою. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. В описаних тут типових прикладах реалізації ідентифіковані CDR є людськими, і, відповідно, і гуманізовані, і химерні антитіла в цьому контексті включають деякі CDR, що не є людськими; наприклад, можуть бути отримані гуманізовані антитіла, які містять ділянки HCDR3 і LCDR3, причому одна або більше з інших ділянок CDR походять з інших видів.

В одному варіанті реалізації сполучний антиген CD27L білок являє собою мультиспецифічне антитіло, зокрема, біспецифічне антитіло, яке іноді називають також "діатілом". Вони являють собою антитіла, які сполучаються з двома або більше різними епітопами одного антигену. У деяких варіантах реалізації біспецифічне антитіло сполучає CD27L та який-небудь антиген на людській ефекторній клітині (наприклад, Т-клітині). Такі антитіла можна використовувати для націлювання відповіді ефекторних клітин проти клітин, які експресують CD27L, таких як пухлинні клітини. У переважних варіантах реалізації антиген ефекторної клітини людини являє собою CD3. Патент США № 7235641. Способи отримання біспецифічних антитіл відомі в даній області. Один із таких способів включає конструювання Fc-частини важких ланцюгів таким чином, щоб утворювалися "виступи" і "западини", які полегшують утворення гетеродимерів важких ланцюгів при спільній експресії в клітині. США 7695963. Інший спосіб також включає модифікацію Fc-частини важкого ланцюга, але з використанням електростатичного керування для стимуляції утворення гетеродимерів і пригнічування утворення гомодимерів при спільній експресії в клітині. WO 09/089,004, яке джерело повністю включене в даний опис шляхом посилання.

В одному варіанті реалізації сполучний антиген CD27L білок являє собою мінітіло. Мінітіла являють собою мінімізовані антитіло-подібні білки, що містять scFv, пов'язаний з доменом. Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061.

В одному варіанті реалізації сполучний антиген CD27L білок доменне антитіло; див., наприклад, патент США №. 6248516. Доменні антитіла (dAbs) являють собою функціональні сполучні домени антитіл, які відповідають варіабельним областям легкого (VH) або важкого (VL) ланцюга людського антитіла. Молекулярна маса dAB становить приблизно 13 кДА або менше однієї десятої розміру повного антитіла. dABs добре експресуються в різних хазяїнах, включаючи системи на основі клітин бактерій, дріжджів і ссавців. Крім того, dAbs мають високу стабільність та зберігають активність навіть після поміщення в жорсткі умови, такі як сушіння заморожуванням або теплової денатурації. Див., наприклад, патенти США 6291158; 6582915; 6593081; 6172197; Заявка США № 2004/0110941; Європейський патент № 0368684; Патент США № 6 696 245, публікації WO 04/058821, WO 04/003019 WO 03/002609.

В одному варіанті реалізації сполучний антиген CD27L білок являє собою фрагмент антитіла, тобто фрагмент будь-якого з антитіл, описаних у даному тексті, який зберігає специфічність сполучення з CD27L. В різних варіантах реалізації антитілосполучні білки включають, але не обмежені перерахованими: фрагменти F(ab), F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> або одноланцюговий Fv. Як мінімум антитіло в контексті даного винаходу включає поліпептид, який здатний специфічно зв'язуватися з CD27L, що містить варіабельні області легкого та важкого ланцюгів антитіла повністю або їх частини, наприклад, один або більше CDR.

Інші приклади фрагментів CD27L-сполучних антитіл включають, але не обмежені перерахованими: (i) Fab-фрагмент, який складається з доменів VL, VH, CL і CH1, (ii) Fd-фрагмент, який складається з доменів VH і CH1, (iii) Fv-фрагмент, який складається з доменів VL і VH одного антитіла; (iv) dAb-фрагмент (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546), який складається з єдиного варіабельного ланцюга, (v) виділені ділянки CDR, (vi) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти, бівалентні фрагменти, які містять два сполучених Fab-фрагмента (vii) одноланцюгові молекули Fv (scFv), в яких домени а VH і VL сполучені пептидним лінкером, який дозволяє цим двом доменам асоціювати із сайтом сполучення антитіла (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883), (viii) біспецифічні одноланцюгові димери Fv (PCT/US92/09965) і (ix) "діатіла" або "триатіла", мультівалентні або мультиспецифічні фрагменти, отримані шляхом гібридизації генів (Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448). Фрагменти антитіл можуть бути модифіковані. Наприклад, молекули можуть бути стабілізовані шляхом впровадження дисульфідних містків, які сполучають домени VH і VL (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245). Аспекти даного винаходу включають варіанти реалізації, в яких відмінні CDR компоненти цих фрагментів являють собою людські послідовності.

В одному варіанті реалізації сполучний антиген CD27L білок являє собою повністю людське антитіло. У цьому варіанті реалізації, як описано вище, конкретні структури містять повні зазначені важкі та легкі ланцюги, які містять ділянки CDR. У додаткових варіантах реалізації застосовують один або більше CDR згідно з даним винаходом, з іншими CDR, каркасними ділянками, ділянками J і D, константними областями тощо, отриманими з інших антитіл людини. Наприклад, ділянками CDR згідно з даним винаходом можна замінити ділянки CDR будь-якого числа антитіл людини, зокрема, комерційних антитіл.

Одноланцюгові антитіла можуть бути утворені шляхом сполучення фрагментів варіабельних доменів важкого та легкого ланцюга (Fv-ділянка) амінокислотним містком (короткий пептидний лінкер), з отриманням єдиного пептидного ланцюга. Такі одноланцюгові Fv (scFvs) отримують шляхом гібридизації ДНК, що кодують поліпептиди варіабельної області (VL і VH). Отримані в результаті поліпептиди можуть укладатися з утворенням антигенсполучних мономерів (наприклад, димерів, тримерів або тетрамерів), залежно від довжини гнучкого лінкера між двома варіабельними областями (Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). Поєднуючи різні VL- і VH-вмісні поліпептиди можна отримати мультимірні scFv, які сполучаються з різними епітопами (Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). Методики, розроблені для отримання одноланцюгових антитіл, включають методики, описані у Патенті США № 4 946 778; Bird, 1988, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544, de Graaf et al., 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87. Одноланцюгові антитіла, отримані з розкритих тут антитіл (включаючи scFvs, що містять комбінації варіабельних областей LCv антитіла Ab1 /HCv антитіла Ab1 (SEQ ID NO:63/SEQ ID NO:17), LCv антитіла Ab2 /HCv антитіла Ab2 (SEQ ID NO:64/SEQ ID NO:18), LCv антитіла Ab3 /HCv антитіла Ab3 (SEQ ID NO:65/SEQ ID NO:19), LCv антитіла Ab4 /Ab4 HCv (SEQ ID

NO:66/SEQ ID NO:20), LCv антитіла Ab5 /HCv антитіла Ab5 (SEQ ID NO:67/SEQ ID NO:21), LCv антитіла Ab6 /HCv антитіла Ab6 (SEQ ID NO:68/SEQ ID NO:22), LCv антитіла Ab7/HCv антитіла Ab7 (SEQ ID NO:69/SEQ ID NO:23), LCv антитіла Ab8/Ab8 HCv (SEQ ID NO:70/SEQ ID NO:24, але не обмежуючись ними) та їхні комбінації включені в даний винахід.

5 В одному варіанті реалізації сполучний антиген CD27L білок являє собою гібридний білок антитіла (який іноді називають тут "кон'югатом антитіла"). Партнером для утворення кон'югату може бути білкова або небілкова сполука; причому останні отримують з використанням функціональних груп на антигенсполучному білку та на партнері з утворення кон'югату. У деяких варіантах реалізації антитіло кон'югованої з небілковим хімічним (лікарським засобом) з

10 утворенням кон'югату антитіло-лікарська сполука. Приклади кон'югатів антитіло-лікарська сполука та способів їх отримання обговорюються нижче.  
В одному варіанті реалізації сполучний антиген CD27L білок являє собою аналог антитіла, які іноді називають "синтетичними антитілами". Наприклад, у різних роботах застосовують альтернативні білкові каркаси або штучні каркаси з прищепленими ділянками CDR. Такі каркаси

15 включають, але не обмежуються перерахованими: мутації, введені для стабілізації тривимірної структури сполучного білка, а також повністю синтетичні каркаси, які складаються, наприклад, з біосумісних полімерів. Див., наприклад, Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Volume 53, Issue 1:121-129. Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. Крім того можуть застосовуватися пептидні міметики антитіл ("Pams"), а також конструкції на основі

20 міметиків антитіл, які містять фібронектинові компоненти каркаса.

Під "білком" у даному тексті розуміють щонайменше дві ковалентно сполучені амінокислоти, включаючи білки, поліпептиди, олігопептиди та пептиди. У деяких варіантах реалізації дві або більше ковалентно сполучених амінокислот сполучені пептидним зв'язком. Білок може складатися з природних амінокислот і пептидних зв'язків, наприклад, коли білок отримують

25 рекомбінантним способом із використанням системи експресії та клітин-хазяїнів, як описано нижче. В альтернативному варіанті білок може включати синтетичні амінокислоти (наприклад, гомофенілаланін, цитрулін орнітин і норлейцин) або структури - пептидоміметики, тобто, "аналоги білків або пептидів", такі як пептоїди (див., Simon et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:9367, дане джерело включене в даний текст шляхом посилання), які можуть бути

30 стійкі до дії протеаз або інших фізіологічних умов та/або умов зберігання. Такі синтетичні амінокислоти можуть бути включені, зокрема, у випадку, коли антигенсполучний білок синтезується *in vitro* звичайними способами, відомими у техніці. Крім того, може бути використана будь-яка комбінація пептидоміметиків, синтетичних і природних залишків/структур. Термін "амінокислота" також включає залишки амінокислот, таких як пролін і гідроксипролін. "R-група" або "бічний ланцюг" амінокислоти можуть бути присутніми у будь-якій з конфігурацій (L)- або (S)-. В особливому варіанті здійснення, амінокислоти перебувають в (L)- або (S)-конфігурації.

У деяких аспектах даний винахід забезпечує рекомбінантні антигенсполучні білки, які сполучають CD27L, і, у деяких варіантах реалізації рекомбінантний людський CD27L або його

40 частина. У цьому контексті "рекомбінантний білок" являє собою білок, отриманий з використанням рекомбінантних методик і відомих у техніці способів, тобто, шляхом експресії рекомбінантної нуклеїнової кислоти, як описано тут. Способи та методики отримання рекомбінантних білків добре відомі в техніці. Варіанти реалізації даного винаходу включають рекомбінантні антигенсполучні білки, які сполучають CD27L дикого типу та його варіанти.

45 "Складається по суті з" означає, що амінокислотна послідовність може відрізнитися на приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 % щодо зазначеної послідовності SEQ ID NO: і буде зберігати описану тут біологічну активність.

У деяких варіантах реалізації антигенсполучні білки згідно з даним винаходом являють собою виділені (ізольовані білки) або по суті чисті білки. "Виділений" білок вільний від щонайменше

50 частини матеріалу, з яким він зазвичай асоційований у природному стані, наприклад, становить щонайменше приблизно 5 % або щонайменше приблизно 50 % від маси загального білка в даному зразку. Передбачається, що виділений білок може становити від 5 до 99,9 % за масою загального вмісту білка залежно від умов. Наприклад, білок може бути отриманий у значно підвищеній концентрації за рахунок застосування індукційного промотору або промотору, який забезпечує високий рівень експресії, що забезпечує підвищення рівня концентрації білка, який отримують. Це визначення включає продукцію антигенсполучного білка в різних організмах і/або клітинах-хазяїнах, які відомі в техніці.

Для амінокислотних послідовностей ідентичність та/або близькість послідовності визначається з використанням стандартних відомих у техніці методик, включаючи, але не обмежуючись

60 перерахованими: алгоритм визначення локальної ідентичності, описаний в Smith і Waterman,

1981, Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритм ідентичності послідовності вирівнювання, описаний в Needleman і Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, метод пошуку близькості Пірсона та Ліпмана, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, і комп'ютерні реалізації цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA і TFASTA у програмному пакеті Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis., США), програму Best Fit, описану в Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, переважно з використанням налаштувань за замовчуванням, або шляхом вивчення. У переважному випадку відсоток ідентичності розраховується з використанням БД FastDB на основі наступних параметрів: штраф за неспівпадіння 1; штраф за пропуск 1; штраф за розмір пропуску 0,33; і штраф за сполучення 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis, " Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Прикладом корисного алгоритму є PILEUP. PILEUP генерує множину вирівнювань послідовностей за групою сполучених послідовностей з використанням прогресивних парних вирівнювань. Він також може намалювати дерево, яке демонструє кластерні зв'язки, що використані для вирівнювання. У PILEUP використовується спрощений метод прогресивного вирівнювання Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; методу, аналогічному описаному авторами Higgins і Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153. Придатні параметри PILEUP, включають вагу пропуску за замовчуванням 3,00, вагу довжини пропуску за замовчуванням 0,10 і зважені кінці пропусків.

Іншим прикладом корисних алгоритмів є алгоритм BLAST: Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; і Karin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5787. Особливо корисною програмою BLAST є програма WU-BLAST-2, отримана в Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. У WU-BLAST-2 використовується декілька параметрів пошуку, більшості з яких задані значення за замовчуванням. Налаштованим параметрам задані наступні значення: overlap span (проміжок перекривання) =1, overlap fraction (частка перекривання)=0,125, word threshold (поріг слова) (T)=II. Параметри HSP S і HSP S2 являють собою динамічні значення, що задаються самою програмою залежно від складу конкретної послідовності та конкретної бази, за якою проводять пошук послідовності, що представляє інтерес; однак, ці значення можна налаштовувати для підвищення чутливості.

Додатковим корисним алгоритмом є BLAST із пропусками, описаний as reported by Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. В алгоритмі BLAST із пропусками використовується оцінка заміни BLOSUM-62; параметр порога T установлений на 9; парний метод тригерного подовження без пропусків, штрафів за пропуск довжиною k, рівний  $10+k$ ;  $X_u=16$ ,  $X_g=40$  для стадії пошуку в базі даних і = 67 для стадії висновку результатів. Вирівнювання з пропусками запускаються при оцінці, що відповідає приблизно 22 бітам.

Зазвичай амінокислотна гомологія, схожість або ідентичність між окремими варіантами CDR становить щонайменше 80 % щодо наведених тут послідовностей, переважні підвищені значення гомології або ідентичності, що становлять щонайменше 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % і найбільш переважно 100 %. Аналогічним чином "відсоткова (%) ідентичність послідовностей нуклеїнової кислоти" стосовно до послідовності нуклеїнової кислоти ідентифікованих тут сполучених білків визначається як відсоткова частка нуклеотидних залишків у кандидатній послідовності, ідентичних нуклеотидним залишкам у кодуєчій послідовності антигенсполучного білка. Конкретні методи включають модуль BLASTN пакета WU-BLAST-2, з параметрами за замовчуванням, з параметрами проміжку перекривання та частки перекривання встановленими на значення 1 і 0,125, відповідно.

Зазвичай гомологія, подібність або близькість нуклеотидної послідовності між нуклеотидними послідовностями, які кодують окремі варіанти CDR, і наведеними тут нуклеотидними послідовностями становить щонайменше 80 %, і більш типово переважно більш високі значення гомології або ідентичності, що становлять щонайменше 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 і найбільш переважно 100 %.

Відповідно, "варіант CDR" - це CDR, який характеризується зазначеною гомологією, подібністю або ідентичністю з вихідним CDR згідно з даним винаходом, що має ту саму біологічну функцію, включаючи щонайменше 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % специфічності та/або активності вихідного CDR, але не обмежуючись цими значеннями.

Хоча сайти або області введення змін амінокислотної послідовності визначаються заздалегідь, мутація per se не обов'язково визначена заздалегідь. Наприклад, для оптимізації ефективності мутації в даному сайті може бути здійснений випадковий мутагенез цільового кодону або

області, після чого проводять скринінг експресованих варіантів CDR антигенсполучних білків для пошуку оптимальної для бажаної активності комбінації. Методики здійснення замін-мутацій у заданих сайтах ДНК, що мають відому послідовність, відомі, наприклад, мутагенез із використанням праймера M13 і ПЛР-мутагенез. Скринінг мутантів здійснюють з використанням

тестів на активність антигенсполучних білків, наприклад, на сполучення CD27L. Амінокислотні заміни зазвичай відносяться до єдиного залишку; вставки зазвичай зачіпають порядку одного (1) до приблизно двадцяти (20) амінокислотних залишків, хоча також прийнятні значно більш великі вставки. Розмір делеції варіює від приблизно одного (1) до приблизно двадцяти (20) амінокислотних залишків, хоча в деяких випадках розмір делецій може бути значно більше.

Заміни, делеції, вставки або будь-які їхні комбінації можна використовувати для отримання кінцевої похідної або варіанта. Зазвичай ці зміни вводять для невеликого числа амінокислот, щоб мінімізувати зміну молекули, зокрема, імуногенність та специфічність антигенсполучного білка. Однак у деяких обставинах допустимі більш обширні зміни. Консервативні заміни зазвичай здійснюють відповідно до представленої нижче Таблиці 1.

Таблиця 1

Вихідний залишок	Приклади замін
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Істотних змін функції або імунологічної ідентичності досягають, вибираючи заміни, менш консервативні, ніж заміни, показані в Таблиці 1. Наприклад, можуть бути зроблені заміни, які значно більше впливають на: структуру поліпептидного кістяка в зоні зміни, наприклад, структуру альфа-спіралі або бета-шару, заряд або гідрофобність молекули у цільовому сайті або об'єм бічного ланцюга. Замінами, від яких зазвичай очікують найбільш значних змін у властивостях поліпептиду, є такі, при яких (а) гідрофільний залишок, наприклад, серил або треоніл, замінюють на гідрофобний залишок, наприклад, лейцил, ізолейцил, фенілаланін, валіл або аланіл (або гідрофобний залишок замінюють на гідрофільний залишок); (b) цистеїн або пролін замінюють на інший залишок (або інший залишок замінюють на цистеїн або пролін); (c) залишок із електропозитивним бічним ланцюгом, наприклад, лізил, аргініл або гістидил, замінюють на електронегативний залишок, наприклад, глутаміл або аспартил (або електронегативний залишок замінюють на електропозитивний залишок); або (d) залишок із об'ємним бічним ланцюгом, наприклад, фенілаланін, замінюють на залишок без бічного ланцюга, наприклад, гліцин (або залишок без бічного ланцюга замінюють на залишок із об'ємним бічним ланцюгом).

Варіанти зазвичай демонструють якісну таку саму біологічну активність та викликають ту саму імунну відповідь, що і природний аналог, хоча в той самий час варіанти вибирають для зміни характеристик антигенсполучних білків залежно від необхідності. В альтернативному варіанті, може бути сконструйований такий варіант, який призводить до змін біологічної активності антигенсполучного білка. Наприклад, можуть змінюватися або видалятися сайти глікозилювання, описані тут.

Інші похідні антитіл до CD27L в обсязі даного винаходу включають ковалентні або агрегатні кон'югати антитіл CD27L, або їх фрагментів, з іншими білками або поліпептидами, отримані, наприклад, у результаті експресії рекомбінантних гібридних білків, які містять гетерологічні поліпептиди, злиті з N-кінцем або C-кінцем поліпептиду антитіла CD27L. Наприклад, кон'югований поліпептид може являти собою гетерологічний сигнальний (або лідерний) поліпептид, наприклад, лідер дріжджевого альфа-фактора, або пептид, такий як епітопна мітка. Гібридні (злиті) білки, які включають CD27L, можуть містити пептиди, додані для полегшення очищення або ідентифікації антитіла CD27L (наприклад, полігістидинова мітка). Поліпептид антитіла до CD27L може також бути пов'язаний з пептидом FLAG, як описано в Horp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988 і у патенті США № 5011912. Пептид FLAG має високу антигенність та створює епітоп, який зворотно сполучається зі специфічним моноклональним антитілом (mAb), що забезпечує можливість швидкого аналізу та полегшує очищення рекомбінантного білка. Реагенти, придатні для отримання гібридних білків, у яких пептид FLAG гібридизований з даним поліпептидом, доступні для придбання (Sigma, St. Louis, MO, США).

Олігомери, які містять один або більше поліпептидів антитіла до CD27L, можуть використовуватися як антагоністи CD27L. Олігомери можуть бути представлені у формі ковалентно сполучених або нековалентно сполучених димерів, тримерів або олігомерів більш високого порядку. Передбачене застосування олігомерів, які включають один або більше поліпептидів антитіла до CD27L, одним із прикладів є гомодимер. Інші олігомери включають гетеродимери, гомотримери, гетеротримери, гомотетрамери, гетеротетрамери тощо.

Один варіант реалізації відноситься до олігомерів, які містять декілька поліпептидів антитіла до CD27L, сполучених ковалентними або нековалентними взаємодіями між пептидними фрагментами, пов'язаними з поліпептидами антитіла до CD27L. Такі пептиди можуть являти собою пептидні лінкери (спейсери) або пептиди, що мають здатність стимулювати олігомеризацію. Лейцинові блискавки і деякі поліпептиди - похідні антитіл, входять до числа пептидів, які здатні стимулювати олігомеризацію поліпептидів антитіла до CD27L, приєднаних до них, як більш докладно описано нижче.

У конкретних варіантах реалізації олігомери містять від двох до чотирьох поліпептидів антитіла до CD27L. Фрагменти антитіла CD27L у складі олігомерів можуть бути у будь-якій з описаних вище форм, наприклад, можуть являти собою варіанти або фрагменти. У переважному варіанті олігомери включають поліпептиди антитіла CD27L, які мають сполучну активність у відношенні до CD27L.

В одному варіанті реалізації олігомер отримують з використанням поліпептидів, отриманих із імуноглобулінів. Отримання гібридних пептидів, які включають певні гетерологічні пептиди, пов'язані з різними частинами поліпептидів-похідних антитіл (включаючи Fc-домен) описане, наприклад, в Ashkenazi et al., 1991, PNAS USA 88:10535; Byrn et al., 1990, Nature 344:677; і Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", у Поточних Протоколах в Імунології, Suppl. 4, стр. 10,19,1-10,19,11.

Один із варіантів реалізації даного винаходу відноситься до димеру, який містить два гібридних білки, отриманих шляхом гібридизації CD27L-сполучного фрагмента антитіла до CD27L з Fc-областю антитіла. Димер може бути утворений, наприклад, шляхом вбудовування гібридного гена, що кодує гібридний білок, у придатний експресійний вектор, експресії цього гена в клітині-хазяїні, трансформованої рекомбінантним експресійним вектором, і забезпечення можливості для складання експресованого гібридного білка подібно молекулам антитіла, після чого утворюються міжланцюгові дисульфідні зв'язки між Fc-фрагментами, за рахунок чого утворюється димер.

Термін "Fc-поліпептид" у даному описі включає нативні та мутантні форми поліпептидів, отриманих із Fc-області антитіла. Також включені вкорочені форми таких поліпептидів, що містять шарнірну ділянку, яка стимулює димеризацію. Гібридні білки, що включають Fc-фрагменти (та утворені з них олігомери) забезпечують перевагу більш легкого очищення методом афінної хроматографії на колонках із Білком А або Білком G.

Один придатний поліпептид Fc, описаний у заявці PCT WO 93/10151 (включеної в даний опис шляхом посилання), являє собою одноланцюговий поліпептид, розташований на ділянці від N-кінцевої шарнірної ділянки до нативного C-кінця Fc-області людського антитіла IgG. Інший придатний Fc-поліпептид являє собою мутантний Fc, описаний у патенті США № 5457035 і у Baum et al., 1994, EMBO J. 13:3992-4001. Амінокислотна послідовність цього мутеїну ідентична нативній послідовності Fc, описаній у WO 93/10151, за тим виключенням, що амінокислота 19 змінена з Leu на Ala, амінокислота 20 змінена з Leu на Glu, й амінокислота 22 змінена з Gly на Ala. Даний мутеїн проявляє знижену афінність відносно рецепторів Fc.

В інших варіантах реалізації варіабельною частиною важкого та/або легкого ланцюгів антитіла CD27L може бути замінена варіабельна частина легкого та/або важкого ланцюга деякого антитіла.

В альтернативному варіанті олігомер являє собою гібридний білок, який включає декілька поліпептидів антитіла до CD27L, з пептидними лінкерами (спейсерними пептидами) або без них. До придатних пептидних лінкерів відносяться лінкери, описані у Патентах США №№ 4751180 і 4935233.

Інший спосіб отримання олігомерних похідних антитіла до CD27L включає використання лейцинової блискавки. Домени типу лейцинової блискавки являють собою пептиди, які стимулюють олігомеризацію білків, у яких вони розташовані. Лейцинові блискавки були вперше виявлені в декількох ДНК-сполучних білках (Landschulz et al., 1988, Science 240:1759), а потім були виявлені в різних інших білках. До відомих лейцинових блискавок належать природні пептиди та їхні похідні, які димеризуються або тримеризуються. Приклади доменів лейцинових блискавок, придатних для отримання розчинних олігомерних білків, описані в заявці PCT WO 94/10308, і лейцинова блискавка з білка D сурфактанта легенів (SPD) описана в Horpe et al., 1994, FEBS Letters 344:191. Зазначені джерела включені в даний опис шляхом посилання. Застосування модифікованої лейцинової блискавки, яка забезпечує стабільну тримеризацію гетерологічного білка, гібридизованого з нею, описане у Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. В одному підході рекомбінантні гібридні білки, які включають фрагмент або похідну антитіла до CD27L, гібридизоване з пептидом лейцинової блискавки, експресують у придатній клітині-хазяїні, та розчинні олігомерні фрагменти або похідні антитіла до CD27L, що утворюються, виділяють з супернатанта культури.

Ковалентні модифікації антигенсполучних білків включені в обсяг даного винаходу та зазвичай, але не завжди виконуються після трансляції. Наприклад, декілька типів ковалентних модифікацій антигенсполучного білка вводять у молекулу шляхом здійснення залишків амінокислот антигенсполучного білка з органічними дериватизуючими агентами, які здатні реагувати з вибраними бічними ланцюгами або залишками на N- або C-кінці.

Залишки цистеїніли найбільш часто використовують у реакції з  $\alpha$ -галоацетатами (і відповідними амінами), такими як хлороцтова кислота або хлорацетамід, для отримання карбоксиметильних або карбоксіамідометильних похідних. Цистеїнілові залишки також дериватизують шляхом здійснення реакції з бромтрифторацетоном,  $\alpha$ -бром- $\beta$ -(5-імідозол) пропіоновою кислотою, хлорацетилфосфатом, N-алкілмалеїмідами, 3-нітро-2-піридилдисульфідом, метил 2-піридилдисульфідом, p-хлор-ртуть-бензоат, 2-хлор-ртуть-4-нітрофенол або хлор-7-нітробензо-2-окса-1,3-діазол.

Залишки гістидилу дериватизують шляхом здійснення реакції з діетилкарбонатом при pH 5,5-7,0, оскільки цей агент має відносну специфічність відносно бічного ланцюга гістидилу. Також можна застосовувати пара-бромфенацил; у переважному випадку реакцію проводять в 0,1 M какодилаті натрію при pH 6,0.

Лізинілі й аміно-кінцеві залишки використовують у реакції з ангідратами бурштинової або карбонової кислот. Дериватизація цими агентами міняє знак заряду залишків лізинілів. Інші придатні реагенти для дериватизації залишків, що містять альфа-аміни, включають імідоефіри, такі як метилпіколінімідат, піридоксал фосфат, хлорборогідрид, тринітробензолсульфонова кислота, O-метилізосечовина, 2,4-пентандіон, та каталізовані трасаміназою реакції з гліоксилатом.

Залишки аргінілу модифікують шляхом здійснення реакції з одним або декількома звичайними реагентами, включаючи фенілглюксаль, 2,3-бутандіон, 1,2-циклоександіон і нінгідрин. Дериватизація залишків аргініну вимагає здійснення реакції в лужному середовищі через високу  $pK_a$  гуанідинової функціональної групи. Крім того, ці реагенти можуть реагувати з групами лізину, а також з епсилон-аміногрупами аргініну.

Можуть бути здійснені визначені модифікації залишків тирозилів, при цьому особливий інтерес представляє введення спектральних міток у залишки тирозилу за рахунок реакції з ароматичними сполуками діазонію або тетранітрометаном. Найчастіше використовують N-ацетилімідизол і тринітрометан для утворення O-аїетилтирозилів і 3-нітро-похідних, відповідно. Залишки тирозилу йодинують з використанням  $^{125}I$  або  $^{131}I$  для отримання мічених білків для застосування в радіоімунаналізі, для чого підходить метод із використанням хлораміну T, описаний вище.

Карбоксильні бічні групи (аспартилу або глютамілу) селективно модифікують за рахунок реакції з карбодіімідами ( $R'-N=C=N-R'$ ), де R і R' – можливо різні алкільні групи, такі як 1-циклогексил-3-(2-морфолініл-4-етил) карбодіімід або 1-етил-3-(4-азоній-4,4-диметилфеніл) карбодіімід. Крім



того, залишки аспартил або глютаміл перетворюють у залишки аспарагініл і глютамініл шляхом здійснення реакції з іонами амонію.

Дериватизацію біфункціональними агентами можна застосовувати для поперечного сполучення антигенсполучних білків із нерозчинною у воді підкладкою: матрицею або поверхнею, для різноманітних застосувань. Широко застосовувані агенти для поперечного зшивання включають, наприклад, 1,1-біс(діазаацетил)-2-фенілетан глютаральдегід, N-гідроксисукцинімідні ефіри, наприклад, ефіри з 4-азидосаліциловою кислотою, гомофункціональними імідоефірами, включаючи дисукцинімідові ефіри, такі як 3,3'-дитіобіс(сукцинімідилпропіонат) і біфункціональні малеїміди, такі як біс-N-малеїмідо-1,8-октан. Дериватизуючі агенти, такі як метил -3-[(p-азидофеніл)дитіо]пропіомідат, дають фотоактивовані проміжні сполуки, які здатні до утворення поперечних зшивок у присутності світла. В альтернативному варіанті реактивні нерозчинні у воді матриці, такі як активовані ціаноген бромідам вуглеводні та реактивні субстрати, описані у патентах США №№ 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 і 4330440, застосовують для іммобілізації білків.

Залишки глютамініл і аспарагініл часто деамідують до відповідних залишків глютамілу та аспартилу, відповідно. В альтернативному варіанті ці залишки дезамідують у слабокислому середовищі. Будь-яка форма цих залишків входить в обсяг даного винаходу.

Інші модифікації включають гідроксилування проліну та лізину, фосфорилювання гідроксильних груп залишків серилу та треонілу, метилування  $\alpha$ -аміногруп бічних ланцюгів лізину, аргініну та гістидину (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилювання N-кінцевого аміну та амідкування будь-якою C-кінцевою карбоксильною групою.

Інший тип ковалентної модифікації антигенсполучного білка, включений в обсяг даного винаходу, включає зміну паттерну глікозилювання білка. Як відомо в даній області, паттерни глікозилювання можуть залежати як від послідовності білка (наприклад, присутності або відсутності конкретних глікозилованих амінокислотних залишків, обговорюваних нижче), так і від клітини-хазяїна організму в якому білок продукується. Конкретні системи експресії обговорюються нижче.

Глікозилювання поліпептидів зазвичай буває або N-сполученим, або O-сполученим. N-сполучене означає приєднання вуглеводного фрагмента до бічного ланцюга залишку аспарагіну. Трипептидні послідовності аспарагін-X-серин і аспарагін-X-треонін, де X означає будь-яку амінокислоту крім проліну, є розпізнаваними послідовностями для ферментативного приєднання вуглеводного фрагмента до бічного ланцюга аспарагіну. Відповідно, присутність будь-якої з цих трипептидних послідовностей у поліпептиді створює потенційний сайт глікозилювання. O-сполучене глікозилювання відноситься до приєднання одного з цукрів: N-ацетилгалактозаміну, галактози або ксилози, до гідроксіамінокислоти, найчастіше до серину або треоніну, хоча також можуть бути задіяні 5-гідроксипролін або 5-гідроксилізін.

Додавання сайтів глікозилювання в антигенсполучний білок зручно здійснювати шляхом змін амінокислотою послідовності таким чином, щоб вона містила одну або більше з описаних вище трипептидних послідовностей (для сайтів N-сполученого глікозилювання). Зміни також можуть бути здійснені шляхом приєднання одного або більше залишків треоніну або серину або введення із заміною у вихідну послідовність (для сайтів O-сполученого глікозилювання). Для полегшення процесу амінокислотну послідовність антигенсполучного білка переважно змінюють шляхом введення змін на рівні ДНК, зокрема, шляхом здійснення мутацій ДНК, що кодує цільовий поліпептид, у результаті яких утворюються кодони, трансльовані в бажані амінокислоти.

Іншим засобом підвищення числа вуглеводних фрагментів на антигенсполучний білок є підвищення шляхом хімічного або ферментативного приєднання глікозидів до білка. Ці процедури мають ту перевагу, що вони не потребують продукування білка в клітині-хазяїні, яка має здатність до глікозилювання за механізмом N- і O-сполученого глікозилювання. Залежно від використовуваного шляху приєднання цукор (цукри) можуть бути приєднані до (a) аргініну та гістидину, (b) вільних карбоксильних груп, (c) вільних сульфгідрильних груп, таких як групи цистеїну, (d) вільних гідроксильних груп, таких як групи серину, треоніну або гідроксипроліну, (e) ароматичних залишків, таких як залишки фенілаланіну, тирозину та триптофану, або (f) до амідної групи глютаміну. Ці способи описані в документі WO 87/05330, опублікованому 11 вересня 1987 р, і в *Aplin i Wriston*, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306.

Видалення вуглеводних фрагментів, які присутні у вихідному антигенсполучному білці, може бути виконане хімічним або ферментативним шляхом. Хімічне деглікозилювання потребує обробки білка сполукою трифтороцтовою кислотою або еквівалентною сполукою. Ця обробка призводить до відщеплення більшості цукрів за винятком сполученого цукру (N-

ацетилглюкозамін або N-ацетилгалактозамін), а пептид, що залишається, при тому не ушкоджується. Хімічне деглікозилювання описане у Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 та Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Ферментативне відщеплення вуглеводних фрагментів на поліпептидах може бути здійснене з використанням різних ендо- та екзо-глікозидаз, описаних у Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Запобігання глікозилювання у потенційних сайтах глікозилювання може бути досягнуте шляхом застосування тунікаміцину, як описано у Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Тунікаміцин блокує утворення зв'язків білок-N-глікозид.

Інший тип ковалентної модифікації антигенсполучного білка включає сполучення антигенсполучного білка з різними небілковими полімерами, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: різні поліспирти, такі як поліетиленгліколь, пропіленгліколь або поліоксіалкілени, шляхом, описаним у патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 або 4,179,337. Додатково, відомо, можуть бути виконані амінокислотні заміни у різних положеннях білка, які полегшують приєднання полімерів, таких як ПЕГ.

У деяких варіантах реалізації ковалентні модифікації антигенсполучних білків згідно з даним винаходом включають приєднання однієї або більше міток.

Термін "група-мітка" означає будь-яку детектовану мітку. Приклади придатних груп-міток включають, але не обмежуються перерахованими: радіоізотопи або радіонукліди (наприклад,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), флюоресцентні групи (наприклад, FITC, родамін, лантанітні люміноформи), ферментативні групи (наприклад, пероксидаза хрому,  $\beta$ -галактозидаза, люцифераза, лужна фосфатаза), хемілюмінесцентні групи, біотинільні групи або визначені поліпептидні епітопи, які розпізнаються вторинним репортером (наприклад, парні послідовності лейцинових блискавок, сайти сполучення вторинних антитіл, домени сполучення металів, епітопні мітки). У деяких варіантах реалізації групи-мітки приєднані до антигенсполучного білка через спейсерні фрагменти різної довжини, що дозволяє зменшити можливі стеричні перешкоди. У даній області відомі різні способи мічення білків, які можуть бути використані для реалізації даного винаходу.

У цілому мітки діляться на різні класи, залежно від аналізу, в якому здійснюється і детектування: а) ізотопні мітки, які можуть бути радіоактивними або важкими ізотопами; б) магнітні мітки (наприклад, магнітні частинки); в) редокс-активні групи; г) оптичні барвники; ферментативні групи (наприклад, пероксидаза хрому,  $\beta$ -галактозидаза, люцифераза, лужна фосфатаза); д) біотинільовані групи; е) ф) заздалегідь визначені поліпептидні епітопи, які розпізнаються вторинним репортером (наприклад, парні послідовності лейцинових блискавок, сайти сполучення вторинних антитіл, домени сполучення металів, епітопні мітки тощо). У деяких варіантах реалізації групи-мітки приєднані до антигенсполучного білка через спейсерні фрагменти різної довжини, що дозволяє зменшити можливі стеричні перешкоди. У даній області відомі різні способи мічення білків, які можуть бути використані для реалізації даного винаходу. Конкретні мітки включають оптичні барвники, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: хромофори, люмінофори або флюорофори, причому останні специфічні для багатьох випадків. Флюорофори можуть бути або "низькомолекулярними" флюоресцуючими агентами, або білковими флюоресцуючими агентами.

Під "флюоресцентною міткою" розуміють будь-яку молекулу, яку можна виявляти за рахунок властивих їй флюоресцентних властивостей. Придатні флюоресцентні мітки включають, але не обмежені перерахованими: флуоресцеїн, родамін, тетраметилродамін, еозин, еритрозин, кумарин, метил-кумарини, піпен, Malacite green (зелений), стильбен, Lucifer Yellow (жовтий), Cascade BlueJ (синій), Texas Red (червоний), IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon green (зелений), барвники Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow і R-фікожритрин (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR, США), FITC, родамін і Texas Red (Техаський червоний Pierce, Rockford, IL, США), Cy 5, Cy 5.5, Cy 7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA, США). Придатні оптичні барвники, включаючи флюороформи, описані у довіднику "Molecular Probes Handbook", Richard P. Haugland, який прямо включений у даний текст шляхом посилання.

Придатні білкові флюоресцентні мітки також включають, але не обмежені перерахованими: зелений флюоресцентний білок (GFP), включаючи види Renilla, Ptilosarcus або Aequorea білка GFP (Chalfie et al., 1994, Science 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., номер доступу в Genbank U55762), синій флюоресцентний білок (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), поліпшений жовтий флюоресцентний білок (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), люциферазу (Ichiki et al., 1993, J.

Immunol. 150:5408-5417),  $\beta$ -галактозидазу (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607) і Renilla (WO 92/15673, WO 95/07463, WO 98/14605, WO 98/26277, WO 99/49019, Патенти США №№ 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558). Усі цитовані вище джерела прямо включені в даний текст шляхом посилання.

5 Полінуклеотиди, які кодують сполучні антиген CD27L білки

У даний винахід включені нуклеїнові кислоти, які кодують сполучні антиген CD27L білки, включаючи антитіла, визначені в даному тексті. Переважні нуклеїнові кислоти включають нуклеїнові кислоти, які кодують приклади легкого ланцюга та важкого ланцюга, описані тут.

10 Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує легкий ланцюг Ab1 є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:49.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує легкий ланцюг Ab2 є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:50.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує легкий ланцюг Ab4 є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:51.

15 Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує легкий ланцюг Ab5 є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:52.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує легкий ланцюг Ab6 є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:53.

20 Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує легкий ланцюг Ab7 є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:54.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує легкий ланцюг Ab8 є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:55.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує важкий ланцюг Ab1 є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:3.

25 Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує важкий ланцюг Ab2 є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:4.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує важкий ланцюг Ab4 є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:5.

30 Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує важкий ланцюг Ab5 є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:6.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує важкий ланцюг Ab6 є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:7.

Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує важкий ланцюг Ab7 є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:8.

35 Прикладом нуклеїнової кислоти, яка кодує важкий ланцюг Ab8 є нуклеїнова кислота, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:9.

Аспекти даного винаходу включають варіанти полінуклеотиду (наприклад, пов'язані з виродженністю), які кодують амінокислотні послідовності, описані в даній заявці.

40 Аспекти даного винаходу включають різні варіанти, включаючи, наведені нижче приклади, але не обмежуючись ними.

Виділений полінуклеотид, де зазначений полінуклеотид кодує один або більше поліпептидів, що містять амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з:

А. 1. послідовності варіабельної області легкого ланцюга, яка на щонайменше 90 % ідентична послідовності варіабельної області легкого ланцюга, представленої в SEQ ID NO:63-70;

45 2. послідовності варіабельної області важкого ланцюга, яка на щонайменше 90 % ідентична послідовності варіабельної області важкого ланцюга, представленої в SEQ ID NO:17-24;

3. варіабельної області легкого ланцюга (1) та варіабельної області важкого ланцюга (2); та

В. варіабельної області легкого ланцюга, що містить CDR1, CDR2, CDR3, і/або варіабельної області важкого ланцюга, що містить CDR1, CDR2, CDR3, які відрізняються в цілому не більше

50 ніж трьома приєднаннями, замінами та/або делеціями у кожній CDR від наступних послідовностей:

1. CDR1 (SEQ ID NO:71), CDR2 (SEQ ID NO:79), CDR3 (SEQ ID NO:87) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:25), CDR2 (SEQ ID NO:33), CDR3 (SEQ ID NO:41) важкого ланцюга антитіла Ab1;

55 2. CDR1 (SEQ ID NO:72), CDR2 (SEQ ID NO:80), CDR3 (SEQ ID NO:88) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:26), CDR2 (SEQ ID NO:34), CDR3 (SEQ ID NO:42) антитіла Ab2;

3. CDR1 (SEQ ID NO:73), CDR2 (SEQ ID NO:81), CDR3 (SEQ ID NO:89) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:27), CDR2 (SEQ ID NO:35), CDR3 (SEQ ID NO:43) важкого ланцюга антитіла Ab3;

4. CDR1 (SEQ ID NO:74), CDR2 (SEQ ID NO:82), CDR3 (SEQ ID NO:90) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:28), CDR2 (SEQ ID NO:36), CDR3 (SEQ ID NO:44) важкого ланцюга антитіла Ab4;

5. CDR1 (SEQ ID NO:75), CDR2 (SEQ ID NO:83), CDR3 (SEQ ID NO:91) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:29), CDR2 (SEQ ID NO:37), CDR3 (SEQ ID NO:45) важкого ланцюга антитіла Ab5;

6. CDR1 (SEQ ID NO:76), CDR2 (SEQ ID NO:84), CDR3 (SEQ ID NO:92) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:30), CDR2 (SEQ ID NO:38), CDR3 (SEQ ID NO:46) важкого ланцюга антитіла Ab6;

10 7. CDR1 (SEQ ID NO:77), CDR2 (SEQ ID NO:85), CDR3 (SEQ ID NO:93) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:31), CDR2 (SEQ ID NO:39), CDR3 (SEQ ID NO:47) важкого ланцюга антитіла Ab7; і

8. CDR1 (SEQ ID NO:78), CDR2 (SEQ ID NO:86), CDR3 (SEQ ID NO:94) легкого ланцюга або CDR1 (SEQ ID NO:32), CDR2 (SEQ ID NO:40), CDR3 (SEQ ID NO:48) важкого ланцюга антитіла Ab8.

У переважних варіантах реалізації поліпептид, який кодований виділеною нуклеїновою кислотою, є компонентом антигенсполучного білка, який сполучає CD27L.

Нуклеотидні послідовності, які відповідають описаним тут амінокислотним послідовностям, для застосування як зонди або праймери для виділення нуклеїнових кислот або шуканих послідовностей для пошуку в базах даних можуть бути отримані шляхом "зворотної трансляції" з амінокислотних послідовностей або шляхом ідентифікації областей ідентичності амінокислот поліпептидам, для яких установлені кодуєчі послідовності ДНК. Добре відому процедуру полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) можна застосовувати для виділення та ампліфікації послідовності ДНК, яка кодує сполучні антиген CD27L білки або бажані комбінації поліпептидних фрагментів сполучного антиген CD27L білка. Олігонуклеотиди, які визначають бажані кінці комбінацій фрагментів ДНК, використовують як 5'- і 3' праймери. Олігонуклеотиди можуть додатково містити сайти розпізнавання для рестрикційних ендонуклеаз, що полегшує вбудовування ампліфікованої комбінації фрагментів ДНК в експресійний вектор. Методи ПЛР описані в Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; і *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Молекули нуклеїнових кислот згідно з даним винаходом включають ДНК та РНК, як в одностанцюговій, так і у двостанцюговій формі, а також відповідні комплементарні послідовності. ДНК включає, наприклад, кДНК, геномну ДНК, хімічно синтезовану ДНК, ДНК, ампліфіковану шляхом ПЛР, та їх комбінації. Молекули нуклеїнових кислот згідно з даним винаходом включають повнорозмірні гени або молекули кДНК, а також їхні фрагменти. Нуклеїнові кислоти згідно з даним винаходом у переважному варіанті отримані з організму людини, але даний винахід включає також нуклеїнові кислоти, отримані з видів, відмінних від людини.

"Виділена (ізольована) нуклеїнова кислота" являє собою нуклеїнову кислоту, відділену від сусідніх генетичних послідовностей, які присутні у геномі організму, з якого виділена зазначена нуклеїнова кислота, у випадку якщо нуклеїнова кислота виділена з природного джерела. У випадку ферментативного синтезу нуклеїнових кислот із матриці або хімічного синтезу, наприклад, для продуктів ПЛР, молекул кДНК або олігонуклеотидів, наприклад, нуклеїнові кислоти, отримані в результаті такого процесу вважаються виділеними нуклеїновими кислотами. Виділені нуклеїнові кислоти - це молекули нуклеїнової кислоти у формі окремого фрагмента або у вигляді компоненти більш великої нуклеотидної конструкції. В одному переважному варіанті реалізації нуклеїнові кислоти по суті не містять домішок ендогенного матеріалу. У переважному варіанті молекула нуклеїнової кислоти отримана з ДНК або РНК, щонайменше один раз виділеної у по суті чистій формі та у кількості або концентрації, що допускають ідентифікацію, здійснення маніпуляцій та виділення складових нуклеотидних послідовностей стандартними біохімічними методами (такими як описані в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). У переважному варіанті такі послідовності представлені та/або сконструйовані у формі відкритої рамки зчитування, що містить внутрішні нетрансльовані послідовності, або інтрони, які зазвичай присутні в генах еукаріот. Послідовності нетрансльованої ДНК можуть розташовуватися в напрямку 5'- або 3'- від відкритої рамки зчитування, якщо це не перешкоджає проведенню маніпуляцій або експресії кодуєчої області.

Даний винахід також включає нуклеїнові кислоти, які гібридизуються в умовах помірної жорсткості, а більш переважно в умовах високої жорсткості, з нуклеїновими кислотами, які кодуєть сполучні антиген CD27L білки, описані в даному тексті. Основні параметри, які

впливають на вибір умов гібридизації, та посібник зі створення відповідних умов можна знайти у Sambrook, Fritsch, і Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., глави 9 і 11; і *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., розділи 2,10 і 6,3-6,4), а також можуть бути легко визначені середнім фахівцем на основі, наприклад, довжини і/або складу основи ДНК.

Один із способів забезпечення умов помірної жорсткості включає використання розчину для попереднього промивання, що містить 5 x SSC, 0,5 % SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0), гібридизаційного буфера, що містить приблизно 50 % формаміду, 6 x SSC, і температури гібридизації приблизно 55 градусів С (або аналогічних гібридизаційних розчинів, наприклад, що містять приблизно 50 % формаміду, при температурі гібридизації приблизно 42 градуса С), та умов промивання, що включають температуру приблизно 60 градусів С, в 0,5 x SSC, 0,1 % SDS. Зазвичай умови високої жорсткості визначаються як описані вище умови, але з промиванням при температурі приблизно 68 градусів С, 0,2 x SSC, 0,1 % SDS. SSPE (1xSSPE являє собою 0,15M NaCl, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  і 1,25 mM EDTA, pH 7,4) можна використовувати замість SSC (1xSSC: 0,15M NaCl і 15 mM цитрату натрію) у гібридизаційному та промивному буферах; промивання здійснюють протягом 15 хвилин після завершення гібридизації. Передбачається, що температуру промивання та концентрацію солі при промиванні можна регулювати за необхідністю для досягнення бажаного ступеня жорсткості на основі основних принципів реакції гібридизації та стабільності дуплексів, які відомі фахівцю та описані нижче в даному тексті (див., наприклад, Sambrook et al., 1989). При гібридизації нуклеїнової кислоти з цільовою нуклеїновою кислотою невідомої послідовності, довжину гібриду визначають за гібридизуючою нуклеїновою кислотою. При гібридизації нуклеїнових кислот із відомими послідовностями довжина гібриду може бути визначена шляхом зіставлення (вирівнювання) послідовностей нуклеїнових кислот й ідентифікації області або областей оптимальної комплементарності послідовностей.

Температура гібридизації для гібридів із очікуваною довжиною менше 50 пар основ повинна бути на 5 - 10 градусів С нижче температури плавлення ( $T_m$ ) гібриду, де  $T_m$  визначається за наступними формулами. Для гібридів довжиною менше 18 пар основ,  $T_m$  (у градусах С) =  $2(\# \text{основ A+T}) + 4(\# \text{основ G+C})$ . Для гібридів довжиною більше 18 пар основ,  $T_m$  (у градусах С) =  $81,5 + 16,6(\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41(\% \text{ G+C}) - (600/N)$ , де N - це число основ у гібриді, а  $[\text{Na}^+]$  - це концентрація іонів натрію в гібридизаційному буфері ( $[\text{Na}^+]$  для 1xSSC=0,165M). У переважному випадку кожна така гібридизуюча має довжину, рівну щонайменше 15 нуклеотидів (або більш переважно щонайменше 18 нуклеотидів, або щонайменше 20 нуклеотидів, або щонайменше 25 нуклеотидів, або щонайменше 30 нуклеотидів, або щонайменше 40 нуклеотидів, або найбільш переважно щонайменше 50 нуклеотидів) або щонайменше 25 % (більш переважно щонайменше 50 %, або щонайменше 60 %, або щонайменше 70 %, і найбільш переважно щонайменше 80 %) довжини нуклеїнової кислоти згідно з даним винаходом, з якою вона гібридизується, та характеризується щонайменше 60 % ідентичністю послідовності (більш переважно щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 81 %, щонайменше 82 %, щонайменше 83 %, щонайменше 84 %, щонайменше 85 %, щонайменше 86 %, щонайменше 87 %, щонайменше 88 %, щонайменше 89 %, щонайменше 90 %, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 %, і найбільш переважно щонайменше 99,5 %) з нуклеїновою кислотою згідно з даним винаходом, з якою вона гібридизується, де ідентичність послідовності визначається шляхом порівняння гібридизуючих нуклеїнових кислот при вирівнюванні з максимізацією перекривання й ідентичності та мінімізацією пропусків у послідовності, як докладно описано вище.

Варіанти згідно з даним винаходом зазвичай отримують шляхом сайт-специфічного мутагенезу нуклеотидів у ДНК, що кодує антигенсполучний білок, з використанням касетного мутагенезу або ПЛР-мутагенезу або інших відомих у техніці методик для отримання ДНК, що кодує варіант, з наступною експресією цієї рекомбінантної ДНК у культурі клітин, як описано в даному тексті. Однак, фрагменти антигенсполучного білка, які містять варіанти ділянок CDR, що містять до приблизно 100-150 залишків, можуть бути отримані шляхом синтезу *in vitro* з використанням стандартних методик. Варіанти зазвичай демонструють якісно таку саму біологічну активність, що і природний аналог, наприклад, сполучення CD27L, хоча в той самий час можуть бути вибрані варіанти, які мають змінені характеристики, як більш повно описано нижче.

Фахівцю зрозуміло, що внаслідок виродженості генетичного коду може бути отримана вкрай велика кількість нуклеїнових кислот, кожна з яких кодує ділянки CDR (а також важкі або легкі ланцюги або інші компоненти антигенсполучного білка) згідно з даним винаходом. Відповідно, після ідентифікації конкретної амінокислотної послідовності, фахівець зможе отримати будь-яке

число різних нуклеїнових кислот просто шляхом модифікації послідовності одного або більше кодонів, так, що при цьому амінокислотна послідовність кодованого білка не зміниться.

Даний винахід також забезпечує експресійні системи та конструкції у формі плазмід, експресійні вектори, транскрипційні або експресійні касети, які включають щонайменше один полінуклеотид із описаних вище. Крім того, даний винахід забезпечує клітину-хазяїна, що містить таку експресійну систему або конструкцію.

Зазвичай експресійні вектори, які застосовуються в будь-якій клітині-хазяїні, містять послідовності для підтримання плазміди і для клонування й експресії екзогенних нуклеотидних послідовностей. Такі послідовності, які називають спільно "фланкуючими послідовностями" у деяких варіантах реалізації зазвичай включають одну або більше з наступних нуклеотидних послідовностей: промотор, одну або більше енансерних послідовностей, ориджин реплікації, послідовність термінації транскрипції, повну інтронну послідовність, що включає донорний і акцепторний сайт сплайсингу, послідовність, що кодує лідерну послідовність для секреції поліпептиду, сайт сполучення рибосоми, послідовність поліаденілювання, полілінкерна ділянка для вбудовування нуклеїнової кислоти, що кодує експресований поліпептид, і елемент селективного маркера. Кожна з цих послідовностей обговорюється нижче.

Вектор необов'язково може містити послідовність, що кодує "тег" (мітку), тобто олігонуклеотидну молекулу, розташовану на 5'- або 3'-кінці послідовності, що кодує сполучний антиген CD27L білок; олігонуклеотидна послідовність кодує полігистидин (наприклад, гексаHis) або інший "тег", такий як FLAG, HA (гемаглютинин вірусу грипу), або тус, до якого існують комерційно доступні антитіла. Цей тег зазвичай приєднується до поліпептиду після експресії поліпептиду та може служити засобом для афінного очищення або детектування сполучного антиген CD27L білка з клітини-хазяїна. Афінне очищення може здійснюватися наприклад, шляхом колоночної хроматографії з використанням антитіл до тегу як афінна матриця. Пізніше тег може бути відділений від очищеного сполучного антиген CD27L білка різними засобами, такими як деякі розщеплюючі пептидази.

Фланкуючі послідовності можуть бути гомологічними (тобто, з того самого виду та/або штаму, що і клітина-хазяїн), гетерологічними (тобто, з виду, відмінного від виду або штаму клітини-хазяїна), гібридними (тобто, являти собою комбінацію фланкуючих послідовностей або більше ніж одного джерела), синтетичними або нативними. Відповідно, джерелом фланкуючих послідовностей може бути прокаріотичний або еукаріотичний організм, будь-який безхребетний або хребетний організм, або будь-яка рослина, за умови, що фланкуючі послідовності функціональні в органелах клітини-хазяїна або можуть бути активовані в ній.

Фланкуючі послідовності, які можна застосовувати у векторах згідно з даним винаходом можуть бути отримані будь-яким із відомих у техніці способів. Зазвичай фланкуючі послідовності, які можна застосовувати у даному винаході, спочатку ідентифікують шляхом картування та/або розщеплення рестрикційною ендонуклеазою, після чого вони можуть бути виділені з відповідного тканинного джерела з використанням придатних рестрикційних ендонуклеаз. У деяких випадках може бути відома повна нуклеотидна послідовність фланкуючої послідовності. У цьому випадку фланкуюча послідовність може бути синтезована способами, описаними тут для синтезу та клонування нуклеїнових кислот.

Якщо відома вся або тільки частина фланкуючої послідовності, вона може бути отримана з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та/або шляхом скринінгу геномної бібліотеки з використанням відповідного зонда, такого як фрагмент олігонуклеотиду та/або фланкуючої послідовності з того самого або іншого виду. Якщо фланкуюча послідовність невідома, фрагмент ДНК, що містить фланкуючу послідовність, може бути виділений з більшого шматка ДНК, який може містити, наприклад, кодуєчу послідовність або навіть інший ген або гени. Виділення може бути виконане шляхом розщеплення рестрикційною ендонуклеазою з отриманням відповідного фрагмента ДНК з наступним виділенням шляхом очищення на агарозному гелі, методом колоночної хроматографії Qiagen® (Chatsworth, CA) або іншим відомим фахівцю способом. Середній фахівець зможе легко вибрати ферменти для цієї мети.

Ориджин реплікації зазвичай є частиною комерційних прокаріотичних експресійних векторів, ориджин допомагає ампліфікації вектора в клітині-хазяїні. Якщо вибраний вектор не містить сайту ориджина реплікації, його можна синтезувати хімічним шляхом на основі відомої послідовності та лігувати у вектор. Наприклад, ориджин реплікації з плазміди pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA, США) підходить для більшості грамнегативних бактерій, а різні вірусні ориджини (наприклад, SV40, полііоми, аденовірусу, вірусу везикулярного стоматиту (VSV) або папіломавірусу, такого як ВПЛ (HPV) або БПВ (BPV)) можна застосовувати для клонування векторів у клітини ссавців. У цілому, компонент ориджина реплікації не є необхідним

для експресійних векторів ссавців (наприклад, ориджин SV40 часто використовується тільки оскільки він містить ранній промотор вірусу).

Послідовність термінатора транскрипції зазвичай розташована у напрямку 3' щодо кодуєчої ділянки поліпептиду та служить для термінації транскрипції. Зазвичай послідовність термінації транскрипції у прокаріотичних клітинах являє собою G-C-багатий фрагмент і наступну за ним полі-Т послідовність. Хоча цю послідовність можна легко клонувати з бібліотеки або навіть отримати як частину вектора, її також легко можна синтезувати з використанням описаних тут способів синтезу нуклеїнових кислот.

Ген селективного маркера кодує білок, необхідний для виживання та росту клітин-хазяїнів, які вирощуються у селективному культуральному середовищі. Звичайні гени селективних маркерів кодують білки, які (а) повідомляють прокаріотичним клітинам-хазяїнам стійкість до антибіотиків й інших токсинів, наприклад, ампіциліну, тетрацикліну або канаміцину; (b) заповнюють ауксотрофні дефіцити клітини; або (c) забезпечують важливу живильну сполуку, яку неможливо отримати з комплексного середовища або середовища певного складу. Прикладами селективних маркерів є ген стійкості до канаміцину, ген стійкості до ампіциліну та ген стійкості до тетрацикліну. Ген стійкості до неоміцину має ту перевагу, що його можна також використовувати для селекції й у прокаріотичних, і в еукаріотичних клітинах-хазяїнах.

Інші селективні гени можна використовувати для ампліфікації експресованого гена. Ампліфікація - це процес, у якому гени, необхідні для продукції білка, критично важливого для росту або виживання клітин, відтворюються в хромосомах послідовних поколінь рекомбінантних клітин. Приклади придатних селективних для клітин ссавців включають дигідрофолатредуктазу (DHFR) і не включають промоторів гену тимідинкінази. Трансформовані клітини ссавців поміщають в умови тиску відбору, в яких пристосування трансформантів для виживання забезпечує винятково присутність у векторі селективного гена. Тиск відбору створюють шляхом культивування трансформованих клітин в умовах, у яких концентрація агента селекції в середовищі послідовно підвищується, що призводить до ампліфікації як селективного гена, так і ДНК, що кодує інший ген, наприклад, антигенсполучного білка-антитіла, яке зв'язується з поліпептидом CD27L. Результатом є підвищення кількості синтезованого з ампліфікованої ДНК поліпептиду, такого як викликаючий антиген CD27L білок.

Сайт сполучення рибосом зазвичай необхідний для ініціації трансляції мРНК і характеризується послідовністю Шайно-Дальгарно (прокаріоти) або послідовністю Козака (еукаріоти). Цей елемент зазвичай розташований у напрямку 3' від промотору та у напрямку 5' від кодуєчої послідовності експресованого поліпептиду. У деяких варіантах реалізації одна або більше кодуєчих ділянок можуть бути функціонально пов'язані з внутрішнім сайтом сполучення рибосом (IRES), що забезпечує можливість трансляції двох відкритих рамок зчитування з одного транскрипта РНК.

У деяких випадках, наприклад, таких, коли бажане глікозилювання в системі експресії еукаріотичних клітин-хазяїнів, можна здійснювати з маніпуляції з різними пре- або пропослідовностями для поліпшення глікозилювання або виходу. Наприклад, можна змінити сайт відщеплення пептидазою конкретного сигнального пептиду або додати пропослідовності, що можуть вплинути на глікозилювання. Кінцевий білковий продукт може містити, у положенні -1 (щодо першої амінокислоти у зрілому білку) одну або більше додаткових амінокислот, пов'язаних із експресією, які, можливо, не були повністю видалені. Наприклад, кінцевий білковий продукт може містити один або два амінокислотних залишки, які характерні для сайту розщеплення пептидазою, приєднаних до аміно-кінця. В альтернативному варіанті, застосування деяких ферментів може призвести до утворення трохи вкороченої форми цільового поліпептиду, якщо фермент відщеплює таку область у зрілому білку.

Вектори експресії та клонування згідно з даним винаходом зазвичай містять промотор, який розпізнається організмом-хазяїном, що функціонально пов'язаний з молекулою, яка кодує сполучний антиген CD27L білок. Промотори - це нетранскрибовані послідовності, розташовані "вище" (тобто, у напрямку 5') старт-кодону структурного гена (зазвичай в межах приблизно від 100 до 1000 п.о.), який контролює транскрипцію структурного гена. Промотори зазвичай відносять до одного з двох класів: індукцйбельні промотори та конститутивні промотори. Індукцйбельні промотори ініціюють підвищені рівні транскрипції з ДНК, що знаходиться під їхнім контролем, у відповідь на зміну умов культивування, таких як присутність або відсутність живильних речовин або зміни температури. Конститутивні промотори, з одного боку, забезпечують постійну транскрипцію гена, з яким вони функціонально сполучені, тобто майже або зовсім не впливають на експресію гена. Добре відоме велике число промоторів, які розпізнаються різними потенційними клітинами-хазяїнами. Придатні промотори функціонально сполучають з ДНК, що кодує сполучний антиген CD27L білок, який містить важкий ланцюг або

легкий ланцюг, згідно з даним винаходом, шляхом виділення промотору з ДНК-джерела шляхом розщеплення ферментами рестрикції та вбудовування цільової послідовності промотору у вектор.

Придатні промотори для застосування з дріжджовими хазяїнами добре відомі в техніці.

5 Дріжджові енхансери переважно використовують з дріжджовими промоторами. Придатні промотори для застосування хазяїнами, що є клітинами ссавців, включають, але не обмежені перерахованими: промотори, отримані з геномів вірусів, таких як вірус поліоми, вірус віспи курей, аденовірус (такий як аденовірус 2), вірус папіломи великої рогатої худоби, вірус саркоми птахів, цитомегаловірус, ретровіруси, вірус гепатиту В і, найбільш переважно, вірус мавп 40 (SV40). Інші переважні промотори ссавців включають гетерологічні промотори ссавців, наприклад, промотори теплового шоку та промотор актину.

10 Додаткові промотори, які можуть становити інтерес, включають, але не обмежені наступними: ранній промотор SV40 (Benoist i Chambon, 1981, Nature 290:304-310); промотор ЦМВ (Thornsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. U.S.A. 81:659-663); промотор довгого 3'-кінцевого повтору вірусу саркоми Payca (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797); промотор тимідинкінази вірусу герпеса (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-1445); промотор і регуляторні послідовності гена металотіоніну Prinster et al., 1982, Nature 296:39-42); і прокаріотичні промотори, такі як промотор бета-лактамази (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731); або промотор tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25). Також інтерес представляють наступні області контролю транскрипції тварин, які демонструють тканинну специфічність та використовуються в трансгенних тваринах: контрольна область гена еластази I, активна в ацинарних клітинах підшлункової залози (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); контрольна область гена інсуліну, яка активна в бета-клітинах підшлункової залози (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122); контрольна область гена імунoglobуліну, яка активна в лімфоїдних клітинах (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444); контрольна область мишачого вірусу пухлини молочної залози, яка активна в клітинах яєчок, молочної залози та гладких клітинах s (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495); контрольна область гена альбуміну, яка активна в печінці (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276); контрольна область гена альфа-фетопротеїну, яка активна в печінці (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 253:53-58); контрольна область гена альфа 1-антитрипсину, яка активна в печінці (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171); контрольна область гена бета-глобіну, яка активна в мієлоїдних клітинах (Mogam et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); контрольна область гена основного білка мієліну, яка активна в олігодендроцитах мозку (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); контрольна область гена легкого ланцюга-2 міозину, яка активна в кісткових м'язах (Sani, 1985, Nature 314:283-286); і контрольна область гена гонадотропного рилізінг-гормону, яка активна в гіпоталамусі (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

40 У вектор може бути включена енхансерна послідовність для підвищення транскрипції ДНК, що кодує сполучний антиген CD27L білок, який містить легкий ланцюг або важкий ланцюг, згідно з даним винаходом у вищих еукаріот. Енхансери являють собою цис-діючі елементи ДНК, довжиною зазвичай приблизно 10-300 п.о., які впливають на промотор, підсилюючи транскрипцію. Енхансери відносно незалежні у відношенні орієнтації та положення, вони були виявлені як у положенні 5', так і у положенні 3' щодо одиниці транскрипції. Відомо декілька доступних послідовностей енхансерів із генів ссавців (наприклад, глобіну, еластази, альбуміну, альфа-фетопротеїну й інсуліну). Однак, зазвичай використовуються енхансери з вірусу. Енхансер SV40, ранній промотор цитомегаловірусу, енхансер поліоми та енхансери аденовірусу, відомі в даній області, є прикладами елементів-енхансерів для активації еукаріотичних промоторів. Хоча енхансери можуть бути розташовані у векторі або у напрямку 5', або у напрямку 3' від кодуєчої послідовності, зазвичай вони розташовані в ділянці 5' щодо промотору. Послідовність, яка кодує відповідну нативну або гетерологічну сигнальну послідовність (лідерну послідовність або сигнальний пептид) може бути вбудована в експресійний вектор для стимуляції позаклітинної секреції антитіла. Вибір сигнальної послідовності та лідера залежить від типу клітини-хазяїна, в якому антитіло буде продукуватися, гетерологічна сигнальна послідовність може замінити нативну сигнальну послідовність. Приклади сигнальних пептидів, які функціонують у клітинах-хазяїнах, що є клітинами ссавців, включають наступні: сигнальна послідовність для інтерлейкіну-7 (IL-7), описана у патенті США № 4965195; сигнальна послідовність для рецептора інтерлейкіну-2, описана у Cosman et al., 1984, Nature 312:768; сигнальний пептид рецептора інтерлейкіну-4, описаний в



Європейському патенті № 0367566; сигнальний пептид рецептора інтерлейкіну-1 типу I, описаний у патенті США № 4968607; сигнальний пептид рецептора інтерлейкіну-1 типу II, описаний в Європейському патенті № 0460846.

Вектор може включати один або більше елементів, які полегшують експресію при інтегруванні вектора в геном клітини-хазяїна. Приклади включають елемент EASE (Aldrich et al. 2003 Biotechnol Prog. 19:1433-38) і ділянку сполучення з матриксом (MAR). Ділянки MAR опосередковують структурну організацію хроматину та можуть захистити інтегрований вектор від "ефекту положення". Відповідно, ділянки MAR особливо корисні у випадку використання вектора для отримання стабільних трансфектантів. У даній області відомий ряд природних і синтетичних MAR-вмісних нуклеїнових кислот, наприклад, патенти США №№ 6239328; 7326567; 6177612; 6388066; 6245974; 7259010; 6037525; 7422874; 7129062.

Експресійні вектори згідно з даним винаходом можуть бути сконструйовані на основі вихідного вектора, такого як комерційно доступні вектори. Такі вектори можуть містити або не містити всі бажані фланкуючі послідовності. У випадку якщо одна або більше фланкуючих послідовностей, описаних тут, ще не присутні у векторі, вони можуть бути отримані окремо та лігровані у вектор. Способи отримання кожної фланкуючої послідовності добре відомі фахівцям.

Після конструювання вектор і вбудовування молекули нуклеїнової кислоти, що кодує сполучну антиген CD27L послідовність, яка містить легкий ланцюг, у відповідний сайт вектора, повний вектор може бути введений у придатну клітину-хазяїна для ампліфікації та/або експресії поліпептиду. Трансформація експресійного вектора для сполучного антиген CD27L білка у вибрану клітину-хазяїна може бути виконана відомими способами, включаючи трансфекцію, інфікування, кальцій-фосфатну спільну преципітацію, електропорацію, мікроін'єкції, ліпофекцію, опосередковувану DEAE-декстраном трансфекцію або інші відомі методики. Вибраний спосіб буде частково залежати від типу використовуваної клітини-хазяїна. Ці способи та інші придатні способи добре відомі фахівцям й описані, наприклад, в Sambrook et al., 2001, див. вище.

Клітина-хазяїн, при культивуванні у придатних умовах, синтезує сполучний антиген CD27L білок, який потім можна зібрати з культурального середовища (якщо клітина-хазяїн секретує його в середовище) або безпосередньо з клітини-хазяїна, що продукує його (якщо він не секретується). Секреція у відповідній клітині-хазяїні залежить від різних факторів, таких як бажані рівні експресії, модифікації поліпептиду, які бажані або необхідні для його активності (такі як глікозилювання та фосфорилювання) та легкість укладання в біологічно активну форму. Клітина-хазяїн може бути еукаріотичною або прокаріотичною.

Лінії клітин ссавців, доступні як хазяїни для експресії, добре відомі в даній області та включають, але не обмежуються перерахованими: іморталізовані лінії клітин, доступні в Американській колекції стандартних культур (ATCC), і будь-які лінії клітин, які використовуються у відомих в даній області системах експресії, можуть бути використані для отримання рекомбінантних поліпептидів згідно з даним винаходом. Зазвичай клітини-хазяїни трансформують рекомбінантним експресійним вектором, який містить ДНК, що кодує поліпептид цільового анти- CD27L антитіла. До придатних клітин-хазяїнів відносяться клітини прокаріот, дріжджів або вищих еукаріот. Прокаріоти включають грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад, *E. coli* або бацили. Вищі еукаріоти включають клітини комах і стійкі лінії клітин ссавців. Приклади придатних ліній клітин-хазяїнів, що є клітинами ссавців, включають лінію клітин нирки мавпи COS-7 (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), клітини L, клітини 293, клітини C127, клітини 3T3 (ATCC CCL 163), клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) або їхні похідні, такі як Veggie CHO та родинні клітинні лінії, які ростуть у безсироватковому середовищі (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31), клітини HeLa, лінії клітин BHK (ATCC CRL 10) і лінія клітин CV1/EBNA, отримана з лінії клітин нирки африканської зеленої мавпи CV1 (ATCC CCL 70) як описано в McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821, клітини нирки ембріону людини 293, 293 EBNA або MSR 293, епідермальні клітини людини A431, людські клітини Colo205, інші трансформовані лінії клітин приматів, нормальні диплоїдні клітини, штами клітин, отримані з *in vitro* культури первинної тканини, в основному, експлантати, HL-60, U937, клітини HaK або Jurkat. Необов'язково, лінії клітин ссавців, такі як HepG2/3B, KB, NIH 3T3 або S49, наприклад, можна використовувати для експресії поліпептиду, якщо бажано використовувати цей поліпептид у різних аналізах передачі сигналу або в репортерних аналізах. В альтернативному варіанті можливо продукувати поліпептид у нижчих еукаріотах, таких як дріжджі, або у прокаріотах, таких як бактерії. Придатні дріжджі включають *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, штами *Kluveromyces*, *Candida* або будь-які дріжджі, здатні експресувати гетерологічні поліпептиди. Придатні штами бактерій включають *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* або будь-які штами бактерій, здатні експресувати гетерологічні поліпептиди. Якщо поліпептид отриманий у дріжджах або бактеріях, може бути

бажаним модифікувати продукований ними поліпептид, наприклад, шляхом фосфорилювання або глікозилювання відповідних сайтів для отримання функціонального поліпептиду. Такі ковалентні приєднання можуть бути здійснені з використанням відомих хімічних або ферментативних методів. Поліпептид може також бути отриманий шляхом функціонального

5 сполучення виділеної нуклеїнової кислоти згідно з даним винаходом із придатними контрольними послідовностями в одному або більшій кількості експресійних векторів і застосування системи експресії з використанням комах. Матеріали та методи для експресійних систем бакуловірус/клітина комахи доступні для придбання у формі наборів, у, наприклад, Invitrogen, San Diego, Calif., США. (набір Maxbac® kit), також такі методи добре відомі в даній

10 області, наприклад, описані в Summers і Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), і Luckow і Summers, Bio/Technology 6:47 (1988). Безклітинні системи трансляції також можна застосовувати для отримання поліпептидів із використанням молекул РНК, отриманих із конструкцій нуклеїнових кислот, розкритих у даному описі. Відповідні вектори клонування та експресії для застосування з клітинами-хазяїнами бактеріального, грибного,

15 дріжджового походження та отриманими з організму ссавців, описані у Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985). Клітина-хазяїн, що містить виділену нуклеїнову кислоту згідно з даним винаходом, переважно функціонально пов'язану з щонайменше однією послідовністю контролю експресії, є "рекомбінантною клітиною-хазяїном".

У деяких варіантах реалізації лінії клітин можуть бути вибрані шляхом визначення, які лінії клітин забезпечують високий рівень експресії та конститутивно продукують антигенсполучні білки, здатні сполучати CD27L. В іншому варіанті реалізації може бути вибрана лінія клітин з лінії В-клітин, які самі не продукують антитіл, але здатні продукувати та секретувати гетерологічне антитіло.

Кон'югати антитіло-лікарська сполука (ADC)

Варіанти реалізації даного винаходу включають кон'югати антитіло-лікарська сполука (ADC). Зазвичай ADC включає антитіло, кон'юговане з хіміотерапевтичним агентом, наприклад, цитотоксичним агентом, цитостатичним агентом, токсином або радіоактивним агентом. Молекула лінкера може використовуватися для кон'югування лікарського засобу з антитілом. Відомі різні лінкери та лікарські засоби, які можуть використовуватися в методиці ADC, які

25 можна застосовувати у варіантах реалізації даного винаходу. (Див. US 20090028856; US 2009/0274713; US 2007/0031402; WO 2005/084390; WO 2009/099728; US 5208020; US 5416064; US 5475092; 5585499; 6436931; 6372738 і 6340701, усі джерела включені в даний текст шляхом посилання).

Кон'югати антитіло-лікарська сполука можуть бути отримані in vitro методами. Для того, щоб зв'язати лікарську сполуку або проліки з антитілом використовують сполучну групу. Придатні сполучні групи добре відомі та включають кислоточутливі групи, фоточутливі групи, чутливі до дії пептидаз групи та чутливі до дії естераз групи. Переважними сполучними групами є дисульфідні групи. Наприклад, кон'югати можуть бути сконструйовані з використанням реакції дисульфідного обміну між антитілом і лікарською сполукою або проліками. Молекули

35 лікарського засобу також можуть бути пов'язані з агентом, що сполучає клітини, з використанням проміжної молекули-носія, такої як альбумін.

У деяких варіантах реалізації агент, що сполучає клітини, модифікують шляхом проведення реакції біфункціонального зшиваючого реагенту з агентом, що сполучає клітини, яка призводить до ковалентного приєднання молекули лінкера до агента, що сполучає клітини. У даному описі

45 "біфункціональний зшиваючий реагент" або "лінкер" являє собою будь-який хімічний фрагмент, який ковалентно сполучає агент, що сполучає клітини, з лікарською сполукою, такою як описані тут лікарські засоби. У конкретному варіанті реалізації даного винаходу частина сполучного фрагмента представлена лікарською сполукою. У цьому випадку лікарська сполука містить сполучний фрагмент, який є частиною більш великої лінкерної молекули, що використовується

50 для сполучення агента, що сполучає клітини, з лікарською сполукою. Наприклад, для утворення майтансіноїду DM1, бічний ланцюг на C-3 гідроксильній групі майтансину модифікують з утворенням на ній вільної сульфгідрильної групи (SH). Цю тіольовану форму майтансину можна використовувати у реакції з модифікованим агентом, що сполучає клітини, з отриманням кон'югату. Відповідно, кінцевий лінкер утворюється з двох компонентів, один із яких

55 забезпечується зшиваючим реагентом, а другий забезпечується бічною групою DM1.

Будь-який придатний біфункціональний зшиваючий реагент можна використовувати в контексті даного винаходу, за умови, що лінкерний реагент забезпечує збереження терапевтичних (наприклад, цитотоксичність) і націлюючих характеристик лікарського засобу та агента, що сполучає клітини, відповідно. У переважному варіанті лінкерна молекула сполучає лікарську

60 сполуку з агентом, що сполучає клітини, хімічними зв'язками (як описано вище), за рахунок чого

лікарська сполука й агент, що сполучає клітини, хімічно сполучаються (наприклад, ковалентно сполучаються) один із одним.

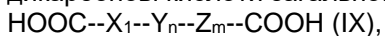
#### Лінкери

У деяких варіантах реалізації ADC включає лінкер, утворений з одного або більше лінкерних компонентів. У переважному варіанті лікарська сполука пов'язана з агентом, що сполучає клітини, дисульфідним зв'язком. Лінкерна молекула містить реактивну хімічну групу, яка здатна реагувати з агентом, що сполучає клітини. Переважними реактивними хімічними групами для реакції з агентом, що сполучає клітини є N-сукцинімідолові ефіри та N-сульфосукцинімідолові ефіри. Додатково лінкерна молекула включає реактивну хімічну групу, переважно дитіопропіділову групу, яка здатна реагувати з лікарською сполукою з утворенням дисульфідного зв'язку. Приклади лінкерних молекул включають, наприклад, N-сукцинімідил 3-(2-піридилтіо)пропіонат (SPDP) (див., наприклад, Carlsson et al., Biochem. J., 173, 723-737 (1978)), N-сукцинімідил 4-(2-піридилтіо)бутаноат (SPDB) (див., наприклад, U.S. Pat. No. 4,563,304) і N-сукцинімідил 4-(2-піридилтіо)пентаноат (SPP) (див., наприклад, реєстраційний номер CAS 341498-08-6). Додаткові приклади лінкерних компонентів включають 6-малеїмідокaproїл, maleїмідопроpanoїл, валін-цитрулін, аланін-феніланін, p-амінобензилкарбоніл і лінкери, отримані в результаті кон'югування зі сполучними реагентами, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: N-сукцинімідил 4-(2-піридилтіо)пентаноат ("SPP"), N-сукцинімідил 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1 карбоксилат ("SMCC", який також називається тут "MCC") і N-сукцинімідил (4-йодо-ацетил)амінобензоат ("SIAB").

Лінкери можуть являти собою "розщеплювані" лінкери або "нерозщеплювані" лінкери (Ducry і Stump, Bioconjugate Chem. 2010, 21, 5-13; джерело повністю включене в даний опис шляхом посилання). Розщеплювані лінкери призначені для вивільнення лікарського засобу під впливом певних факторів середовища, наприклад, при інтерналізації в клітину-мішень. Розщеплювані лінкери включають кислоточутливі лінкери, лінкери, які чутливі до дії протеаз, фоточутливі лінкери, диметилкові лінкери або дисульфідвмісні лінкери. Нерозщеплювані лінкери схильні зберігати ковалентний зв'язок з щонайменше однією амінокислотою антитіла та лікарського засобу після інтерналізації та руйнування в клітині-мішені. Нерозщеплюваний лінкер являє собою будь-який хімічний фрагмент, здатний сполучати лікарську сполуку, таку як майтансиноїд (наприклад, DM1 і подібні), таксан або аналог CC-1065, з агентом, що сполучає клітини, із забезпеченням стабільного ковалентного зв'язку. Відповідно, нерозщеплювані лінкери по суті стійкі до розщеплення під дією кислот, розщеплення під дією світла, розщеплення під дією пептидаз, розщеплення під дією естераз і розщеплення дисульфідних зв'язків в умовах, в яких лікарська сполука або агент, що сполучає клітини, зберігають активність.

Стабільні зшиваючі реагенти, які утворюють нерозщеплювані лінкери між лікарською сполукою й агентом, що сполучає клітини, добре відомі. Приклади нерозщеплюваних лінкерів включають лінкери, які містять фрагмент N-сукцинімідолового ефіру, N-сульфосукцинімідолового ефіру, а також фрагменти на основі maleїмідо- або галоацетила-для реакцій з лікарськими засобами. Зшиваючі лінкерні реагенти, які містять фрагмент на основі maleїмідо- включають N-сукцинімідил 4-(maleїмідометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сукцинімідил-4-(N-maleїмідометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амідокaproат), який являє собою "довголанцюговий" аналог SMCC (LC--SMCC), x-maleїмідоундеканової кислоти N-сукцинімідоловий ефір (KMUA), gamma-maleїмідомасляної кислоти N-сукцинімідоловий ефір (GMBS), epsilon-maleїмідокaproнової кислоти N-гідроксисукцинімідний ефір (EMCS), m-maleїмідобензоїл-N-гідроксисукцинімідний ефір (MBS), N-(альфа-maleїмідоацетокси)-сукцинімідний ефір (AMAS), сукцинімідил-6-(beta-maleїмідопропіонамідо)гексаноат (SMPH), N-сукцинімідил 4-(p-maleїмідофеніл)бутират (SMPB) і N-(p-maleїмідофеніл) ізоціанат (PMPI). Зшиваючі реагенти, які містять групу на основі галоацетила, включають N-сукцинімідил-4-(йодоацетил)-амінобензоат (SIAB), N-сукцинімідил йодоацетат (SIA), N-сукцинімідил бромоеацетат (SBA) і N-сукцинімідил 3-(бромоеацетамідо)пропіонат (SBAP). Прикладом переважних нерозщеплюваних лінкерів є MCC.

Інші зшиваючі реагенти-лінкери, в яких відсутній атом сірки, який утворює нерозщеплювані лінкери, також можуть бути отримані з груп на основі дикарбонових кислот. Придатні фрагменти на основі дикарбонових кислот включають, але не обмежені зазначеними: альфа, омега-дикарбонові кислоти загальної формули (IX):



де X являє собою лінійну або розгалужену алкільну, алкенільну, алкінільну групу, що містить від 2 до 20 атомів вуглецю, Y являє собою циклоалкільну або циклоалкенільну групу, що містить від 3 до 10 атомів вуглецю, Z являє собою заміщену або незаміщену ароматичну групу, що містить від 6 до 10 атомів вуглецю, або заміщену або незаміщену гетероциклічну групу, в якій

гетероатом вибраний з N, O і S, і де  $l, m$  і  $n$  кожний дорівнює 0 або 1, за умови, що  $l, m$  і  $n$  не дорівнюють нулю всі одночасно.

Багато розкритих тут нерозщеплюваних лінкерів докладно описані в публікації заявки на патент США 2005/0169933 A1.

- 5 Приклади придатних розщеплюваних лінкерів включають дисульфідні лінкери, чутливі до дії кислот лінкери, фоточутливі лінкери, чутливі до дії пептидаз лінкери та чутливі до дії естераз лінкери. Лінкери, які містять дисульфід, являють собою лінкери, що розщеплюються в результаті дисульфідного обміну, який може відбуватися у фізіологічних умовах. Чутливі до дії кислот лінкери розщеплюються при кислому pH. Наприклад, деякі внутрішньоклітинні компартменти, такі як ендосоми та дизосоми, мають кислий pH (pH 4-5), що забезпечує умови, придатні для розщеплення чутливих до дії кислоти лінкерів. Фоточутливі лінкери можна застосовувати на поверхні тіла та у багатьох заглибленнях тіла, в які можливий доступ світла. Крім того, інфрачервоне світло може проникати у тканини. Чутливі до дії пептидаз лінкери можна застосовувати для розщеплення деяких пептидів всередині або поза клітинами (див., наприклад, Trouet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 626-629 (1982) й Umemoto et al., Int. J. Cancer, 43, 677-684 (1989)).

Лікарські засоби

- У деяких варіантах реалізації антитіло кон'юговане з хіміотерапевтичним агентом. Приклади хіміотерапевтичних агентів включають алкілюючі агенти, такі як тіотепа та циклофосфамід (CYTOXAN.TM.); алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азиридины, такі як бензодопа, карбоквуон, метуредопа та уредопа; етиленіміни та метиламеламіни, включаючи алтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід і триметилломеламін; ацетогеніни (зокрема, булатацин і булатацинон); камптотecin (включаючи синтетичний аналог топотекан); бріостатин; калістатин; CC-1065 (включаючи його синтетичні аналоги адозелезин, карцелезин і біцелезин); криптофікін (зокрема, криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги, KW-2189 і CBI-TMI); елеутеробін; панкреатистатин; саркодиктиїна; спонгістатин; похідні азотистого іприту такі, як хіорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамід, естрамустин, іфосфамід, меклоретамін, меклоретаміну оксиду гідрохлорид, мелфалан, новембіхін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, уромустин; нітрозосечовини, такі як кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, німустин, ранімустин; антибіотики, такі як енідіїнові антибіотики (наприклад каліхіміцин, зокрема, каліхіміцин гамма 1 і каліхіміцин тета I, див., наприклад, Angew Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); динеміцин, включаючи динеміцин A; еспераміцин; а також неокарцинонстатинний хромофор й аналогічні хромопротеїнові хромофорні антибіотики жнедіїнового ряду, аклациномізини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, карабіцин, каміноміцин, карцинофілін; хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубіцин (включаючи морфоліно доксорубіцин, ціаноморфоліно доксорубіцин, 2-піроліно-доксорубіцин і дезоксіоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцеломіцин, нітоміцини, мікофенолокіслота, ногаламіцин, оливоміцини, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, зтиностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурину, такі як флюдарабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; аналоги піримідину, такі як, анцитабін, азацитидину, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидезоксіуридин, доксифлуридин еноцитабін, флоксуридин, 5-FU; андрогени, такі як калустерон, дромостанолон пропіонат, епітіостанол, мелітіостан, тестолактон; антагоністи адреналіну, такі як: аміноглутетимід, мітотан, трилостан; агоністи фолієвої кислоти, такі як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфамідні глікозиди; амінолевулінової кислоти; амсакрин; бестарубіцил; бісантрен; едотраксат; дефофамін; демеколцин; діазиквон; ельфомітин; еліптинію ацетат; епотилон; етоглуцид; нітрат галію; гідроксисечовина; лентинан; лонідамін; майтансинаїди: такі як майтансин й ансамітоцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопідамол; нітракрин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; подофілінова кислота; 2-етилгідразид; прокарбазин; PSK.RTM.; разоксан; ризоксин; сизофуран; спірогерманій; тенауазонова кислота; триазикон; 2,2',2"- трихлортриетиламін; трихотецени (зокрема, токсин T-2, веракурин A, роридин A й ангуїдин); уретан; віндезин; дакарбазин; манномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид ("Ara-C"); циклофосфамід; тіотепа; таксоїди, наприклад паклітаксел (TAXOL.TM., Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J., США), доцетаксель (TAXOTERE.RTM., Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Франція); хлорамбуцил; гемцитабін; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин; платина; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоміцин C; мітоксантрон;

вінкристин; винорелбін; навелбін; новантрон; теніпозид; дауноміцин; аміноптерин; кселода; ібандронат; CPT-11; інгібітор топоізомерази RFS 2000; дифторметилломітин (DMFO); ретиноева кислота, капецитабін і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якого з перерахованих вище засобів. Також у це визначення включені антигормональні засоби, які регулюють або інгібують вплив гормонів на пухлини, такі як антиестрогени, включаючи, наприклад, тамоксифен, ралоксифен, інгібуючі ароматазу 4(5)-імідазоли, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон і тореміфен (Фарестон, Fareston); й антиандроєни, такі як флутамід, нілутамід, бікалутамід, леупролід і гозерелін; міРНК і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якого з перерахованих вище засобів. Інші хіміотерапевтичні агенти, придатні для застосування в даному винаході, розкриті у патентній публікації США №. 20080171040 або патентній публікації США 20080305044, які повністю включені в даний опис шляхом посилання.

Передбачається, що антитіло може бути кон'юговане з двома або більше різними хіміотерапевтичними агентами або фармацевтична композиція може містити суміш антитіл, а антитільні компоненти ідентичні, за тим виключенням, що вони кон'юговані з різними хіміотерапевтичними агентами. Такі варіанти реалізації можуть бути корисні для націлювання на декілька біологічних каскадів із клітини-мішені.

У переважних варіантах реалізації ADC (кон'югат антитіло-лікарська сполука) включає антитіло, кон'юговане з однією або більше молекулами майтансиноїдів, які є інгібіторами мітозу, що діють за рахунок інгібування полімеризації тубуліна. Майтансиноїди, включаючи різні модифіковані форми, описані у патентах США №№ 3896111; 4151042; 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; 4371533; а також у WO 2009/099728. Майтансиноїди як лікарські фрагменти можуть бути виділені з природних джерел, отримані з використанням рекомбінантної технології або отримані синтетичним шляхом. Приклади майтансиноїдів включають C-19-дехлор (патент США № 4256746), C-20-гідрокси (або C-20-диметил) +/- C-19-дехлор (патенти США №№ 4307016 і 4361650), C-20-диметокси (або C-20-ацилокси (-OCOR), +/- дехлор (патент США № 4294757), C-9-SH (патент США № 4 424 219), C-14-алкоксиметил (диметокси/CH<sub>2</sub>OR) (патент США № 4,331,598), C-14-гідроксиметил або ацилоксиметил (CH<sub>2</sub>OH або CH<sub>2</sub>OAc) (патент США № 4,450,254), C-15-гідрокси/ацилокси (патент США № 4,364,866), C-15-метокси (патенти США №№ 4 313 946 і 4 315 929), C-18-N-диметил (патенти США №№ 4 362 663 і 4 322 348) і 4,5-діокси (патент США № 4 371 533).

Різні положення в молекулах майтансиноїдів можуть бути використані як положення зв'язку, залежно від бажаного типу зв'язку. Наприклад, для утворення складноефірного зв'язку придатними буде будь-яка група з наступних: положення C-3 з гідроксильною групою, положення C-14, модифіковане гідрозиметилом, положення C-15, модифіковане діоксильною групою та положення C-20, що містить гідроксильну групу (патенти США №№ 5208020, RE39151 і 6913748; публікації заявок на патент США №№ 20060167245 і 20070037972 і WO 2009099728).

Переважні майтансиноїди включають сполуки, відомі як DM1, DM3 і DM4 (публікації заявок на патент США №№ 2009030924 і 20050276812, включені в даний текст шляхом посилання).

ADC, які містять майтансиноїди, способи отримання таких кон'югатів (ADC) і їх терапевтичне застосування розкриті у Патентах США №№ 5208020 і 5416064, заявці на патент США 20050276812, і у публікації WO 2009099728 (всі зазначені джерела включені в даний текст шляхом посилання). Лінкери, які можна застосовувати для отримання ADC з майтансиноїдами відомі (патент США № 5208020 і публікації заявок на патент США №№ 2005016993 і 20090274713; всі джерела включені в даний текст шляхом посилання). Кон'югати (ADC) з майтансиноїдами, які містять лінкер SMCC можуть бути отримані, як описано у патентній публікації США № 2005/0276812.

У деяких варіантах реалізації ADC включає антитіло, кон'юговане DM1 за допомогою лінкера SMCC. Переважні варіанти реалізації включають Ab1-SMCC-DM1, Ab2-SMCC-DM1, Ab3-SMCC-DM1, Ab4-SMCC-DM1, Ab5-SMCC-DM1, Ab6-SMCC-DM1, Ab7-SMCC-DM1 і Ab8-SMCC-DM1.

Навантаження лікарською сполукою

Кон'югат (ADC) може містити від 1 до 20 хіміотерапевтичних агентів на антитіло. Композиції ADC можуть бути охарактеризовані середнім числом фрагментів лікарського засобу на молекулу антитіла в композиції. Середнє число фрагментів лікарського засобу може бути визначене з використанням звичайних засобів, таких як мас-спектрометрія, імуноаналіз і ВЕРХ. У деяких випадках гомогенна популяція кон'югатів (ADC) може бути виділена та очищена за допомогою зверненофазової ВЕРХ або електрофорезу. Відповідно, фармацевтичні композиції кон'югатів ADC можуть містити гетерогенну або гомогенну популяцію антитіл, які сполучені 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або більшим числом фрагментів лікарських засобів.

- У переважних варіантах реалізації ADC містить антитіло, кон'юговане з однією або більше молекулами DM1. Варіанти реалізації даного винаходу включають композиції, які містять у середньому приблизно 1, приблизно 2, приблизно 3, приблизно 4, приблизно 5, приблизно 6, приблизно 7, приблизно 8, приблизно 9, приблизно 10, приблизно 11, приблизно 12, приблизно 13, приблизно 14, приблизно 15, приблизно 16, приблизно 17, приблизно 18, приблизно 19, або приблизно 20 молекул DM1 на антитіло. Переважними є композиції ADC, які включають Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7 або Ab8, що містять у середньому від 1 до 10 молекул DM1 на антитіла, композиції, які містять антитіла та у середньому від 3 до 7 молекул DM1 на антитіло, та містить антитіла й у середньому від 4 до 6 молекул DM1, включаючи середнє число молекул DM1 на антитіло, яке становить приблизно 4,0, приблизно 4,1, приблизно 4,2, приблизно 4,3, приблизно 4,4, приблизно 4,5, приблизно 4,6, приблизно 4,7, приблизно 4,8, приблизно 4,9, приблизно 5,0, приблизно 5,1, приблизно 5,2, приблизно 5,3, приблизно 5,4, приблизно 5,5, приблизно 5,6, приблизно 5,7, приблизно 5,8, приблизно 5,9 та приблизно 6,0.
- Антитіла з підвищеною ефекторною функцією
- Одна з функцій Fc-частини антитіла полягає у взаємодії з імунною системою при зв'язуванні антитіла з його мішенню. Це вважається "ефекторною функцією". Взаємодія призводить до антитілозалежної клітинної цитотоксичності (АЗКЦ), антитілозалежної клітинної (АЗКФ), та/або комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ). АЗКЦ й АЗКФ здійснюються за рахунок сполучення Fc з рецепторами до Fc на поверхні клітин імунної системи. КЗЦ здійснюється за рахунок сполучення Fc з білками системи комплементу, наприклад, C1q.
- Підкласи IgG мають різну здатність до здійснення ефекторних функцій. Наприклад, IgG1 значно перевершує IgG2 й IgG4 у здійсненні АЗКЦ і КЗЦ. Відповідно, у тих варіантах реалізації, в яких відбувається націлювання на клітини, що експресують CD27L, для їхнього руйнування, переважним буде анти-CD27L антитіло типу IgG1.
- Ефекторну функцію антитіла можна підвищити або понизити шляхом введення однієї або більше мутацій в Fc. Варіанти реалізації даного винаходу включають антигенсполучні білки, наприклад, антитіла, з Fc, модифікованим з метою підвищення ефекторної функції (США 7 317 091 і Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009; обидва джерела включені в даний текст шляхом посилання). Приклади молекул Fc IgG1 з підвищеною ефекторною функцією включають (на основі схеми нумерації Kabat) ті, які містять наступні заміни: S239D/I332E, S239D/A330S/I332E, S239D/A330L/I332E, S298A/D333A/K334A, P247I/A339D, P247I/A339Q, D280H/K290S, D280H/K290S/S298D, D280H/K290S/S298V, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, G236A/S239D/I332E, K326A/E333A, K326W/E333S, K290E/S298G/T299A, K290N/S298G/T299A, K290E/S298G/T299A/K326E, K290N/S298G/T299A/K326E.
- Інші варіанти реалізації даного винаходу включають антигенсполучні білки, наприклад, антитіла, з Fc, модифікованим з метою зниження ефекторної функції. Приклади молекул Fc зі зниженою ефекторною функцією включають (на основі схеми нумерації Kabat) ті, які містять наступні заміни: N297A (IgG1), L234A/L235A (IgG1), V234A/G237A (IgG2), L235A/G237A/E318A (IgG4), H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2), C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1), C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1), L234F/L235E/P331S (IgG1).

## S267E/L328F (IgG1)

Інший спосіб зниження ефекторної функції білків, які містять Fc імуноглобуліну IgG, заснований на зменшенні фукозилювання -Fc. Видалення основної фукози з олігосахаридів комплексного типу з двома бічними ланцюгами, приєднаних до Fc призводить до значного підвищення АЗКЦ.

Відомо стільки способів зниження або усунення фукозилювання молекул, які містять Fc, наприклад, антитіл. Ці способи включають рекомбінантну експресію в деяких лініях клітин ссавців, включаючи клітинну лінію з нокаутом FUT8, варіант Lec13 лінії CHO, лінію клітин гібридами пацюка YB2/O, лінію клітин, які містять малу інтерферуючу РНК, специфічну до гена FUT8, і лінію клітин, які експресують В-1,4-N-ацетилглюкозамінілтрансферазу III і  $\alpha$ -маннозидазу II комплексу Гольджі. В альтернативному варіанті молекула, яка містить Fc, може експресуватися в клітинах, що не є клітинами ссавців, таких як -клітина рослини, дріжджова клітина або прокаріотична клітина, наприклад, *E. coli*. Відповідно, у деяких варіантів реалізації даного винаходу композиція включає антитіло, наприклад, Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7 або Ab8 зі зниженим фукозилюванням або з повною відсутністю фукозилювання.

Фармацевтичні композиції

У деяких варіантах здійснення даний винахід надає фармацевтичну композицію, яка містить терапевтично ефективну кількість одного або декількох антиген-сполучних білків згідно з даним винаходом разом із фармацевтично ефективними розріджувачами, носієм, розчинником, емульгатором, консервантом, й/або ад'ювантом. У деяких варіантах здійснення даного винаходу антиген-сполучний білок являє собою антитіло, в тому числі кон'югат антитіла з ліками або біспецифічне антитіло. Фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом включають рідкі, заморожені та ліофілізовані композиції, але не обмежуються ними.

Переважно речовини препарату є нетоксичними для реципієнтів у застосовуваних дозах і концентраціях. У конкретних варіантах здійснення даного винаходу надаються фармацевтичні композиції, які містять терапевтично ефективну кількість сполучного антиген CD27L білка, наприклад, сполучний CD27L кон'югат (ADC).

У деяких варіантах здійснення даного винаходу зазначена фармацевтична композиція може містити речовини для модифікації, підтримки або збереження, наприклад, рН, осмолярності, в'язкості, прозорості, кольору, ізотонічності, запаху, стерильності, стабільності, швидкості розчинення або вивільнення, адсорбції або проникнення композиції. У таких варіантах здійснення придатні речовини композиції включають амінокислоти (наприклад, гліцин, глютамін, аспарагін, аргінін, пролін, або лізин); протимікробні препарати; антиоксиданти (такі як аскорбінова кислота, сульфат натрію або гідросульфат натрію); буферні сполуки (такі як борати, бікарбонати, Трис-HCl, цитрати, фосфати або інші органічні кислоти); наповнювачі (такі як маннітол або гліцин); хелатуючі агенти (такі як етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА)); комплексоутворюючі агенти (такі як кофеїн, полівінілпіролідон, бета-циклодекстрин або гідроксипропіл-бета-циклодекстрин); наповнювачі; моносахариди; дисахариди; й інші вуглеводи (такі як глюкоза, манноза або декстрини); білки (такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни); барвники, смакові добавки та розріджувачі; емульгатори; гідрофільні полімери (такі як полівінілпіролідон); низькомолекулярні поліпептиди; солеутворюючі протиіони (наприклад, натрію); консерванти (такі як хлорид бензалконію, бензойна кислота, саліцилова кислота, тимеросал, фенол, метилпарабен, пропілпарабен, хлоргексидин, сорбінова кислота або пероксид водню); розчинники (такі як гліцерин, пропіленгліколь або поліетиленгліколь); цукрові спирти (такі як маннітол або сорбіт); суспендуючі агенти; поверхнево-активні речовини або змочувальні агенти (наприклад, пліоронік®, ПЕГ, складні ефіри сорбітану, полісорбати, такі як полісорбат 20, полісорбат, Тритон, триметамін, лецитин, холестерин, тилоксапал); агенти, які підсилюють стабільність (наприклад, сахароза або сорбіт); агенти, які підсилюють тонічність (наприклад, галогеніди лужних металів, переважно хлорид натрію або калію, маннітол, сорбіт); засоби доставки; розріджувачі; наповнювачі та/або фармацевтичні ад'юванти, але не обмежуються ними. Див., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18-е видання (під редакцією A. R. Genrmo), 1990, Mack Publishing Company.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу оптимальна фармацевтична композиція буде визначатися фахівцем у даній області техніки, залежно від, наприклад, передбачуваного шляху введення, формат доставки та бажаної дози. Дивись, наприклад, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, вище. У деяких варіантах здійснення даного винаходу такі композиції можуть впливати на фізичний стан, стабільність, швидкість вивільнення *in vivo* і швидкості кліренсу *in vivo* антиген-сполучних білків згідно з даним винаходом. У деяких варіантах здійснення даного винаходу первинний носій у фармацевтичній композиції може бути або водним, або неводним за природою. Наприклад, придатним носієм може бути вода для ін'єкцій, фізіологічний сольовий розчин або штучна спинномозкова рідина, можливо з

додаванням інших матеріалів, які зазвичай використовуються в композиціях для парентерального введення. Нейтральний буферний сольовий розчин або сольовий розчин, змішаний з сироватковим альбуміном, також є прикладами носіїв. У конкретних варіантах здійснення даного винаходу фармацевтичні композиції містять Трис-буфер із рН приблизно 7,0-8,5, або ацетатний буфер із рН приблизно 4,0-5,5, і можуть додатково включати сорбіт або його придатний замінник. У деяких варіантах здійснення даного винаходу композиції зі сполучним антиген CD27L білком можуть бути приготовлені для зберігання змішуванням вибраної композиції, що має бажаний ступінь чистоти, з необов'язковим використанням додаткових реагентів (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, вище) у вигляді ліофілізованого залишку або водного розчину. Крім того, у деяких варіантах здійснення даного винаходу продукт із сполучним антиген CD27L білком може бути приготовлений у вигляді ліофілізату з використанням відповідних наповнювачів, таких як сахароза.

Фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом можуть бути підібрані для парентеральної доставки. Альтернативно, зазначені композиції можуть бути підібрані для інгаляції або для доставки через травний тракт, наприклад, перорально. Отримання таких фармацевтично прийнятних композицій відоме в даній області техніки. Компоненти зазначеної композиції присутні переважно в концентраціях, які прийнятні в місці введення. У деяких варіантах здійснення даного винаходу використовуються буфери для підтримки композиції при фізіологічному значенні рН або при злегка більш низькому рН, як правило, у діапазоні рН від приблизно 5 до приблизно 8.

Коли передбачається парентеральне введення, терапевтичні композиції для застосування згідно з даним винаходом можуть бути представлені у вигляді апірогенного, придатного для парентерального введення водного розчину, що містить бажаний CD27L антиген-сполучний білок із фармацевтично прийнятним носієм. Найбільш придатним засобом для парентерального введення є стерильна дистильована вода, в якій CD27L антиген-сполучний білок приготовлений у вигляді стерильного ізотонічного розчину, що зберігається належним чином. У деяких варіантах здійснення даного винаходу препарат може включати в себе композицію необхідної молекули з агентом, наприклад, ін'єктованими мікросферами, біодеградованими частинками, полімерними сполуками (такими як полімолочна кислота або полігліколева кислота), бусами або ліпосомами, які можуть забезпечити контрольоване або тривале вивільнення продукту, який може бути доставлений шляхом ін'єкції з уповільненим усмоктуванням. У деяких варіантах здійснення даного винаходу також може бути використана гіалуронова кислота, яка має ефект сприяння тривалої циркуляції. У деяких варіантах здійснення даного винаходу можуть бути використані імплантовані пристрої доставки лікарських засобів для введення бажаного антигенсполучного білка.

Фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом можуть бути приготовлені для інгаляції. У цих варіантах сполучні антиген CD27L білки готують переважно у вигляді сухого порошку для інгаляції. У конкретних варіантах здійснення даного винаходу розчини для інгаляції сполучного антиген CD27L білка також можуть бути приготовлені з пропелентом для аерозольної доставки. У деяких варіантах здійснення даного винаходу розчини можуть розпорошуватися. Введення в легені та спосіб отримання таких композицій далі описані в міжнародній патентній заявці PCT/US94/001875, яка включена в даний опис за допомогою посилання й яка описує доставку хімічно модифікованих білків у легені.

Також передбачається, що композиції можуть бути введені перорально. Сполучні антиген CD27L білки, які вводять таким чином, можуть бути приготовлені з носіями, що зазвичай використовують в рецептурі твердих лікарських форм, таких як таблетки і капсули, або без таких носіїв. У деяких варіантах здійснення даного винаходу капсули можуть бути призначені для вивільнення активного компонента композиції у певній точці у шлунково-кишковому тракті, коли біодоступність є максимальною, а попередня системна деградація зведена до мінімуму. Додаткові засоби можуть бути додані, щоб полегшити абсорбацію сполучного антиген CD27L білка. Також можуть бути використані розріджувачі, барвники, воски з низькою температурою плавлення, рослинні олії, змазуючі речовини, суспендуючі агенти, агенти, які розпушують таблетки, і сполучні речовини.

Інші фармацевтичні композиції будуть очевидні фахівцям у даній області техніки, у тому числі композиції, які включають сполучні антиген CD27L білки у препаратах із уповільненим або контрольованим вивільненням. Методи отримання множини інших засобів доставки з уповільненим або контрольованим вивільненням, таких як ліпосоми, біологічно деградовані мікрочастинки або пористі гранули та ін'єкції з уповільненим вивільненням, також відомі фахівцям у даній області. Див., наприклад, міжнародну патентну заявку PCT/US93/00829, яка включена в даний опис за допомогою посилання та описує регульоване вивільнення з пористих



полімерних мікрочастинок для доставки фармацевтичних композицій. Препарати з уповільненим вивільненням можуть містити в собі напівпроникні полімерні матриці у вигляді формованих виробів, наприклад, плівок або мікрокапсул. Матриці з уповільненим вивільненням можуть включати складні поліефіри, гідрогелі, полілактиди (як описано у патенті США № 3,773,919 і публікації Європейської патентної заявки EP 058481, кожна з яких включена в даний опис за допомогою посилання), співполімери L-глутамінової кислоти та гамма-етил-L-глутамату (Sidman і ін., 1983, Biopolymers 2:547-556), полі(2-гідроксietилметакрилат) (Langer і ін., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 і Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), етиленвінілацетат (Langer et al., 1981, вище) або полі-D(-)- 3-гідроксимасляну кислоту (публікація Європейської патентної заявки EP 133,988). Композиції з уповільненим вивільненням можуть також включати ліпосоми, які можуть бути отримані будь-яким із декількох способів, відомих у даній області техніки. Дивись, наприклад, Eppstein і ін., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; публікації Європейських патентних заявок EP 036,676; EP 088,046 і EP 143,949, включені в даний опис за допомогою посилання.

Фармацевтичні композиції, які використовуються для введення *in vivo*, як правило, надаються у вигляді стерильних препаратів. Стерилізація може бути виконана шляхом фільтрації через стерильні фільтраційні мембрани. Коли композицію ліофілізують, стерилізацію за допомогою цього методу можна проводити або до ліофілізації та відновлення, або після них. Композиції для парентерального введення можуть зберігатися в ліофілізованій формі або в розчині. Парентеральні композиції зазвичай поміщають у контейнер, що має стерильний порт доступу, наприклад, пакет для внутрішньовенного розчину або флакон, що має пробку, яка проколюється голкою для підшкірної ін'єкції.

Аспекти даного винаходу включають в себе само-буферизуючі композиції зі сполучним антиген CD27L білком, які можуть бути використані у вигляді фармацевтичних композицій, як описано в міжнародній патентній заявці WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599), яка включена в даний документ у повному обсязі за допомогою посилання.

Як обговорювалося вище, деякі варіанти здійснення даного винаходу забезпечують білкові композиції з сполучним антиген CD27L білком, зокрема фармацевтичні композиції з сполучним антиген CD27L білком, які містять, на додаток до сполучного антиген CD27L білка, один або декілька наповнювачів, таких як описані з метою ілюстрації в цьому розділі та в інших місцях даного опису. У цьому зв'язку допоміжні речовини можуть використовуватися в даному винаході для різноманітних потреб, таких як коректування фізичних, хімічних або біологічних властивостей композицій, таких як коректування в'язкості, і в способі здійснення даного винаходу для підвищення ефективності та для стабілізації таких композицій та процесів проти деградації та псування через, наприклад, зовнішні впливи, які виникають у процесі виробництва, відвантаження, зберігання, передпродажній підготовці, введенні та в наступному.

Доступна множина прикладів стабілізації білка та розробки матеріалів і методів, які використовуються у цій області, таких як описані Arakawa і ін., "Solvent interactions in pHarmaceutical formulations, " Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick і ін., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution, " in: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), і Randolph і ін., "Surfactant-protein interactions, " Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), кожен з яких включений у даний опис за допомогою посилання в повному обсязі, особливо в частинах, що мають відношення до наповнювачів і процесів за участю самобуферизуючих білкових композицій відповідно до даного винаходу, особливо що стосується білкових фармацевтичних продуктів і процесів для ветеринарії та/або застосування в медичних цілях для людини.

Солі можуть використовуватися відповідно до деяких варіантів даного винаходу для того, щоб, наприклад, регулювати іонну силу та/або ізотонічність композиції, та/або поліпшити розчинність і/або фізичну стабільність білка або іншого інгредієнта композиції відповідно до даного винаходу.

Як відомо, іони можуть стабілізувати нативний стан білків шляхом сполучення із зарядженими залишками на поверхні білка та екрануванням заряджених і полярних груп у білку, а також зменшуючи силу їх електростатичних взаємодій, притягання та відштовхування. Іони також можуть стабілізувати стан денатурованого білка шляхом сполучення, зокрема, з денатурованими пептидними зв'язками (--CONH) білка. Крім того, іонна взаємодія із зарядженими і полярними групами у білку може також зменшувати міжмолекулярні електростатичні взаємодії та тим самим запобігати або зменшувати агрегацію білка та нерозчинність.

Види іонів суттєво відрізняються за їхнім впливом на білки. Був розроблений ряд категоріальних рейтингів іонів і їх впливу на білки, які можуть бути використані у фармацевтичних композиціях відповідно до даного винаходу. Одним із прикладів є ряди Гофмейстера (ліотропні ряди), які ранжують іонні та полярні неіонні розчинені речовини за їхнім впливом на конформаційну стабільність білків у розчині. Стабілізуючі розчинені речовини називають "космотропними". Дестабілізуючі розчинені речовини називають "хаотропними". Космотропні речовини зазвичай використовуються при високих концентраціях (наприклад, >1 моля сульфату амонію), щоб осадити білки з розчину ("висалювання"). Хаотропні речовини зазвичай використовуються для денатурування та/або для розчинення білків ("всалювання"). Відносна ефективність іонів в ефектах "висалювання" та "всалювання" визначає їхнє положення в рядах Гофмейстера.

Вільні амінокислоти можуть бути використані в композиціях сполучних антиген CD27L білків відповідно до різних варіантів здійснення даного винаходу як наповнювачі, стабілізатори та антиоксиданти, а також для інших стандартних застосувань. Лізин, пролін, серин й аланін і можуть бути використані для стабілізації білків у композиції. Гліцин корисний при ліофілізації для забезпечення правильної структури та властивостей сухого залишку. Аргінін може бути корисний для інгібування агрегації білка як у рідких, так і в ліофілізованих композиціях. Метіонін є корисним як антиоксидант.

Поліолі включають цукри, наприклад, маннітол, сахарозу та сорбіт, а також багатоатомні спирти, такі як, наприклад, гліцерин і пропіленгліколь, і, для цілей обговорення в даному описі, поліетиленгліколь (ПЕГ) і похідні речовини. Поліолі є космотропними речовинами. Вони є корисними стабілізуючими агентами як у рідких, так і в ліофілізованих композиціях для захисту білка від фізико-хімічних процесів деградації. Поліолі також корисні для регулювання тоничності композицій.

Серед поліолів, маннітол є корисним у деяких варіантах здійснення даного винаходу та зазвичай використовується, щоб забезпечити структурну стабільність сухого залишку в ліофілізованих композиціях. Це забезпечує структурну стійкість сухого залишку. Він зазвичай використовується з ліопротекторами, наприклад, із сахарозою. Сорбіт і сахароза є переважними агентами для коректування тоничності та як стабілізатори для захисту від впливів при процесах заморожування-відтаювання під час транспортування або при підготовці великих об'ємів під час виробничого процесу. Відновлюючі цукри (які містять вільні альдегідні або кетонні групи), такі як глюкоза та лактоза, можуть зв'язуватися із залишками лізину та аргініну на поверхні білка. Таким чином, вони зазвичай не входять у коло переважних поліолів для використання відповідно до даного винаходу. Крім того, цукри, які утворюють такі активні форми, такі як сахароза, і які зазнають гідролізу на фруктозу та глюкозу в кислих умовах, і, отже, призводять до утворення ковалентного зв'язку, також не входять у коло переважних поліолів згідно з даним винаходом. ПЕГ корисний для стабілізації білків і як кріопротектор, і може бути використаний у даному винаході, як поліол.

Варіанти композицій сполучного антиген CD27L білка можуть додатково містити поверхнево-активні речовини. Молекули білка можуть бути сприйнятливі до адсорбції на поверхні, а також до денатурації та наступного агрегування на межі розділу фаз повітря-рідина, твердої та рідкої фаз і рідина-рідина. Ці ефекти зазвичай проявляються в залежності, зворотній концентрації білка. Ці небажані взаємодії зазвичай проявляються в залежності, зворотній від концентрації білка, і, як правило, ускладнюються фізичним перемішуванням, наприклад, що відбувається під час доставки та обробки продукту.

Поверхнево-активні речовини зазвичай використовуються для запобігання, мінімізації або зниження поверхневої адсорбції. Корисні у цьому відношенні поверхнево-активні речовини згідно з даним винаходом включають полісорбат 20, полісорбат 80, інші складні ефіри жирних кислот і поліетоксилатів сорбітану, а також полуксамер 188.

Поверхнево-активні речовини також широко використовуються для контролю за конформаційною стабільністю білка. Використання поверхнево-активних речовин у цьому відношенні є білок-специфічним, оскільки, будь-яка поверхнево-активна речовина зазвичай стабілізує одні білки та дестабілізує інші.

Полісорбати чутливі до окислювальної деградації та часто, у тому вигляді, в якому поставляються, містять значну кількість пероксидів, що може викликати окислення білкових залишків бічних ланцюгів, особливо метіоніну. Отже, полісорбати слід використовувати обережно, і якщо вони використовуються, повинні бути використані їх найбільш низькі ефективні концентрації. У зв'язку з цим, полісорбати ілюструють загальне правило, що слід використовувати найбільш низькі ефективні концентрації наповнювачів.

Варіанти здійснення композицій сполучних антиген CD27L білків можуть додатково містити один або більше антиоксидантів. До деякої міри небажане окислення білків може бути відвернене у

фармацевтичних препаратах шляхом підтримки належного рівня навколишнього кисню та температури, а також захистом від впливу світла. Також для запобігання окислювальної деградації білків можуть бути використані антиоксидантні наповнювачі. Серед придатних у цьому відношенні антиоксидантів є відновники, пастки кисню/вільних радикалів, а також

хелатуючі агенти. Антиоксиданти для застосування в терапевтичних препаратах білка відповідно до даного винаходу переважно є водорозчинними та підтримують свою активність протягом усього терміну придатності продукту. ЕДТА є переважним у цьому відношенні антиоксидантом відповідно до даного винаходу.

Антиоксиданти можуть ушкоджувати білки. Наприклад, відновлюючі агенти, такі як зокрема глутатіон, можуть руйнувати внутрішньомолекулярні дисульфідні зв'язки. Таким чином, антиоксиданти для застосування в даному винаході вибирають так, щоб, серед іншого, усунути або значно зменшити можливість ушкодження самих білків у зазначеній композиції.

Композиції відповідно до даного винаходу можуть включати іони металу, які є кофакторами білків і які необхідні для утворення координаційних комплексів білків, наприклад, іони цинку, необхідного для формування певних суспензій інсуліну. Іони металів також можуть інгібувати деякі процеси, які призводять до деградації білків. Проте, іони металів також каталізують фізичні та хімічні процеси, які призводять до деградації білків.

Іони магнію (10-120 мМ) можуть бути використані для інгібування ізомеризації аспарагінової кислоти в ізоаспарагінову кислоту. Іони  $\text{Ca}^{+2}$  (до 100 мМ) можуть підвищувати стійкість дезоксирибонуклеази людини. Однак  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  можуть дестабілізувати рЧДНаза. Аналогічним чином,  $\text{Ca}^{+2}$  і  $\text{Sr}^{+2}$  можуть стабілізувати фактор VIII, але він може бути дестабілізований  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  і  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  і  $\text{Fe}^{+2}$ , а його агрегація може бути посилена присутністю іонів  $\text{Al}^{+3}$ .

Варіанти реалізації композицій сполучних антиген CD27L білків додатково можуть містити один або декілька консервантів. Консерванти необхідні при розробці парентеральних препаратів із декількома дозами композиції, які мають на увазі витягання більше ніж однієї дози з того самого контейнера. Їхня основна функція полягає у придушенні росту мікроорганізмів і забезпечені стерильності продукту протягом усього терміну придатності або терміну використання лікарського продукту. Зазвичай використовувані консерванти включають бензиловий спирт, фенол і м-крезол. Хоча консерванти мають довгу історію використання з парентеральними препаратами низькомолекулярних сполук, розробка композицій білків, які включають в себе консерванти, може виявитися непростим завданням. Консерванти майже завжди роблять дестабілізуючий вплив (агрегація) на білки, і це стало одним із основних факторів, який обмежує їхнє використання в композиціях білків із декількома дозами. На сьогоднішній день більшість препаратів білків готують тільки для одноразового використання. Однак, коли можливе отримання композиції з множиною доз, такі композиції мають додаткові переваги, забезпечуючи певну зручність для пацієнта та маючи підвищену конкурентоздатність. Гарним прикладом є гормон росту людини (HGH), коли розробка композицій з консервантами призвела до комерціалізації більш зручних лікарських форм для ін'єкцій для багаторазового використання у вигляді ручки. Принаймні, чотири види таких пристроїв у вигляді ручки, які містять композиції HGH з консервантом, у цей час доступні на ринку. Нордитропін (рідина, Novo Nordisk), Nutropin AQ (рідина, Genentech) і Генотропін (ліофілізат - картридж із двома відсіками, Pharmacia & Upjohn) містять фенол, у той час як Somatropе (Eli Lilly) приготовлюється з метакрезолом.

Деякі аспекти повинні бути враховані при приготуванні та розробці лікарських форм із консервантами. Ефективна концентрація консерванту в лікарському продукті повинна бути оптимізована. Це вимагає тестування даного консерванту в лікарській формі в діапазонах концентрацій, які надають антимікробну ефективність без шкоди для стабільності білка.

Як і слід було очікувати, розробка рідких композицій, які містять консерванти, є більш складною, ніж розробка ліофілізованих композицій. Сублімовані продукти можуть бути ліофілізовані без консерванту та відновлені під час використання розріджувачем, що містить консервант. Це скорочує час, протягом якого консервант знаходиться в контакті з білком, суттєво мінімізує ризики, сполучені зі стабільністю. У рідких складах ефективність та стабільність консерванту повинна підтримуватися протягом всього терміну зберігання продукту (від близько 18 до 24 місяців). Важливо відзначити, що ефективність консерванту повинна бути продемонстрована в кінцевій композиції, що містить активний препарат і всі компоненти наповнювача.

Композиції сполучних антиген CD27L білків будуть головним чином призначені для конкретних шляхів і способів введення, для конкретних дозувань та частоти введення, для конкретних терапій конкретних захворювань з діапазонами біодоступності та персистенції, серед іншого. Таким чином, можуть бути розроблені композиції відповідно до даного винаходу для доставки будь-яким придатним способом, включаючи, оральний, через вуха, очі, ректальний, вагінальний

та парентеральний шлях, включаючи внутрішньовенні та внутрішньоартеріальні ін'єкції, внутрішньом'язові ін'єкції та підшкірні ін'єкції, але не обмежуються ними.

Після того, як фармацевтична композиція складена, її можна зберігати в стерильних флаконах у вигляді розчину, суспензії, гелю, емульсії, твердої речовини, кристалу, або у вигляді дегідратованого або ліофілізованого порошку. Такі препарати можуть зберігатися або у готовій до вживання формі, або у формі (наприклад, ліофілізованій), яка відновлюється перед введенням. Даний винахід також відноситься до наборів для отримання дози для одноразового прийому. Кожний з наборів згідно з даним винаходом може містити перший контейнер, що містить сухий білок, і другий контейнер, що містить водну композицію. У деяких варіантах здійснення даного винаходу надаються набори, які містять одно- та багатокамерні попередньо заповнені шприци (наприклад, шприци з рідинами та шприци з ліофілізатом).

Фармацевтичні композиції, які містять терапевтично ефективну кількість сполучного антиген CD27L білка, будуть залежати, наприклад, від терапевтичного контексту та цілей. Фахівцю в даній області техніки буде зрозуміло, що відповідні рівні доз для лікування можуть варіюватися, частково, залежно від молекули, що вводиться, вказівка на яку використовується у відношенні сполучного антиген CD27L білка, шляху введення, а також розміру (маси тіла, поверхні тіла або розміру органа) та/або стану (вік і загальний стан здоров'я) пацієнта. У деяких варіантах здійснення даного винаходу, клініцист може титрувати дозу та модифікувати спосіб введення для отримання оптимального терапевтичного ефекту. Звичайна доза може варіюватися від приблизно 0,1 мкг/кг до приблизно 30 мг/кг або більше, залежно від вищезгаданих факторів. У конкретних варіантах здійснення даного винаходу, доза може варіюватися від 1,0 мкг/кг до приблизно 20 мг/кг, необов'язково, від 10 мкг/кг до приблизно 10 мг/кг або від 100 мкг/кг до приблизно 5 мг/кг.

Терапевтично ефективна кількість сполучного антиген CD27L білка переважно призводить до зменшення вираженості симптомів захворювання, у збільшенні частоти або тривалості безсимптомних періодів захворювання або профілактики порушень або інвалідності в результаті пригнічення захворювання. Для лікування пухлин, які експресують CD27L, терапевтично ефективна кількість сполучного антиген CD27L білка, наприклад, анти-CD27L кон'югат, переважно інгібує ріст клітин або ріст пухлини щонайменше на приблизно 20 %, щонайменше, приблизно 40 %, щонайменше, приблизно 50 %, щонайменше, приблизно 60 %, щонайменше, приблизно 70 %, щонайменше, приблизно 80 %, або принаймні приблизно на 90 % у порівнянні з пацієнтами, які не піддавались лікуванню. Здатність сполуки з інгібування росту пухлини може бути оцінена на тваринах у моделі, що прогнозує ефективність у пухлинах людини.

Фармацевтичні композиції можуть бути введені за допомогою медичного пристрою. Приклади медичних пристроїв для введення фармацевтичних композицій описані у патентах США №№ 4,475,196; 4,439,196; 4,447,224; 4,447,233; 4,486,194; 4,487,603; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 5,064,413; 5,312,335; 5,312,335; 5,383,851; і 5,399,163, включених у даний опис за допомогою посилання.

Способи діагностики або лікування асоційованих із CD27L захворювань або порушень - Сполучні антиген CD27L білки згідно з даним винаходом особливо корисні для детектування CD27L у біологічному зразку. У деяких варіантах реалізації біологічний зразок, взятий у пацієнта, приводять у контакт із сполучним антиген CD27L білком. Потім детектують сполучення сполучного антиген CD27L білка з CD27L для визначення присутності відносної кількості CD27L у зразку. Такі способи можна застосовувати для діагностики або визначення пацієнтів, які підлягають лікуванню сполучним антиген CD27L білком, наприклад, анти-CD27L кон'югатом антитіло-лікарська сполука (ADC).

У деяких варіантах реалізації сполучний антиген CD27L білок згідно з даним винаходом використовують для діагностики, виявлення або лікування аутоімунного або запального порушення. При лікуванні аутоімунних або запальних порушень сполучний антиген CD27L білок може бути націлений на експресуючі CD27L клітини імунної системи для їхнього руйнування та/або може блокувати взаємодію CD27L з рецептором CD27.

Вважається, що взаємодія CD27L з CD27 відіграє деяку роль у клітинних аутоімунних захворюваннях, таких як експериментальний аутоімунний енцефаломієліт (ЕАЕ) (Nakajima et al. (2000) J. Neuroimmunol. 109:188-96). Вважається, що цей ефект здійснюється частково за рахунок інгібування продукції ФНО-альфа. Крім того, блокування передачі сигналу CD27L інгібує CD40-опосередковане клональне розмноження CD8+Т-клітин і знижує вироблення CD8+Т-лімфоцитів пам'яті (Taraban et al. (2004) J. Immunol. 173:6542-6). Відповідно, сполучні антиген CD27L білки можна застосовувати для лікування суб'єкта з аутоімунним порушенням, наприклад, з порушенням, яке характеризується присутністю В-клітин, що експресують CD27L,

включаючи, наприклад, експериментальний аутоімунний енцефаломієліт. Додаткові аутоімунні порушення, при яких можна застосовувати розкриті тут антитіла, включають, але не обмежуються перерахованими: системну червону вовчанку (СЧВ), інсулінозалежний цукровий діабет (IDDM), запальну хворобу кишечника (ЗХК, IBD) (включаючи хворобу Крона, виразковий коліт і целиацію), розсіяний склероз (РС), псоріаз, аутоімунний тироїдит, ревматоїдний артрит (РА) і гломерулонефрит. Крім того, композиції сполучного антиген CD27L білка згідно з даним описом можуть застосовуватися для пригнічування або запобігання відторгнення трансплантата або в лікуванні хвороби трансплантат проти хазяїна (GVHD).

Додатково, було висловлене припущення, що взаємодія CD27L з CD27 відіграє роль у передачі сигналу CD4+Т-клітини. Показано, що деякі віруси здійснюють сигналінг за шляхом CD27, викликаючи порушення відповіді нейтралізуючих антитіл. (Matter et al. (2006) J Exp Med 203:2145-55). Відповідно, композиції сполучного антиген CD27L білка та способи згідно з даним описом можна застосовувати для лікування суб'єкта з вірусною інфекцією, включаючи, наприклад, інфекції, викликані вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ), гепатиту (А, В, & С), герпесвірусами, (наприклад, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II і CMV (ЦМВ), вірус Епштейна-Барр), аденовірусом, вірусом грипу, флавівірусами, кишковими ЕCHO-вірусами, риновірусами, вірусом Коксакі, кроновірусом, респіраторно-синцитіальним вірусом, вірусом епідемічного паротиту, ротавірусом, вірусом кору, вірусом краснухи, парвовірусом, вірусом коров'ячої віспи, Т-лімфотропним вірусом людини (HTLV), вірусом денге, папіломавірусом, вірусом молюска, поліовірусом, вірусом сказу, поліомавірусом (JC) і вірусом арбовірусного енцефаліту та вірусом лімфоцитарного хориомеїнігіту (LCMV), або в лікуванні ВІЛ-інфекції/СНІД. Додатково, людські антитіла, композиції антитіл і способи згідно з даним винаходом можна застосовувати для інгібування продукції ФНО-а.

У деяких варіантах реалізації сполучний антиген CD27L білок згідно з даним винаходом застосовують для діагностики, виявлення або лікування раку або пухлинного захворювання. Пухлини та раки, які підлягають лікуванню згідно з даним винаходом, де клітини пухлини або ракові клітини можливо експресують CD27L включають, але не обмежуються перерахованими: нирковоклітинні карциноми (НKK), такі як світлоклітинна НKK, папілярна НKK, хромофобна НKK і т.п., гліобластоми, карциноми голови та шиї (наприклад, плоскоклітинні карциноми (HNSCC) і т.п.), рак молочної залози, пухлини мозку, назофарингеальні карциноми, не-ходжкінську лімфому (НХЛ), таку як НХЛ низького ступеня, дифузійна великоклітинна НХЛ і т.п., гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ, ALL), такий як пре-В гострий лімфобластний лейкоз, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ, CLL або В-CLL), Лімфому Беркїтта, анапластичні великоклітинні лімфоми (ALCL), множинні мієломи, Т-клітинні лімфоми шкіри, вузликові дрібноклітинні лімфоми з розсіченими ядрами, лімфоцитарні лімфоми, периферичні Т-клітинні лімфоми, лімфоми Ленерта, імунобластні лімфоми, Т-клітинний лейкоз/лімфому (ATLL), Т-клітинний лейкоз дорослих (Т-ALL), ентробластну/центроцитарну (cb/cc) фолікулярну злоякісну лімфому, дифузійні великоклітинні лімфоми В-клітин, Т-клітинну лімфому за типом ангіоімунобластної лімфаденопатії (AILD), асоційовані з ВІЛ лімфоми черевної порожнини, ембріональні карциноми, недиференційовані карциноми носоглотки (наприклад, пухлина Шмінке), Хвороба Кастлемана, саркому Капоші, множинні мієломи, макроглобулінемію Вальденстрема та інші В-клітинні лімфоми. Додаткові типи пухлин, які підходять для лікування згідно з даним винаходом, включають пухлини: нирки, підшлункової залози, глотки або гортані, меланоми, пухлини яєчника, аденокарциному легені, пухлини товстої кишки, молочної залози, мозку і т.п.

#### ПРИКЛАДИ

Наведені нижче приклади, як практичні, так і теоретичні, наведені з метою ілюстрації конкретних варіантів реалізації й ознак винаходу та призначені для обмеження обсягу.

Приклад 1 - Повністю людські моноклональні антитіла проти CD27L

Отримання повністю людських антитіл, спрямованих проти CD27L людини, здійснювали з використанням технології XENOMOUSE® (Патенти США №№ 6 114 598; 6 162 963; 6 833 268; 7 049 426; 7 064 244, які повністю включені в даний опис за посиланням; Green et al., 1994, Nature Genetics 7:13-21; Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15:146-156; Green і Jakobovitis, 1998, J. Ex. Med. 188:483-495).

Мишей XENOMOUSE®, які продукують IgG1, IgG2 та IgG4, імунізували/стимулювали розчинним людським п CD27L або людським CD27L, рекомбінантно експресованим на поверхні клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO). З імунізованих мишей отримували гібридами. Супернатанти гібридом піддавали скринінгу на сполучення з клітинами 293, які експресують CD27L людини. Більше 260 продемонстрували позитивний результат зі сполучення.

Позитивні супернатанти скринували на сполучення з нативним CD27L на поверхні клітин Raji та/або 786-0. В аналізі сполучення з нативним CD27L виявили 161 позитивний супернатант.

- Ці супернатанти досліджували на перехресну реактивність з CD27L яванського макака. Двадцять п'ять супернатантів були позитивними за перехресною реактивністю з CD27L яванського макака. Ці двадцять п'ять досліджували на активність K3Ц та здатність блокувати сполучення людського CD27 з людським CD27L. Дев'ятнадцять супернатантів були
- 5 позитивними з активності та з інгібування сполучення CD27 з CD27L. Субклонування та секвенування 13 ліній IgG1 і 6 ліній IgG4 виявило 7 унікальних антитіл IgG1 (Ab1-Ab7) і 1 унікальне антитіло IgG4 (Ab8).
- Резюме характеристик цих восьми антитіл, а також химерних варіантів комерційних антитіл миші до людського CD27L наведені на ФІГ. 1.
- 10 Афінність
- Афінність до рекомбінантного розчинного CD27L людини визначали з використанням чипа CM5 на приладі BIAcore 3000. Антитіло кози до IgG людини використовували для іммобілізації досліджуваного антитіла. Сполучення та дисоціацію міченого гістидином розчинного CD27L людини вимірювали для визначення  $K_a$ ,  $K_d$  і  $K_D$ . Використовували наступні умови:
- 15 Температура=25 °C  
Швидкість потоку=50 мкл/хв.  
Рухомий буфер=HBS-EP  
Регенерація з використанням 10 mM гліцину, pH 1,5  
Діапазон концентрація Hu CD27L-his становив 200 nM → 0,217 nM
- 20 Модель апроксимації (Scrubber2): 1:1 сполучення + локальний Rmax  
5-хвилинна асоціація та 25-хвилинна дисоціація  
Активність АЗКЦ
- Аналіз АЗКЦ здійснювали у стерильних 96-ямкових круглодонних планшетах для культур тканин (Corning). Антитіла титрували від 20 мкг/мл до 0,0002 мкг/мл шляхом внесення 10 мкл в 100 мкл повного середовища RPMI, що містить 10 % ФБС (розведення 1:10). Додавали мічення кальцеїном мішені, 50 мкл із розрахунку 10 000 клітин. Клітини-мішені та різні концентрації антитіла інкубували протягом 40 хвилин при 4 °C, потім додавали ефекторні НК-клітини, 50 мкл, що містять 200 000 клітин. Культури інкубували протягом 4 при 37 °C, після чого поєднували супернатанти та досліджували на вивільнення кальцеїну шляхом вимірювання флуоресценції
- 25 на довжині хвилі 485-535 на приладі Wallac Victor II 1420 Multilable HTS. Значення 100 % лізису визначали за лізисом у шести ямках, які містять мічені кальцеїном мішені Raji з детергентом Igepal 630 (3 мкл на ямку), а значення спонтанного лізису визначали шляхом вимірювання флуоресценції в ямках, які містять тільки мішень.
- Відсоток (%) специфічного лізису визначали як (флуоресценція зразка) - (флуоресценція спонтанного лізису)/(100 % лізис - флуоресценція спонтанного лізису). Неопрацьовані дані вводили у таблицю Excel з формулою для розрахунку % специфічного лізису та отримані значення переносили у графічну програму (GraphPad Prism), яка перетворювала ці дані в графік апроксимуючої сигмоїдної кривої. Наступний аналіз (розрахунку по моделі лінійної регресії) здійснювали у програмі GraphPad, у результаті отримували значення EC<sub>50</sub>.
- 35 Активність АЗКФ
- Моноцити шляхом негативної селекції виділяли з периферичної крові людини та витримували в холодному приміщенні при 4 °C протягом ночі зі середовищем RPMI 1640, що містить 10 % ФБС. Потім моноцити висівали у 48-ямкові планшети для культур тканин у кількості 200 000 клітин на ямку з 200 мкл ростового середовища (RPMI 1640, що містить 10 % ФБС і 40 нг/мл Hu M-CSF (колонієстимулюючого фактора макрофагів людини) та інкубували при 37 °C з 5 % CO<sub>2</sub> протягом 6, щоб дати можливість моноцитам диференціюватися в макрофаги.
- 45 У день 6 проводили аналіз АЗКФ наступним чином:
1. Мітять клітини-мішені зеленим барвником RKN67 у кінцевій концентрації  $2 \times 10^{-6}$  М барвника RKN67
- 50 - Клітини пухлини збирають та промивають один раз ФБР шляхом центрифугування клітин (400 'g) протягом 5 хвилин.
- Після центрифугування клітин акуратно видаляють супернатант аспірацією, залишаючи не більше 25 мл супернатанта.
- 4 мкл розчину барвника RKN67 в етанолі у вихідній концентрації  $4 \times 10^{-6}$  М додають до 1 мл розріджувача Diluent C з набору в поліетиленовій пробірці та добре перемішують.
- 55 - Клітинні опади ресуспендують в 1 мл розріджувача Diluent C при щільності  $20 \times 10^6$  у поліетиленовій пробірці.
- Клітини швидко переносять у робочий розчин барвника, акуратно піпетуючи для забезпечення повного диспергування.
- 60 - Суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 4 хвилин, періодично перемішуючи.

- До клітин додавали два мл цільної активованої ФБС для зупинки забарвлення та інкубували при кімнатній температурі протягом 1, щоб забезпечити сполучення надлишку.  
 - У клітини додавали сорок мл RPMI, що містить 10 % ФБС, і один раз промивали шляхом центрифугування клітин (400 ´ g) протягом 10 хвилин.

5 - Клітинні опади знову суспендували у 40 середовища та переносили у нову пробірку.  
 - Клітини знову промивали тричі середовищем RPMI+10 % ФБС і один раз повним ростовим середовищем 1x (RPMI 1640, що містить 10 % ФБС і 40 нг/мл Ну М-CSF).  
 - Клітини підраховували та суспендували ростовим середовищем у кількості 1 × 10<sup>6</sup> клітин на мл з отриманням відношення Т:Е (мішень:ефектор) 1:2.

10 2. Обробка клітин пухлини антитілами для антитілозалежного клітинного фагоцитозу (АЗКФ)  
 - Готували розведення антитіл у середовищі для вирощування макрофагів. Ці розведення концентрували до 4 х кінцевої концентрації.

- До преінкубованої суміші клітин, мічених РНК67 зеленим, з антитілами 280 мкл 4х концентрованих антитіл змішували з 280 мкл мічених зеленим пухлинних клітин та інкубували при 4 °C протягом 30 хвилин.

15 - Суміш мічених зеленим пухлинних клітин із протипухлинними антитілами додавали до макрофагів у 48-ямковому планшеті в кількості 200 мкл на кожну ямку згідно зі схемою експерименту, описаною нижче. Кінцевий об'єм становить 0,4 мл на ямку. Співвідношення клітин-мішеней до ефекторних клітин (макрофагів) становить 1:2.

20 - Клітини інкубували при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> протягом однієї години.

3. Протизабарвлення макрофагів маркером макрофагів

25 - Клітини-мішені та макрофаги у 48-ямковому планшеті відкріплювали сумішшю трипсин-версен.  
 - Клітини переносили у 96-ямковий блок в об'ємі 2,2-мл на ямку та одноразово промивали підігрітим промивальним розчином для FACS шляхом кручення блоків при 400 ´ g протягом 5 хвилин, після чого супернатанти викидали.

- Макрофаги забарвлювали з маркером, CD11b-біотин у розведенні 1:200 у блокувальному розчині з 100 мкл на ямку протягом 10 хв на льоді.

- Після одноразового промивання клітин макрофаги детектували стрептавідином Alexa 568 у розведеннях 1:1000 протягом 10 на льоді.

30 - Після одноразового промивання клітин фосфатно-буферним розчином клітини фіксували у 4 % формальдегіді-ФБР при кімнатній температурі протягом 20 хвилин. Потім клітини одноразово промивали dH<sub>2</sub>O.

- Клітинні опади ресуспендували водою в кількості 200 мкл на ямку та переносили у 96-ямковий планшет в об'ємі 100 мкл на ямку.

35 4. Кількісне вимірювання активності фагоцитозу на рідері ArrayScan VTI HCS (версія 6, Cellomics Inc. Thermo FisherScientific, Pittsburgh, PA, США) з додатком Target Activation BioApplication із застосуванням 20х об'єктива. Настроювання фільтра показані в Таблиці 2. У кожній ямці було виявлено щонайменше 200 клітин.

40

Таблиця 2

Канал	Мішень	Мітка	Флюоресценція
1	макрофаги	Ms-анти-Ну CD11b Бітин→стрептавідин Alexa 568	червона
2	Пухлинні клітини	РНК67	зелена

Статистичний аналіз здійснювали з використання програми Prism 4.01 (GraphPad, San Diego, CA, США). На графіку показаний % фагоцитозу пухлинних клітин від логарифма концентрації антитіла в нг/мл. Відсоток фагоцитозу пухлинних клітин представлений як відсоток пухлинних клітин, які перекривалися з макрофагами, до загальної кількості макрофагів у вибраному полі та отриманий за функцією вимірювань рідера ArrayScan reader "%ObjectCounts". Значення у % виражені як середнє +/- стандартна помилка середнього (SEM) для вимірювання у двох повторях (n=2). EC<sub>50</sub> визначали з використанням нелінійної регресії (апроксимація кривої) з наступним застосуванням рівняння сигмоїдної кривої доза-відповідь. Дані нормували за максимальним і мінімальним сигналом та апроксимували симоїдною кривою доза-відповідь.

Активність КЗЦ

Проліферація пухлинних клітин: Клітини Raji один раз промивали аналітичним середовищем і ресуспендували в аналітичному середовищі (RPMI 1640 плюс 1 % ФБС). Клітини висівали у 96-ямковий планшет для культур тканин в об'ємі 50 мкл на ямку при двох значеннях щільності клітин для людського та кролячого компліментів. Для комплементу кролика щільність клітин становила  $5 \times 10^4$  клітин на ямку. Для комплементу людини щільність клітин становила  $2 \times 10^5$  клітин на ямку.

Обробка клітин комплементом і досліджуванним: 3х концентрований комплемент готували в аналітичному середовищі, як показано в Таблиці 3. Потім їх додавали до клітин у планшетах в об'ємі 50 мкл на ямку. Для клітин, оброблюваних комплементом кролика, концентрація комплементу кролика становила 10 %; для клітин, оброблюваних комплементом людини, концентрація комплементу людини становила 20 %.

Таблиця 3

Приготування 3х концентрованого комплементу  
в аналітичному середовищі (RPMI 1640+1 %ФБС)

3х Комплемент	Комплемент (мл)	Аналітичне середовище (мл)	Загальний об'єм (мл)
30 % HI C' кролика (неактивний)	0,5	1,16	1,66
30 % без HI C' кролика (активний)	2,5	5,83	8,33
60 % HI C' людини (неактивний)	0,5	0,33	0,83
60 % без HI C' людини (активний)	3	2,0	5,0

Досліджувані антитіла в концентрації 10 мкг/мл додавали до клітин в об'ємі 50 мкл на ямку. Загальний об'єм у кожній ямці на початку культивування становив 150 мкл. Клітини безупинно інкубували при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> протягом однієї години для клітин, оброблюваних комплементом кролика та 6 годин для клітин, оброблюваних комплементом людини.

Вимірювання цитотоксичності на планшетному рідері ArrayScan: Після інкубації видаляли 50 мкл середовища з кожної ямки. Суміш Hoechst 33342 і пропідія йодиду (PI), яку готували при розведенні 1:1000 у розчині ФБР, що містить 2 % ФБС, додавали до клітин в об'ємі 100 мкл на ямку. Клітини, оброблені комплементом людини, переносили у новий 96-ямковий планшет в об'ємі 40 мкл на ямку після акуратного перемішування. Зразки досліджували на рідері ArrayScan V<sup>TI</sup> HCS (версія 6, Cellomics, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, США) з BioApplication "Target Activation" з 20х об'єктивом. Настроювання фільтра зазначені в Таблиці 4. В кожній ямці нараховували щонайменше 200 клітин.

Таблиця 4

Канал	Мішень	Мітка	Флуоресценція	Фільтр
1	Нуклеїнова кислота для всіх клітин	Hoechst 33342	УФ/460 нм	DAPI
2	Нуклеїнова кислота для всіх клітин	Пропідія йодид	488/>575 нм	TRITC

Статистичний аналіз: Статистичний аналіз здійснювали з використанням ПО Prism 4.01 (GraphPad, San Diego, CA, США).

Час інтерналізації

Посів клітин: Клітини 786-0 висівали на 96-ямковий планшет у кількості 10 000 клітин на ямку з 100 мкл ростового середовища (RPMI, що містить 10 % ФБС) та інкубували при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> протягом 2 днів до досягнення 100 % конфлюентності клітин у день проведення аналізу. Клітини у планшеті досліджували на 1) інтерналізацію та 2) ендосомальну колокалізацію.

Забарвлювання клітин для визначення динаміки інтерналізації: Планшети промивали 1х аналітичним середовищем (ФБР, що містить 2 % ФБС). В ямки додавали антитіла в кількості 2 мкг/ямку (100 µL на ямку) в аналітичному середовищі. Антитілам людини дозволяли сполучатися з клітинами при 4 °C протягом 30, а потім промивали 1х аналітичним середовищем. Fab' до людського IgG Alexa 488 (1:100) і Hoechst 33342 (1:2000) додавали до



клітин в аналітичному середовищі при 4 °C протягом 20 хвилин. Потім клітини промивали 1x аналітичним середовищем. Потім клітини фіксували та пермеабілізували, починаючи з часу нуль, та інкубували 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> протягом 1, 3 або 5 годин. Після інкубації клітини фіксували та пермеабілізували у відповідності з наступною процедурою. Клітини промивали 1x промивним буфером BD, а потім в ямки додавали розчин у кількості 100 мкл на ямку. Аналіз зразків проводили на рідері ArrayScan V<sup>TI</sup> HCS (версія 6, Cellomics, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, США) з додатком BioApplication "Spot Detector" з використанням 40x об'єктива. Настроювання фільтра для інтерналізації наведені в Таблиці 5. У кожній ямці нараховували щонайменше 400 клітин.

Таблиця 5

Канал	Мішень	Мітка	Фільтр
1	Нуклеїнові кислоти для всіх клітин	Hoechst 33342	DAPI (синій)
2	Плями інтерналізації	Alexa 488	FITC (зелений)

Підрахунок і забарвлення клітин на спів-локалізацію антерналізованих плям у ранньому ендосомному компартменті: Після аналізу інтерналізації клітини 786-0 промивали 1x буфером BD. Клітини обробляли розчином Fix/perm при КТ протягом 20 хвилин. Після двох етапів промивання клітини інкубували з ЕЕА-1 у буфері BD при концентрації 0,5 мкг/мл (100 мкл/ямку) при КТ протягом 20 хвилин. Клітини промивали 1x буфером BD, до них додавали анти-мишачі Alexa 568 у розведенні 1:1000. Клітини інкубували при КТ протягом 20 хвилин, після чого проводили два етапи промивання буферним розчином BD.

Фотовізуалізація: Зображення клітин для дослідження інтерналізації та спів-локалізації отримували з використанням флуоресцентного мікроскопа Leica, приєднаного до цифрової камери Hamamatsu з ПО Openlab Image Analysis (Improvision Inc, Lexington, MA, США) або рідера ArrayScan V<sup>TI</sup> HCS.

Статистичний аналіз: Статистичний аналіз здійснювали з використанням ПО Prism 4.01 (GraphPad, San Diego, CA). Кількості плям виражали як середнє  $\pm$  стандартна помилка середнього (SEM) для вимірювань у двох повторях (n=2). З використанням аналітичного інструмента число плям в одиницю часу (швидкість апроксимації) апроксимували рівнянням однофазної експоненціальної асоціації.

Приклад 2 - Оцінка MCC-DM1-кон'югованих антитіл

Ab1, Ab2, Ab4, Ab7 і Ab8 кон'югували з MCC-DM1 (див. Фіг. 12). Цільовий рівень навантаження становив 4,5-5 одиниць лікарського засобу на антитіло. Коротко, лізини антитіла кон'югували зі складним NHS-ефіром гетеробіфункціонального зшиваючого агента сукцинімідил 4-[N-малеїмідометил]циклогексан-1-карбоксилату (SMCC), який містить складний NHS-ефір і малеїмід. Потім модифіковане зшиваючим агентом (лінкером) антитіло очищали від надлишку лінкера та кон'югували з головною частиною DM1 через присутній на DM1 сульфгідрил. Потім на другому етапі очищення надлишок DM1 видаляли з отриманням готового кон'югату Ab-MCC-DM1.

Зокрема, антитіло CD27L, транз'єнтно експресоване в культурі клітин ссавців клітинами 2936-E, завантажували на колонку MabSelect SuRe (GE Healthcare), урівноважену 25мМ Трис, 150мМ хлоридом натрію, pH 7,4. Потім колонку зі сполученим антитілом CD27L промивали в 3 етапи: спочатку здійснювали промивання рівноважним буфером; потім - 25мМ Tris, 500мМ L-аргініном, pH 7,5; і останнє промивання проводили рівноважним буфером. Антитіло CD27L елюювали 100мМ ацетатом натрію, pH 3,5. Фракції, які містять зазначене антитіло, поєднували, і pH доводили до кінцевого значення 5,0 із застосуванням 1М Tris, pH 8,0. Потім антитіло очищали на колонці Fractogel® EMD SO3-(M) (EMD Chemicals Inc), урівноважений 30мМ ацетатом натрію, pH 5,0. Сполучене антитіло елюювали градієнтом 8 CV від 0 до 0,8М хлориду натрію в 30мМ ацетаті натрію, pH 5,0. Фракції, які містять антитіло, поєднували та діалізували проти кон'югуючого буфера (2мМ ЕДТК, 50мМ хлорид натрію, 50мМ фосфат калію, pH 6,5).

Очищене антитіло CD27L модифікували аміно-реактивним лінкером сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилатом (SMCC) (Thermo Scientific) для введення тіол-реактивних малеїмідних груп. Зазначене антитіло в концентрації 55 мкМ обробляли 20 молярними еквівалентами SMCC у кон'югуючому буфері, доведеному до 10 % диметилацетаміду (в об'ємному відношенні) у готовій реакційній суміші. Після інкубування протягом 90 хвилин при кімнатній температурі реакційну суміш знесолювали на колонці для

знесолення HiPrep 26/10, що містить смоли Sephadex G-25 fine (GE Healthcare), урівноважений 2мМ ЕДТК, 150мМ хлоридом натрію, 35мМ цитратом натрію, рН 5,0. Фракції, які містять антитіло, поєднували та аналізували ступінь модифікації лінкером із застосуванням реактиву Елмана (5,5'-дитіо-біс-[2-нітробензойної кислоти]) відповідно до наведеного нижче опису.

5 Виявлено, що в середньому антитіло було модифіковане 7,5 maleimідними групами на антитіло. Реактив Елмана розщеплюється тіолами з утворенням продукту жовтого кольору з поглинанням при 412 нм. Для визначення числа maleimідних груп на антитілі CD27L після реакції з SMCC використовували субтрактивний аналіз за методом Елмана. Антитіло CD27L, модифіковане SMCC, або контрольний зразок буфера без антитіла інкубували з еквівалентною концентрацією тіолів, 0,4 мМ ДТТ (дитіотреїтол). Будь-які maleimіди, які присутні в зразку антитіла, будуть реагувати з тіолами ДТТ, обумовлюючи його недоступність для подальшої реакції з реактивом Елмана. Потім в обидва зразка додавали реактив Елмана та проводили кількісну колориметрію при 412 нм для визначення концентрації прореагуваного реактива Елмана. Зменшення концентрації тіолів у зразку антитіла у порівнянні з контрольним зразком пропорційно кількості maleimідів, присутніх у зразку антитіла. Зазначене значення використовували для визначення числа сполучених maleimідних груп на модифіковане антитіло CD27L.

Модифіковане SMCC антитіло CD27L (7,5 maleimідних груп на антитіло) у концентрації від 17 мкМ до 27 мкМ обробляли 1,7 молярними еквівалентами DM1 (Immunogen) на maleimідну групу, забуференими 2мМ ЕДТК, 150мМ NaCl, 35мМ цитратом натрію, рН 5,0, доведеному до 3 % DMA (за об'ємом) у готовій реакційній суміші. Реакційні суміші інкубували при кімнатній температурі протягом ночі протягом періоду тривалістю до 20 годин. Реакційну суміш завантажували на гель-фільтраційну колонку Superdex 200 (GE Healthcare), урівноважену 20мМ фосфатом натрію, 150 мМ хлоридом натрію, рН 6,5. Збирали фракції; фракції, які містили мономірне антитіло, поєднували та аналізували. Молярну концентрацію пов'язаних із антитілом молекул DM1 визначали шляхом вимірювання поглинання при 252 нм і 280 нм, і було виявлено, що вона становить 4,5-5,0 молекул DM1 на антитіло.

Фармакологія in vitro

Кон'югати лікарського засобу та антитіла (ADC) Ab4- і Ab8-MCC-DM1 демонстрували порівнянне сполучення нативного CD27L у порівнянні з некон'югованими варіантами за оцінкою за допомогою проточної цитометрії. При зв'язуванні Ab4 і Ab4-MCC-DM1 спостерігалися рівні EC<sub>50</sub>, тоді як для Ab8-MCC-DM1 у порівнянні з Ab8 відбувалося помірне 4-кратне зниження EC<sub>50</sub> (Таблиця 6). Більш точне вимірювання спорідненості до сполучення проводили для Ab4, Ab8 і їх кон'югованих варіантів шляхом вимірювання їх здатності зв'язувати нативний CD27L людини, експресований на клітинах Raji, із застосуванням технології Gyros. Результати свідчать, що обидва кон'югата проявляли субнаномольну спорідненість до CD27L у межах 2-кратної відмінності від спостережуваного для некон'югованих Ab4 і Ab8 (Таблиця 6). І некон'юговані, і кон'юговані Ab4 і Ab8 також демонстрували спорідненість до сполучення з розчинним CD27L-his людини в межах 2-кратної відмінності один від одного, згідно з оцінкою із застосуванням BIACORE.

Таблиця 6

Порівняння сполучення Ab4 і Ab8 і їх кон'югованих з MCC-DM1 варіантів

Вимірювання	Ab4	Ab4-MCC-DM1	Ab8	Ab8-MCC-DM1
Gyros K <sub>D</sub> – нативні CD27L-Raji	0,014 нМ	0,023 нМ	0,078 нМ	0,077 нМ
Сортування клітин із активацією флуоресценції (FACS) (EC <sub>50</sub> ) - клітини 786-0	0,1 нМ	0,1 нМ	0,02 нМ	0,08 нМ

Оцінювали інтерналізацію Ab4-MCC-DM1, Ab8-MCC-DM1, Ab4 і Ab8 клітинами CD27L-експресуючої лінії світлоклітинного раку нирки (ccRCC) людини 786-0. Експресуючі CD27L клітини 786-0 піддавали впливу некон'югованого антитіла людини проти CD27L Ab4 і Ab8, Ab4-MCC-DM1, Ab8-MCC-DM1, контрольного HulgG1 або контрольного  $\alpha$ SA-MCC-DM1, і залишали для сполучення при 4 °C. Інтерналізацію тестованих зразків оцінювали із застосуванням Fab'-фрагмента кози проти IgG людини Alexa 488 FluoroNanogold. Клітини фіксували та пермеабілізували у визначені моменти часу після інкубування з тестованими зразками (час=0, 1, 3 і 5 годин) і візуалізували із застосуванням рідера ArrayScan VTI HCS. Колокалізацію інтерналізованих тестованих зразків в ендосомі визначали із застосуванням антитіл проти EEA-1, маркера ендосом. Часозалежну інтерналізацію антитіл, у тому числі Ab4-MCC-DM1, спостерігали із застосуванням аналізу зображень у флуоресцентній мікроскопії з утворення точкових плям у цитоплазмі клітин при 37 °C при порівнянні з локалізацією в клітинній мембрані в нульовий момент часу при 4 °C. Ab4-MCC-DM1 колокалізується з маркером ендосом EEA-1 через 5 годин інкубування при 37 °C, що вказує на інтерналізацію Ab4-MCC-DM1 в ендосомний субклітинний компартмент клітин 786-0. Рівень та швидкість інтерналізації Ab4, Ab8 і їх кон'югованих варіантів знаходились в межах аналогічних діапазонів (Фіг. 2).

Ab4-MCC-DM1, і Ab8-MCC-DM1 демонстрували потужне специфічне пригнічування росту CD27L-експресуючих пухлинних клітин *in vitro*. При аналізі антипроліферації (пригнічування росту пухлини), Ab4-MCC-DM1, Ab8-MCC-DM1 або некон'юговані Ab4 або Ab8 проти CD27L інкубували з клітинами-мішенями, CD27L-експресуючими 786-0/люцифераза або CD27L-негативними H1650 у присутності/у відсутності некон'югованих ("naked") Ab4 або Ab8, відповідно, або контрольного HulgG1 протягом 4 днів. Обидві клітинні лінії, 786-0/люцифераза та H1650, висівали у 96-ямкові планшети для тканинних культур, що містять 100 мкл ростового середовища в кожній ямці, по 500 клітин 786-0/люцифераза на ямку та 1000 клітин H1650 на ямку. Всі планшети інкубували при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> протягом 4 годин. Після 4 годин інкубування до клітин додавали некон'юговані антитіла та кон'югати по 100 мкл на ямку в різних титрах. Загальний об'єм у кожній ямці на початку культивування становив 200 мкл. Клітини безперервно інкубували при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> протягом 4 днів до вимірювання клітинних рівнів АТФ. Для оцінки пригнічування росту клітин вимірювали рівні АТФ (в якості показника числа клітин) за допомогою аналізу люмінесценції із застосуванням набору CellTiter-Glo.

Ab4-MCC-DM1, і Ab8-MCC-DM1 пригнічували ріст CD27L-експресуючих клітин 786-0 у концентрації 50 % інгібування (IC<sub>50</sub>) згідно з представленими у Таблиці 7 даними. Пригнічування росту CD27L-негативних клітин H1650 при впливі Ab4-MCC-DM1 і Ab8-MCC-DM1 не спостерігалось. Додавання надлишку некон'югованого вихідного антитіла проти CD27L дозволяло блокувати опосередковане Ab4-MCC-DM1 пригнічування росту, підтверджуючи необхідність сполучення CD27L Ab4-MCC-DM1 для забезпечення активності. Некон'юговане вихідне антитіло проти CD27L не пригнічувало ріст CD27L-експресуючих клітин 786-0. Контрольний кон'югат, анти-стрептавідин-MCC-DM1 ( $\alpha$ SA-MCC-DM1), не демонстрував якогось пригнічування росту клітин ні CD27L-позитивної, ні CD27L-негативної лінії. Ці результати свідчать, що і Ab4-MCC-DM1, і Ab8-MCC-DM1 є потужними інгібіторами росту клітин 786-0 у порівнянні з контрольним кон'югатом (Фіг. 3). В Ab4-MCC-DM1 проявлялася тенденція до трохи більшої ефективності у порівнянні з Ab8-MCC-DM1 (Таблиця 7).

Таблиця 7

Ефективність кон'югатів анти-CD27L-MCC-DM1 у відношенні клітин

786-0-IC <sub>50</sub>	Ab4-MCC-DM1	Ab8-MCC-DM1
Конц-я лікарського засобу (нМ)	0,34	0,54
Конц-я антитіла (нМ)	0,07	0,11

Опосередкована Ab4-MCC-DM1 антитілозалежна клітинна цитотоксичність (АЗКЦ), спрямована проти клітин Raji з аналогічною ефективністю (EC<sub>50</sub>=0,006 мкг/мл), та її інтенсивність у порівнянні зі спостережуваною для некон'югованого вихідного антитіла проти CD27L Ab4 (EC<sub>50</sub>=0,01 мкг/мл). Коротко, природні кілери (НК-клітини), виділені з МКПК, отриманих із крові здорового донора-людини, інкубували з міченими кальцеїном клітинами-мішенями лімфоми В-

клітин людини лінії Raji (експресують CD27L) у присутності Ab4-MCC-DM1 або контрольних антитіл згідно з описом вище. Відсоток (%) специфічної цитотоксичності визначали шляхом вимірювання вивільнення кальцеїну з експресуючих CD27L клітин-мішеней, лізованих у присутності Ab4-MCC-DM1, у порівнянні з контрольними ямками. Результати, представлені на Фіг. 8, свідчать, що Ab4-MCC-DM1 забезпечує аналогічний опосередкованому антитілом Ab4 (значення EC50:0,006 і 0,01 мкг/мл, відповідно) рівень АЗКЦ. Контрольний hulgG1 не забезпечував якого-небудь вимірного лізису експресуючих CD27L клітин-мішеней. Як Ab4-MCC-DM1, так і некон'юговані антитіла Ab4 здатні індукувати подібні рівні опосередкованої НК-клітинами АЗКЦ для CD27L-специфічних мішеней. Аналогічні результати спостерігалися для Ab8-MCC-DM1 і некон'югованого антитіла Ab8.

Вимірювали активність *in vitro* антитілозалежного клітинного фагоцитозу (АЗКФ) Ab4-MCC-DM1 або некон'югованого вихідного антитіла Ab4 у відношенні як пухлинних клітин Raji, так і 786-0. Антитіло Ab4-MCC-DM1 забезпечувало подібний зі спостережуванним для некон'югованого вихідного антитіла Ab4 рівень комплемент-опосередкованого лізису. Коротко, макрофаги диференціювали з моноцитів, виділених із периферичної крові людини, отриманої від здорових донорів-людей. Макрофаги інкубували з міченими зеленим флуорохромом РНК67 експресуючими CD27L клітинами ліній 786-0 і Raji як клітини-мішені у присутності некон'югованого антитіла проти CD27L Ab4, hulgG1, Ab4-MCC-DM1, або контрольних антитіл ( $\alpha$ SA-MCC-DM1), згідно з описом вище. Відсоток (%) фагоцитозу пухлинних клітин визначали, виходячи з відсотка пухлинних клітин, які були поглинені макрофагами, від загального числа макрофагів у вибраних полях. Результати представлені на Фіг. 9 і свідчать про те, що Ab4-MCC-DM1 забезпечує аналогічну ефективність АЗКФ в експресуючих CD27L клітинних лініях 786-0 і Raji. Значення EC50 для некон'югованого Ab4 знаходились в межах 10-кратних значень, які спостерігалися для Ab4-MCC-DM1 (див. Таблицю 8).

Таблиця 8

	786-0	Raji
Ab	EC50 (nM)	EC50 (nM)
Ab4	0,008	0,008
Ab4-MCC-DM1	0,087	1,421

Враховуючи, що для побудови кривої розведення використовували інтервали розведення 1:40, спостережувані концентрації EC50 і для Ab4-MCC-DM1, і для некон'югованого Ab4 забезпечують подібну ефективність (у межах коефіцієнта розведення). Відповідно, і кон'юговані Ab4-MCC-DM1, і некон'юговані антитіла Ab4 дикого типу здатні індукувати подібні рівні АЗКФ макрофагів людини у відношенні експресуючих CD27L клітин. Аналогічні результати спостерігалися для Ab8-MCC-DM1 і некон'югованого антитіла Ab8.

Активність комплементзалежної цитотоксичності (КЗЦ) Ab4-MCC-DM1 *in vitro* оцінювали із застосуванням комплементу людини та кролика та CD27L-експресуючих пухлинних клітин Raji. У концентрації 10 мкг/мл Ab4-MCC-DM1 забезпечувало подібний зі спостережуванним для некон'югованого вихідного антитіла Ab4 рівень комплемент-опосередкованого лізису (комплемент кролика: 72 % лізис, комплемент людини: 17 % лізис). Коротко, активовані комплементи кролика або людини інкубували з експресуючими CD27L клітинами-мішенями Raji у присутності антитіл проти CD27L або контрольних антитіл згідно з описом вище. Опосередкований КЗЦ кілінг вимірювали із застосуванням вихідної функції рідера ArrayScan "% вибраних об'єктів" для виявлення % забарвлення PI:Hoechst для "% цитотоксичності". Результати свідчать про те, що Ab4-MCC-DM1 забезпечує рівні КЗЦ, подібні з опосередкованими антитілом Ab4 дикого типу, при інкубуванні пухлинних клітин Raji з 10 % комплементом дитинчати кролика або 20 % комплементом людини. Термоінативовані комплементи кролика або людини не виявляли здібності до опосередкованого КЗЦ кілінгу клітин Raji. Відповідно, як Ab4-MCC-DM1, так і некон'юговане Ab4 індукують подібний рівень КЗЦ-активності у відношенні експресуючих CD27L пухлинних клітин-мішеней. Аналогічні результати спостерігалися для Ab8-MCC-DM1 і некон'югованого антитіла Ab8.

Фармакологія *in vivo*

Пасеровані *in vivo* ccRCC-клітини 786-0 (786-0 S4) імплантували самкам мишей CB-17/SCID із застосуванням MATRIGEL зі зниженим вмістом факторів росту з отриманням пухлинних ксенотрансплантатів для досліджень ефективності. Клітини 786-0 S4 експресують у середньому приблизно 180 000 антигенів CD27L на клітину. Лікування Ab4-MCC-DM1 або Ab8-MCC-DM1

починали, коли розмір пухлин досягав у середньому приблизно 250 мм<sup>3</sup>. Тварин із пухлинами рандомізували за розміром пухлин у групи, які включали по десять тварин кожна, та дозували один раз внутрішньовенно. На зазначеній моделі розвиненої пухлини проводили засліплене дослідження залежності доза-ефект для Ab4-MCC-DM1 і Ab8-MCC-DM1 із застосуванням дозувань у діапазоні 7-64 мкг/кг DM1 (0,3-2,5 мг/кг Ab). Стійкий регрес пухлин спостерігався при низькому дозуванні DM1 7 мкг/кг, середньому дозуванні DM1 25 мкг/кг і високому дозуванні DM1 64 мкг/кг. При середньому та високому дозуваннях повний регрес зберігався протягом щонайменше 28 днів після введення однієї дози (Фіг. 4). У жодній з дозованих груп не спостерігалось втрати маси тіла протягом дослідження.

У ще одній демонстрації ефективності *in vivo* клітини ссRCC Caki-1, які експресують у середньому 59 000 CD27L на клітину (в 3 рази менше, ніж клітини 786-0) імплантували мишам CB-17/SCID згідно з описом вище. Коли ксенотрансплантати Caki-1 досягали розміру в середньому 250 мм<sup>3</sup>, тварин із пухлинами рандомізували у групи за розміром пухлин по 10 тварин кожна та дозували внутрішньовенно один раз на тиждень протягом 3-х тижнів (для більш точної імітації режиму щотижневого клінічного дозування). На зазначеній моделі розвиненої пухлини проводили засліплене дослідження залежності доза-ефект для Ab4-MCC-DM1 і Ab8-MCC-DM1 із застосуванням дозувань у діапазоні 60-270 мкг/кг DM1 (2,4-11 мг/кг Ab). Регрес пухлини вперше спостерігався при середньому дозуванні DM1 120 мкг/кг та високому дозуванні DM1 270 мкг/кг, тоді як пригнічування росту пухлини спостерігалось при низькому дозуванні DM1 60 мкг/кг у порівнянні з контрольним кон'югатом або основою. Із часом, у межах 7-ми днів після введення останньої дози, регрес пухлини у двох групах, які отримували більш високі дози, починає зменшуватися (Фіг. 5).

Як і клітини ссRCC, клітини В-клітинної лімфоми Raji експресують CD27L (приблизно 200 000 епітопів на клітину) та інтерналізують кон'югат лікарського засобу з антитілом проти CD27L, що призводить до мітотичного блоку та клітинної смерті *in vitro*. Ефективність Ab4-MCC-DM1 оцінювали у підшкірного ксенотрансплантата Raji. Коли ксенотрансплантати Raji досягали розміру в середньому 250 мм<sup>3</sup>, тварин із пухлинами рандомізували за розміром пухлин у групи по десять тварин кожна та дозували внутрішньовенно кожні 4 дня × 2 і потім протягом додаткового тижня одноразово, у цілому 3 дози (для більш точної імітації режиму щотижневого клінічного дозування). На зазначеній моделі розвиненої пухлини проводили засліплене дослідження залежності доза-ефект для Ab4-MCC-DM1 із застосуванням дозувань у діапазоні від 60-270 мкг/кг DM1 (2,4-11 мг/кг Ab). Пригнічування росту пухлини спостерігалось при всіх рівнях доз, з >90 % пригнічуванням росту пухлини, спостережуваним при середньому дозуванні DM1 120 мкг/кг та високому дозуванні DM1 270 мкг/кг під час періоду активного дозування з помірною протипухлинною відповіддю, спостережуваною при низькому дозуванні DM1 60 мкг/кг у порівнянні з контрольним кон'югатом (Фіг. 6). Наприкінці періоду вимірювання пухлин а у незначній більшості тварин у групах, які отримували середні та високі дози, спостерігався регрес пухлини, вказуючи на те, що подальша оптимізація доз і режиму може поліпшити відгук. Ефективність при різних інтервалах дозування контрольним кон'югатом αSA-MCC-DM1 або Ab4-MCC-DM1 оцінювали на моделі з ксенотрансплантатом 786-0. Мишам CB-17/SCID імплантували пухлинні клітини 786-0. На 13 день 50 тварин рандомізували у когорті по 10 тварин у кожній зі середнім об'ємом пухлини 200 мм<sup>3</sup>. У кожній когорті внутрішньочеревинно вводили дозу або контрольного кон'югату αSA-MCC-DM1, або Ab4-MCC-DM1. Об'єм пухлини представлений у вигляді середнього значення для групи ± стандартна похибка середнього (SEM). Оцінювали статистичну значимість спостережуваних відмінностей між кривими росту з 13 по 59 день із застосуванням коваріаційного аналізу повторних вимірювань (RMANOVA) логарифмізованих даних за об'ємами пухлин шляхом множинних порівнянь із застосуванням критерію Дуннетта. Значимість досягається при  $p < 0,05$ . Вводили три рівні дози Ab4-MCC-DM1 (1,0; 2,0; або 2,9 мг/кг Ab4-MCC-DM1 на основі антитіла, або 25, 50 або 75 мкг/кг на основі еквівалентів DM1, відповідно). Дозу 1,0 мг/кг вводили один раз на тиждень або одноразово кожні 2 тижні протягом 6 тижнів, дозу 2,0 мг/кг вводили одноразово кожні 2 тижні протягом 6 тижнів, а 2,9 мг/кг дозу вводили одноразово кожні 3 тижні протягом 6 тижнів. Тварин дозували внутрішньочеревинно, починаючи з 13 дня після інокуляції пухлини. До 59 дня проводили евтаназію тварин групи, яка отримувала лікування αSA-MCC-DM1, через великі об'єми пухлин. На 59 день середній об'єм пухлин у мишей, які отримували лікування введенням Ab4-MCC-DM1 згідно з кожним із режимів дозування був значно меншим, ніж в групі, яка отримувала контрольний кон'югат αSA-MCC-DM1 ( $p < 0,0001$ ) (Фіг. 7). Ab4-MCC-DM1 забезпечує тривалий регрес пухлини при кожному з режимів дозування. У жодній з груп, які отримували лікування Ab4-MCC-DM1, не спостерігалось втрати маси тіла протягом дослідження.

## Фармакокінетика

Кон'югати лікарського засобу та антитіл Ab4 і Ab8 оцінювали після внутрішньовенного введення самкам мишей CB-17/SCID з CD27L-експресуючими ксенотрансплантатами 786-0 у контексті досліджень ефективності та наступного дослідження кінцевих параметрів ФК. Сумарна експозиція та значення кліренсу молекул Ab4-MCC-DM1 і Ab8-MCC-DM1 відрізнялися в 1,33-1,4 рази, і час напівжиття обох типів ADC у мишей становив приблизно 12 днів.

Характеризували стабільність та параметри ФК кон'югатів лікарського засобу й антитіл Ab4-MCC-DM1 і Ab8-MCC-DM1 in vivo після введення однієї внутрішньовенної (в/в) дози мишам CB-17/SCID із ксенотрансплантатами 786-0. Спостерігалася дуже подібна експозиція двох кон'югатів лікарського засобу з антитілом, але Ab4-MCC-DM1 демонстрували більшу стабільність ступеня кон'югації ліки/антитіла протягом 96-годинного періоду дослідження, згідно з оцінкою за допомогою афінної МС, у порівнянні з молекулою Ab8-MCC-DM1. Кон'югат Ab4-MCC-DM1 не проявляв детектованої втрати цілісності в моменти часу через 30 хвилин або 24 години після ін'єктування; тоді як для Ab8-MCC-DM1 спостерігалися зміни у момент часу 30 хвилин і значне зменшення кон'югатів у всіх зразках через 24 години після ін'єктування.

## Приклад 3 - Картування паратопів

Модифікації Ab4 тестували на сполучення з CD27L із застосуванням ІФА ELISA. CD27L сполучали у планшетах Maxisorp при кімнатній температурі протягом більше 2-х годин, при струшуванні, 1 мкг/мл в 100 мкл. Потім планшети блокували 250 мкл 10 % знежиреного сухого молока у ФСБ + 0,05 % Твін 20 протягом 2 годин. Після промивання 4×300 мкл ФСБ + 0,05 % Твін 20 (ФСБ/ТВІН) розведення модифікованого антитіла та очищеного вихідного контролю в діапазоні від 0,045 до 100 нг/мл вносили у планшети та інкубували протягом 1 години. Після ще одного відмивання ФСБ/ТВІН у планшети вносили кон'юговане з пероксидазою хрону детекторне антитіло  $\alpha$ huFc (Jackson) у розведенні 1:7000, та інкубували протягом 1 години. Проводили останнє промивання, субстрат ТМБ-субстрат інкубували протягом 10 хвилин і зупиняли фосфорною кислотою. Проводили реєстрацію оптичної щільності при 450 нм і будували графік залежності від концентрації. Потім зазначені криві аналізували з використанням трьохпараметричної нелінійної апроксимації; порівнювали  $EC_{50}$  і максимальний розрахований сигнал із очищеним контролем. Сполучення вважали аналогічним сполученню вихідного антитіла в тому випадку, якщо  $EC_{50}$  знаходилась в межах 2-кратного інтервалу, а максимальний сигнал перевищував 50 %. Сполучення зменшувалося в тому випадку, якщо  $EC_{50}$  зменшувалась більше ніж в 2 рази і/або максимальний сигнал становив менше ніж 50 %. Сполучення припинялося, якщо побудова кривої була неможлива, або при максимальному сигналі менше ніж 5 %. Сполучення було знижено, якщо  $EC_{50}$  збільшувалась більше ніж в 2 рази і/або максимальний сигнал був нижче 50 %. Сполучення усунуте, якщо крива не може бути побудована або максимальний сигнал нижче 5 %.

Таблиця 8

5 Наведені комбінації модифікацій важкого та легкого ланцюгів із рівнями експресії в мкг/мл (визначеної методом ForteBio Protein A) і їх впливом на сполучення

Комбінації	Експресія	Сполучення
N31H-Y58N+N31S-I34M	30,3	Зниж.
N31H-Y58N+G33S-I34L	46,7	Немає сполуч.
N31H-Y58N+D54E-G55S	9,91	Немає сполуч.
N31H-Y58N+S103G-G104S	14,6	Немає сполуч.
N31H-Y58N+Parent HC	10,4	Зниж.
R24K-S26G+N31S-I34M	13,8	Подіб.
R24K-S26G+G33S-I34L	16,9	Немає сполуч.
R24K-S26G+D54E-G55S	1,87	Зниж.
R24K-S26G+S103G-G104S	3,76	Зниж.
R24K-S26G+Parent HC	3,43	Подіб.
L55I-Y58F+N31S-I34M	9,53	Зниж.
L55I-Y58F+G33S-I34L	11,6	Немає сполуч.
L55I-Y58F+D54E-G55S	1,26	Зниж.
L55I-Y58F+S103G-G104S	2,61	Зниж.
L55I-Y58F+Parent HC	2,72	Подіб.
Q95N-T96S+N31S-I34M	24,6	Подіб.
Q95N-T96S+G33S-I34L	32,7	Немає сполуч.
Q95N-T96S+D54E-G55S	1,89	Зниж.
Q95N-T96S+S103G-G104S	4,99	Немає сполуч.
Q95N-T96S+Parent HC	5,85	Подіб.
Parent LC+N31S-I34M	31,6	Зниж.
Parent LC+G33S-I34L	51,2	Немає сполуч.
Parent LC+D54E-G55S	7,0 3	Зниж.
Parent LC+S103G-G104S	10,7	Немає сполуч.
Parent LC+Parent HC	9,25	Подіб.

10 При 13 із 24 комбінацій модифікацій, зроблених в Ab4, зберігався деякий рівень сполучення CD27L. У 9, які не сполучалися з CD27L, було присутнє щонайменше з наступних: модифікації важкого ланцюга "G33S-I34L" і "S103G-G104S" або модифікації легкого ланцюга "N31H-Y58N". З антитіл подібних на 97 % антитіл (2 амінокислотні модифікації) 75 % (6 із 8) зберігали деякий рівень сполучення, та 56 % (7 із 16) антитіл з 94 % подібністю (4 модифікації амінокислот) зберігали деякий рівень сполучення, причому в 2 із них рівень сполучення близький до вихідного контролю. Це показує, що антитіло зі зниженою до 94 % подібністю з Ab4 зберігає

15 здатність сполучати CD27L.

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1

5 Амінокислотна послідовність CD27L людини  
 MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGP  
 QQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPEDKQQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSP  
 ASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP

SEQ ID NO:2

10 Амінокислотна послідовність попередника CD27 людини  
 MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDP  
 CIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVNRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTA  
 RSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLSDFIRILVIFSG  
 MFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPVPEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP

15 SEQ ID NO:3

Нуклеотидна послідовність, яка кодує важкий ланцюг Ab1

CAGATGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCCTCACAGACCCTGTCCCTCACC  
 TGCAGTGTCTCTGATGGCTCCATCATCAGTGGTGTCTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACC  
 CAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGATACATCTATTACAGTGGGAGCACCTCCTACAACCCGTC  
 20 CCTCAAGAGTCGACTTACCATGTACAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCT  
 CTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGAGTGGATACAGCTATGCCCTCTT  
 TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCCGT  
 CTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT  
 CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT  
 25 GCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG  
 CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA  
 AGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGC  
 ACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG  
 ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACcctGAGGTCA  
 30 AGTTCAactGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA  
 GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC  
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA  
 AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA  
 CCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGA  
 35 GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA  
 CGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC  
 TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT  
 CTCCGGGTAA

SEQ ID NO:4

40 Нуклеотидна послідовність, яка кодує важкий ланцюг Ab2

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACC  
 TGCAGTGTCTCTGGTGAAGTCCATCATCAGTGGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACC  
 CAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTTTTACAGTGGGAGCACCGACTACAACCCGTC  
 45 CCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCT  
 CTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGGAGTGGATACAGCTATGCCCTCTT  
 TGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCCGT  
 CTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT  
 CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT  
 GCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG  
 50 CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA  
 AGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGC  
 ACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG  
 ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC  
 AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAatGCCAAGACAAagccgCGGGAGGAGCA  
 55 GTACAaCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC  
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA  
 AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA  
 CCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGA  
 GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA  
 60 CGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC



TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGcACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:5

Нуклеотидна послідовність, яка кодує важкий ланцюг Ab4

5 cagggtcagctggtgagctctggggaggcgctggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaact  
atggcatatactgggtccgccagggtccaggcaaggggctggagtggtggcagttatatggtatgatggaagtaataaatactatgcagact  
ccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgcgtgtatctgcaaataaacagcctgagagccgaggacacggctgt  
gtattactgtgcgagagatggaggatatagtggctacgattcggggttgactactggtggccagggaacccctggcaccgtctcctcagctagc  
10 accaagggcccatccgtctccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggctgctgtgcaaggactacttc  
cccgaaccgggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgtcacacctccccggtgtcctacagtctcaggactctactcc  
ctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcagctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgg  
acaagaaagtgtgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctcctct  
tcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgagggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggt  
15 caagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggt  
cagcgtcctcaccgtctcgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgag  
aaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccgggaggagatgaccaagaaccag  
gtcagcgtcagctgctggtgcaaggcttctatcccgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccgggagaaactacaag  
accacgctcccgctgctggtgactcgagcgtctctctctatagcaagctaccgtggagacagagcaggtggcagcaggggaacgtctct  
catgctccgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacacgcagaagacccctctcctgtctccgggtaaatga

20 SEQ ID NO:6

Нуклеотидна послідовність, яка кодує важкий ланцюг Ab5

[illegible]

SEQ ID NO:7

Нуклеотидна послідовність, яка кодує важкий ланцюг Ab6

40 caggttcagctgggtgcagctcggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggtctcctgcaaggctcttggttacacctttaccagcta  
tggtatcagctgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgagtggatgggatgagcagcgttacaatggttacacacactatgcacaga  
agctccaggggcagagtcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggcc  
gtgtattactgtgcgagagactacggttggaacgactactacggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcacctgtctcctcagctagc  
accaagggcccatccgtctccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagcgccctgggctgctgtgtaaggactacttc  
cccgaaccgggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgtcacaccttccggctgtcctacagtcctcaggactctactcc  
45 ctacgacagctgggtgaccgtgccccctcagcagctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgg  
acaagagagttgagcccaaatcttgacaaaactcacacatgccaccgtgccacagacctgaactcctggggggaccgtcagcttctctct  
tcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctccggacccttgaggtcacatgctgggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggt  
caagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggt  
cagcgtcctcacctgctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgag  
50 aaaaccatctccaaagccaaagggcagccctccagaaccacaggtgtacacctgccccctccgggaggagatgaccaagaaccag  
gtcagcctcagctgctgggtcaaaagctcttaccgagcagatcgccgtggagtggtggagacaaatggcgacccggagaacaactacaag  
accagcctcccgctgctggactcgacggctccttctcctctatagcaagctaccgctgggacaaagagcaggtggcgacagggggaacgtctct  
catgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatga

SEQ ID NO:8

Нуклеотидна послідовність, яка кодує важкий ланцюг Ab7

60 cagggtcagctggtggagctcggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtacct  
atggcatgcactgggtccgccagggtccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgatggaagtaataataactatggagact  
ccgtgaagggccgattcacctatccagagacaattccaagaacacgcgtgtatctgcaaataaacgcctgagagccgaggacacggctgt  
gtattactgtgcgagagataacagtcactactactacggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcacctctcctcagctagcaccaa  
gggcccatcgtcttccccctggcacctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactactccccga

accggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacacctcccggtgtcctacagtctcaggactctactccctcag  
cagcgtggtgacctgcccagcagcttggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaa  
gagagtgtagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgggggaccgtcagcttctcttcccc  
ccaaaaccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctgtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagt  
5 tcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagc  
gtcctcacctgctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaa  
accatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggaggagatgaccaagaaccaggtca  
gcctgacctgctggtcaaaaggtcttatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagaaactacaagacca  
cgctcccgtgctggactccgacggctccttctctatagaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg  
10 ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

SEQ ID NO:9

Нуклеотидна послідовність, яка кодує важкий ланцюг Ab8

cagggtcagctggtgagctcggggaggcggtggtccagcctgggaggtccctgagactcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtagct  
atggcatgcactgggtccgacaggctccaggcaaggggctggagtggtggcagttatatggtatgatggaagtataaatactttgcagact  
15 cgtgaagggcgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaacacgctgtg  
tattactgtcggagagatgggtagcaggagctcgctacgtctactttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagctagca  
ccaagggcccatccgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggctgctggtcaaggactactcc  
ccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacacctcccggtgtcctacagtctcagactctactccc  
tcagcagcgtggtgacctgacctccagcagcttgggacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgg  
20 acaagaaagtgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgggggaccgtcagcttctctt  
tcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctgtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggt  
caagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagagcagtacaacagcacgtaccgtgtggt  
cagcgtcctcacctgctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgag  
aaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggaggagatgaccaagaaccag  
25 gtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagagaacaactacaag  
accacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctatagaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttct  
catgtccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

SEQ ID NO:10

Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ab1

QMQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDGSIISGVYWSWIRQHHPGKGLEWIGYIYSGSTSYNPSLKS  
RLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGYSYALFDYWGGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS  
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI  
CNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
35 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:11

Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ab2

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGDSIISGGYWSWIRQHHPGKGLEWIGYIFYSGSTDYNPSLKS  
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGYSYALFDHWGGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS  
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI  
CNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
40 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:12

Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ab4

QVQLVESGGGVVQPGRLSLRSCAASGFTFSNYGIHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVK  
GRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCARDGGYSGYDSGFDYWGGTLTVTVSSASTKGPSVF  
50 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL  
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:13

Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ab5

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYDINWVRQATGQGLEWMGMWNPNSGNTGYAQKF  
QGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYDFWSGYYYYYYGMDVWGQGTITVTVSSAST  
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  
60 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR

TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:14

5 Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ab6

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGYTHYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYGGNDYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:15

Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ab7

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSDNKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNSHYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:16

Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ab8

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSDKYFADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGIAGARYVYFDYWQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:17

Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab1

QMQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDGSIISGVYYWSWIRQHHPGKGLEWIGYIYSGSTSYNPSLKSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGYSYALFDYWQGGLTVTVSS

SEQ ID NO:18

Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab2

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGDSIISGVYYWSWIRQHHPGKGLEWIGYIFYSGSTDYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGYSYALFDHWQGGLTVTVSS

SEQ ID NO:19

Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab3

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISDGGTTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHDYSNRYFDYWQGGLTVTVSS

SEQ ID NO:20

Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab4

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSNYGIHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSDNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSGYDSGFDYWQGGLTVTVSS

SEQ ID NO:21

Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab5

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYDFWWSGYYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:22

Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab6

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGYTHYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYGGNDYYGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:23

Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab7

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSDNKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNSHYYYGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:24

Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab8

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSDKYFADSVK  
 GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGIAGARYVYFDYWGQGTLVTVSS  
 SEQ ID NO:25

Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab1

5 SGVYYWS

SEQ ID NO:26

Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab2

SGGYWS

SEQ ID NO:27

10 Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab3

SYAMS

SEQ ID NO:28

Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab4

NYGIH

15 SEQ ID NO:29

Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab5

SYDIN

SEQ ID NO:30

Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab6

20 SYGIS

SEQ ID NO:31

Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab7

TYGMH

SEQ ID NO:32

25 Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab8

SYGMH

SEQ ID NO:33

Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab1

YIYYSGSTSYNPSLKS

30 SEQ ID NO:34

Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab2

YIFYSGSTDYNPSLKS

SEQ ID NO:35

Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab3

35 VISDSGGTTDYADSVKG

SEQ ID NO:36

Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab4

VIWYDGSNKYYADSVKG

SEQ ID NO:37

40 Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab5

WMNPNSGNTGYAQKFQG

SEQ ID NO:38

Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab6

WISAYNGYTHYAQKLQG

45 SEQ ID NO:39

Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab7

VIWYDGSNKYYGDSVKG

SEQ ID NO:40

Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab8

50 VIWYDGSDKYFADSVKG

SEQ ID NO:41

Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab1

SGYSYALFDY

SEQ ID NO:42

55 Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab2

SGYSYALFDH

SEQ ID NO:43

Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab3

HDYSNRYFFDY

60 SEQ ID NO:44

Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab4

DGGYSGYDSGFDY

SEQ ID NO:45

Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab5

5 GYDFWSGYYYYYYGM DV

SEQ ID NO:46

Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab6

DYGGNDYYGMDV

SEQ ID NO:47

10 Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab7

DNSHYYYGMDV

SEQ ID NO:48

Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab8

DGIAGARYVYFDY

15 SEQ ID NO:49

Нуклеотидна послідовність, яка кодує легкий ланцюг Ab1

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTTTAGGAGACAGAGTCACCATCAC  
TTGCCGGGCAAGTCAGAGCGTTGACAGATATTTCAATTGGTATCAGCAGAAACCTGGGAAAGCC  
CCTAAGGTCCTGATCTTTGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCCGGTGGCA  
20 GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTAC  
TACTGTCAACAGAGCTACAGTACCCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAGTCAAAC  
GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC  
GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG  
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA  
25 CCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC  
CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG  
T

SEQ ID NO:50

Нуклеотидна послідовність, яка кодує легкий ланцюг Ab2

30 GACATCCAGATGACCCAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA  
GTTGCCGGGCAAGTCAGTTTATTGGCAGATATTTCAATTGGTATCAGCAGCAACCAGGGAAAGC  
CCCTAAGGTCCTGATCTATGCTGAATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGATTTCAGTGGCA  
GTGGATCTGGGACAGAACTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAAGATAC  
TACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAAC  
35 GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC  
GCCTCTGTTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG  
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA  
CCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC  
CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG  
40 T

SEQ ID NO:51

Нуклеотидна послідовність, яка кодує легкий ланцюг Ab4

gatattgtgatgactcagctctccactctccctgcccgtcacccctggagagccggcctccatctcctgcaggtctagtcagagcctcctgaatagt  
aatggatacaactatttggattggtacctgcagaagccagggcagctccacagttcctgatctatttgggttctatcgggctccggggtccctg  
45 acaggttcagtggtcagtgatcaggcacagatttacactgagaatcagcagagtgagggtgaggatgttgggtttattactgtataaaact  
ctacaaactccattcactttcgccctgggaccaaagtggatatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtctcatctcccgccatctgatgag  
cagttgaaatctggaactgcctgtgtgtgctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctcca  
atcggttaactcccaggagagtgacacagcagggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagca  
gactacgagaacacaaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtg  
50 tag

SEQ ID NO:52

Нуклеотидна послідовність, яка кодує легкий ланцюг Ab5

gaaattgtgttgacgcagctcctggcacccctgtcttgtctccagggaagagccaccctcctcctgcagggccagtcagagtgtagcagcag  
ctacttagcctggtaccagcagagacctggccaggctccaggctcctcatctatggtgcatccagcagggccactggcatcccagacaggtt  
55 cagtggtcagtggtctgggacagacttcaactcaccatcagcagctgagcctgaagatttgcagtgattactgtctgagctggtgagctct  
gtcccgtcactttcgccggagggaacaaaggtggagatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtctcatctcccgccatctgatgagcagtt  
gaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcg  
ggtaactcccaggagagtgacacagcagggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagact  
acgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgtaa  
60 SEQ ID NO:53

Нуклеотидна послідовність, яка кодує легкий ланцюг Ab6

cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggagagggtcaccatctctgttctggaagcagctccaacatcggaatta  
attatgtatactggtaccagcagctcccaggaacggccccaaactctcatctataggagtgatcagcgccctcaggggtccctgaccgatt  
ctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccctcagtggtccggtccgaggatgaggctgattattactgtgcagcatgggatgaca  
5 gcctgagtggtgtggtgttcggcgaggaggaccaagctgaccgtcctaggccaaccgaaagcgggcgcctcggtcactctgtcccgccctcct  
ctgaggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgaacttctaccgggagccgtgacagtggtcctggaaggcagatagc  
agccccgtcaaggcgggagtgaggaccaccacaccctccaaacaagaacaacaagtagcgggccagcagctatctgagcctgacgc  
ctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagcaccgtggagaagacagtggtccctacagaatggt  
catag

10 SEQ ID NO:54

Нуклеотидна послідовність, яка кодує легкий ланцюг Ab7

CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCAACATCTCC  
TGCATCTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGAGGTTATGATGTAAATTGGTATCAGCAGTTCCTCAG  
15 GAACAGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGTTAAACAATCGGCCCTCAGGAGTCCCTGACCGATTC  
TCTGGCTCCACGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGACTCCAGGCTGAGGATGAG  
GCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACACCAGCCTGAGTGCTTCGGTATTCGGCGGAGGGACCA  
GACTGACCGTCCTAGGCCAACCGAAAGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGA  
GGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGAAGTCTACCCGGGAGCCGTG  
ACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCC  
20 AAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGT  
CCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCC  
CTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:55

Нуклеотидна послідовність, яка кодує легкий ланцюг Ab8

gacatccagatgacccagctcctcatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcgggagagtcagggcattagcaatta  
tttagcctggttcagcagaaaccagggaagcccctaagtcctgatctatgctgcacccagttgcaagggtgggtcccatcaaagtcagcg  
gcagtggtatctgggacagattcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgcaacttattactgccaacaatattataattaccatt  
cacttcggccctgggaccacagtggtatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatctcccgcctctgatgagcagtgaaatctgg  
aactgcctctgtgtgtgctgtgaataacttctatccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcc  
30 caggagagtgatcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacagaaaa  
cacaagctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgtcacaagagctcaacaggggagagtgtag

SEQ ID NO:56

Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ab1

DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQSVDRYFNWYQQKPKAPKVLIFAASSLQSGVPSRFGSGSGS  
35 GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL  
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL  
SSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:57

Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ab2

DIQMTQSPSSLSASVGDRTISCRASQFIGRYFNWYQQQPGKAPKVLIIYAESSLQSGVPSRFGSGSGS  
40 GTEFTLTISLQPEDFARYYCQQSYSTPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS  
SPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:58

Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ab4

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLNSNGYNYLDWYLQKPGQSPQFLIYLGSYRASGVPRFSGS  
45 GSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCIQTLQTPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH  
QGLSSPVTKSFNRGEC

50 SEQ ID NO:59

Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ab5

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS  
55 GTDFTLTISLQPEDFAVYYCLQSGSSVPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL  
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL  
SSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:60

Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ab6

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGINYVYQQLPGTAPKLLIYRSDQRPSGVPRFSGSK  
SGTSASLALSLRSEDEADYYCAAWDDSLSGVVFGGKTLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA

TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH  
EGSTVEKTVAPTECS  
SEQ ID NO:61

Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ab7

5 QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVNWYQQFPGTAPKLLIYVNNNRPSGVPDRFSGS  
TSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDTLSASVFGGGTRTLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA  
TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH  
EGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:62

Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ab8

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQGGVPSKFSFGSGS  
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYNYPFTFGPGTTVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL  
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS  
SPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:63

Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab1

DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQSVDRYFNWYQQKPGKAPKVLIFAASSLQSGVPSRFSGSGS  
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTPWTFGQGTKEVK

SEQ ID NO:64

Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab2

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQFIGRYFNWYQQQPGKAPKVLIIYAESSLQSGVPSRFSGSGS  
GTEFTLTISLQPEDFARYYCQSYSTPWTFGQGTKEIK

SEQ ID NO:65

Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab3

25 EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSFSSNYLAWYQQKPGQAPRLFIYGASSRATGIPDRFSGSGS  
GTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQYGISPCSFQGTKEIK

SEQ ID NO:66

Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab4

30 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLNSNGYNYLDWYLQKPGQSPQFLIYLGSYRASGVDPDRFS  
GSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCIQTLQTPFTFGPGTKVDIK

SEQ ID NO:67

Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab5 e

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQRPGQAPRLIIYGASSRATGIPDRFSGSGS  
GTDFTLTISLQPEDFAVYYCLQSGSSVPLTFGGGTKEIK

SEQ ID NO:68

Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab6

35 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGINYVYWYQQLPGTAPKLLIYRSDQRPSGVPDRFSGSK  
SGTSASLALSGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGVVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO:69

Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab7

40 QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVNWYQQFPGTAPKLLIYVNNNRPSGVPDRFSGS  
TSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDTLSASVFGGGTRTLTVL

SEQ ID NO:70

Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab8

45 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQGGVPSKFSFGSGS  
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYNYPFTFGPGTTVDIK

SEQ ID NO:71

Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab1

RASQSVDRYFN

SEQ ID NO:72

Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab2

RASQFIGRYFN

SEQ ID NO:73

Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab3

55 RASQSFSSNYLA

SEQ ID NO:74

Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab4

RSSQSLNSNGYNYLD

SEQ ID NO:75

60 Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab5

RASQSVSSSYLA  
 SEQ ID NO:76  
 Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab6  
 SGSSSNIGINYVY  
 5 SEQ ID NO:77  
 Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab7  
 TGSSSNIGAGYDVN  
 SEQ ID NO:78  
 Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab8  
 10 RASQGISNYLA  
 SEQ ID NO:79  
 Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab1  
 AASSLQS  
 SEQ ID NO:80  
 15 Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab2  
 AESSLQS  
 SEQ ID NO:81  
 Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab3  
 GASSRAT  
 20 SEQ ID NO:82  
 Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab4  
 LGSYRAS  
 SEQ ID NO:83  
 Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab5  
 25 GASSRAT  
 SEQ ID NO:84  
 Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab6  
 RSDQRPS  
 SEQ ID NO:85  
 30 Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab7  
 VNNNRPS  
 SEQ ID NO:86  
 Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab8  
 AASSLQG  
 35 SEQ ID NO:87  
 Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab1  
 QQSYSTPWT  
 SEQ ID NO:88  
 Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab2  
 40 QQSYSTPWT  
 SEQ ID NO:89  
 Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab3  
 QQYGISPCS  
 SEQ ID NO:90  
 45 Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab4  
 IQTLQTPFT  
 SEQ ID NO:91  
 Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab5  
 LQSGSSVPLT  
 50 SEQ ID NO:92  
 Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab6  
 AAWDDSLSGVV  
 SEQ ID NO:93  
 Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab7  
 55 QSYDTSLSASV  
 SEQ ID NO:94  
 Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab8  
 QQYYNYPFT  
 60



ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

5 <110> Делані, Джон М.  
 ФРАНСЛОУ III, Вільям Крістіан  
 Кієн, Червік Теренс  
 <120> СПОЛУЧНІ АНТИГЕН CD27L БІЛКИ  
 <130> A-1437-US-NP  
 10 <140> XX/XXX,XXX  
 <141> 2012-09-19  
 <150> 61/538,024  
 15 <151> 2011-09-22  
 <160> 94  
 <170> PatentIn версія 3.5  
 20 <210> 1  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> CD27L людини  
 30 <400> 1  
 Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly  
 1 5 10 15  
 35 Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile  
 20 25 30  
 40 Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu  
 35 40 45  
 45 Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His  
 50 55 60  
 50 Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala  
 65 70 75 80  
 Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu  
 85 90 95  
 55 Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu  
 100 105 110  
 60 Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu

115 120 125

5 Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg  
130 135 140

10 Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro  
145 150 155 160

15 Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu  
165 170 175

20 Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg  
180 185 190

25 <210> 2  
<211> 217  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> попередник CD27 людини

35 <400> 2  
Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val  
1 5 10 15

40 Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr  
20 25 30

45 Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe  
35 40 45

50 Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro  
50 55 60

55 Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His  
65 70 75 80

60 Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys  
85 90 95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys

	100	105	110	
5	Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu			
	115	120	125	
10	Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His			
	130	135	140	
15	Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met			
	145	150	155	160
20	Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr			
	165	170	175	
25	His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile			
	180	185	190	
30	Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala			
	195	200	205	
35	Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr			
	210	215		
	<210> 3			
	<211> 1350			
	<212> ДНК			
	<213> Людина розумна			
40	<220>			
	<221> misc_feature			
	<223> Нуклеотидна послідовність, яка кодує важкий ланцюг Ab1			
	<400> 3			
	cagatgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cctcacagac cctgtccctc	60		
45	acctgcactg tctctgatgg ctccatcatc agtgggtgtt actactggag ctggatccgc	120		
	cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt ggatacatct attacagtgg gagcacctcc	180		
	tacaaccgt ccctcaagag tcgacttacc atgtcagtag acacgtctaa gaaccagttc	240		
50	tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgaggagt	300		
	ggatacagct atgccctctt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca	360		
55	gctagcacca agggcccac cgtctcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	420		
	ggcacagcgg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	480		
	tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacacctcc cggctgtcct acagtcctca	540		
60	ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagctggg caccagacc	600		

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 660

5 aaatcttggtg acaaaactca cacatgccc aacgtgcccag cacctgaact cctgggggga 720

ccgtcagtct tcctctccc cccaaaaccc aaggacaccc tcattgatctc ccggaccct 780

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gtcaactgg 840

10 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

15 gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccac cggggaggag 1080

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacac 1140

20 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttccttat agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg 1260

cagcagggga acgtctctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag 1320

25 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 4

30 <211> 1350

<212> ДНК

<213> Людина розумна

35 <220>

<221> misc\_feature

<223> Нуклеотидна послідовність, яка кодує важкий ланцюг Ab2

<400> 4

40 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtga ctccatcac agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120

cagcaccacg ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct ttacagtgg gagcaccgac 180

45 tacaaccctg ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagc tgagctctgt gactgccgag gacacggccg tatattactg tgcgaggagt 300

ggatacagct atgccctctt tgaccactgg ggccaggga cctggtcac cgtctcctca 360

50 gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480

55 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacacctcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagctggg caccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 660

60

aaatctgtg acaaaactca cacatgcca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 720  
 ccgtcagtct tcctctccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 780  
 5 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg 840  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900  
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960  
 10 gagtacaagt gcaaggctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020  
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1080  
 15 atgaccaaga accagggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140  
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200  
 ctggactccg acggctcctt ttctcttat agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg 1260  
 20 cagcagggga acgtctctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320  
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350  
 25 <210> 5  
 <211> 1359  
 <212> ДНК  
 <213> Людина розумна  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Нуклеотидна послідовність, яка кодує важкий ланцюг Ab4  
 35  
 <400> 5  
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtcagc cgtctggatt caccttcagt aactatggca tacactgggt ccgccaggct 120  
 40 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat 240  
 45 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgga 300  
 ggatatagtg gctacgattc ggggtttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360  
 tcctcagcta gcaccaaggg cccatccgtc tccccctgg caccctctc caagagcacc 420  
 50 tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact actccccga accggtgacg 480  
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttcccggc tgtctacag 540  
 55 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600  
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtga caagaaagtt 660  
 gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 720  
 60

gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctccgg 780  
 acccctgagg tcacatgctt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840  
 5 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 900  
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960  
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggttccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1020  
 10 atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc ccatcccg 1080  
 gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccagc 1140  
 15 gacatgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaca gaccacgctt 1200  
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttctt ctctatagca agtcaccgt ggacaagagc 1260  
 aggtggcagc aggggaacgt ctctcatgc tccgtgatgc atgaggctt gcacaaccac 1320  
 20 tacacgcaga agagcctct cctgtctccg ggtaatga 1359  
  
 <210> 6  
 25 <211> 1371  
 <212> ДНК  
 <213> Людина розумна  
  
 30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Нуклеотидна послідовність, яка кодує важкий ланцюг Ab5  
  
 <400> 6  
 35 caggtgcagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg ctctggata cacctcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc 120  
 actggacaag ggctgagtg gatgggatgg atgaacccta acagtggtaa cacaggctat 180  
 40 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca cctccataag cacagcctac 240  
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtac 300  
 45 gattttgga gtggttatta ctactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360  
 acggtcaccg tctctcagc tagcaccaag ggcccatccg tcttcccct ggcaccctcc 420  
 tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga ctactcccc 480  
 50 gaaccggtga cgggtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttccc 540  
 gctgtctac agtcctcagg actctactcc ctacgacg cggtgaccgt gccctccagc 600  
 55 agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg 660  
 gacaagagag ttgagccaa atctgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 720  
 cctgaactcc tggggggacc gtcagtctt ctctcccc caaaaccaa ggacaccctc 780  
 60

atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 840  
 gaggtaagt tcaactgga cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 900  
 5 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 960  
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggctcca acaaagccct cccagccccc 1020  
 atcgagaaaa ccatctcaa agccaaagg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1080  
 10 ccccatccc gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1140  
 ttctatcca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1200  
 15 aagaccagc ctccctgct ggactccgac ggctccttct tccttatag caagctacc 1260  
 gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1320  
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaatg a 1371  
 20  
 <210> 7  
 <211> 1356  
 <212> ДНК  
 25 <213> Людина розумна  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <223> Нуклеотидна послідовність, яка кодує важкий ланцюг Ab6  
  
 <400> 7  
 caggtcagc tggtagctc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggct 60  
 35 tcctgcaagg ctctggta caccttacc agctatgga tcagctgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggctgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggta cacacactat 180  
 gcacagaagc tccagggcag agtcacatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240  
 40 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagactac 300  
 ggtggaacg actactacg tatggacgac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360  
 45 tcagtagca ccaagggccc atccgtctc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 420  
 gggggcacag cgccctggg ctgcctggtc aaggactact tcccgaacc ggtgacggtg 480  
 tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccggctgt cctacagtcc 540  
 50 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 600  
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 660  
 55 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720  
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctccggacc 780  
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840  
 60

tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtag 900  
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtctgc accaggactg gctgaatggc 960  
 5 aaggagtaca agtgaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020  
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atccggggag 1080  
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac 1140  
 10 atgcccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200  
 gtgtgtgact ccgacggctc ctctcttc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260  
 15 tggcagcagg ggaacgtctt ctatgtctc gtatgtatg aggtctgca caaccactac 1320  
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aatga 1356  
 20 <210> 8  
 <211> 1350  
 <212> ДНК  
 <213> Людина розумна  
 25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Нуклеотидна послідовність, яка кодує важкий ланцюг Ab7  
 30 <400> 8  
 caggtgcagc tggtaggtc tggggaggc gtgtccagc ctggaggctc cctgagactc 60  
 tcctgtcag cgtctggatt cacctcagt acctatggca tgactgggt ccgccaggct 120  
 35 ccaggcaagg ggctggagt ggtggcagtt atatggtat atggaagtaa taaatactat 180  
 ggagactccg tgaagggccg attcaccatc tcagagaca attccaagaa cagcgtgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccaggac acggctgtgt attactgtgc gagagataac 300  
 40 agtactact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctctca 360  
 gctagacca agggcccatc cgtctcccc ctggaccct cctcaagag cacctctggg 420  
 45 ggacagcgg ccctgggctg cctgtcaag gactacttc ccgaaccggg gacggtgtcg 480  
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttc cggctgtcct acagtcctca 540  
 ggactctact cctcagcag cgtgtgacc gtgccctcca gcagctggg caccagacc 600  
 50 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 660  
 aaatctgtg aaaaaactca cacatgcca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 720  
 55 ccgtcagtct tcctctccc ccaaaaacc aaggacccc tcattatctc ccggaccct 780  
 gaggtcacat gcgtgtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900  
 60



agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960  
gagtacaagt gcaaggctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020  
5 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1080  
atgaccaaga accaggctcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140  
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200  
10 ctggactccg acggctcctt ctctcttat agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg 1260  
cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320  
15 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350  
  
<210> 9  
<211> 1356  
20 <212> ДНК  
<213> Людина розумна  
  
<220>  
25 <221> misc\_feature  
<223> Нуклеотидна послідовність, яка кодує важкий ланцюг Ab8  
<400> 9  
cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
30 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtga taaatactt 180  
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
35 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatggg 300  
atagcaggag ctgcctacgt ctactttgac tactggggcc aggaaccct ggtcaccgtc 360  
40 tcctcagcta gcaccaaggg cccatccgtc tccccctgg caccctctc caagagcacc 420  
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480  
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccggc tgcctacag 540  
45 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600  
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtga caagaaagtt 660  
50 gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 720  
gggggaccgt cagtcttct ctccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg 780  
acccctgagg tcacatgctg ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840  
55 aactggtacg tggacggcgt ggagggtcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900  
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960  
60 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctcaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 1020

atctccaaag ccaagaggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1080  
 5 gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140  
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200  
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctatagca agctcacctg ggacaagagc 1260  
 10 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320  
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 1356

15 <210> 10  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ab1

25 <400> 10  
 Gln Met Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

30 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Gly Ser Ile Ile Ser Gly  
 20 25 30

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

40 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

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

45 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

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

55 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

60 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140

5 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 10 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 15 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 20 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 25 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 30 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 35 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 40 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 45 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 50 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 55 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 60 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380

5      Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
       385                390                395                400  
  
 10      Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
               405                410                415  
  
 15      Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
               420                425                430  
  
 20      Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
               435                440                445  
  
 25      Gly Lys  
               450  
  
 30      <210> 11  
          <211> 450  
          <212> PRT  
          <213> Людина розумна  
  
          <220>  
          <221> MISC\_FEATURE  
          <223> Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ab2  
  
          <400> 11  
  
 35      Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
               1                5                10                15  
  
 40      Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ile Ser Gly  
               20                25                30  
  
 45      Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
               35                40                45  
  
 50      Trp Ile Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser  
               50                55                60  
  
 55      Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
               65                70                75                80  
  
 60      Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
               85                90                95  
  
 60      Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Ser Tyr Ala Leu Phe Asp His Trp Gly Gln  
               100                105                110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 5  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 10  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 15 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 20 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 25 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 30 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 35 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 40 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 45 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 50 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 55 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 60 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 5  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 10  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 15  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 20  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 25  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445  
 30  
 Gly Lys  
 450  
 <210> 12  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ab4  
 40  
 <400> 12  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 45  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 50  
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 55  
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
	85 90 95
5	
	Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Ser Gly Phe Asp Tyr Trp
	100 105 110
10	
	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
	115 120 125
15	
	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
	130 135 140
20	
	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
	145 150 155 160
25	
	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
	165 170 175
30	
	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
	180 185 190
35	
	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
	195 200 205
40	
	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
	210 215 220
45	
	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
	225 230 235 240
50	
	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
	245 250 255
55	
	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
	260 265 270
60	
	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
	275 280 285
65	
	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
	290 295 300
70	
	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
	305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 325 330 335  
 5  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 340 345 350  
 10  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 355 360 365  
 15  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 370 375 380  
 20  
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 385 390 395 400  
 25  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 405 410 415  
 30  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 420 425 430  
 35  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 435 440 445  
 40  
 Ser Pro Gly Lys  
 450  
 <210> 13  
 <211> 456  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 45  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ab5  
 50  
 <400> 13  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 55  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 60  
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45



Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 5  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 10  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 15 Ala Arg Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly  
 100 105 110  
 20 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 115 120 125  
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
 130 135 140  
 25 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
 145 150 155 160  
 30 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
 165 170 175  
 35 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
 180 185 190  
 40 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
 195 200 205  
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val  
 210 215 220  
 45 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 225 230 235 240  
 50 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 245 250 255  
 55 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 260 265 270  
 60 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 290 295 300  
 5  
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 305 310 315 320  
 10  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 325 330 335  
 15  
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 340 345 350  
 20  
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
 355 360 365  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 370 375 380  
 25  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 385 390 395 400  
 30  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 405 410 415  
 35  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 420 425 430  
 40  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 435 440 445  
 45  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455  
 <210> 14  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 50 <213> Людина розумна  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 55 <223> Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ab6  
 <400> 14  
 60 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 5  
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 10  
 Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr His Tyr Ala Gln Lys Leu  
 50 55 60  
 15  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 20  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 25  
 Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly  
 100 105 110  
 30  
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125  
 35  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140  
 40  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160  
 45  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175  
 50  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190  
 55  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205  
 60  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220  
 65  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240  
 70  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

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

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ab7

5 <400> 15

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

10

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

15

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

20

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val  
50 55 60

25

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

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

30

Ala Arg Asp Asn Ser His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln  
100 105 110

35

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125

40

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
130 135 140

45

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
165 170 175

50

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
180 185 190

55

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
195 200 205

60

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
210 215 220

5 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 10 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 15 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 20 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 25 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 30 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 35 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 40 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 45 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 50 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 55 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445  
 60 Gly Lys  
 450

<210> 16  
 <211> 452  
 5 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
  
 <220>  
 10 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ab8  
  
 <400> 16  
 15 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 20 25 30  
  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 25  
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Phe Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 30  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 40 Ala Arg Asp Gly Ile Ala Gly Ala Arg Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 115 120 125  
 45  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 130 135 140  
 50  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160  
 55 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175  
 60 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 195 200 205  
 5  
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
 210 215 220  
 10  
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 225 230 235 240  
 15 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 245 250 255  
 20 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 260 265 270  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 275 280 285  
 25  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
 290 295 300  
 30  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 305 310 315 320  
 35 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 325 330 335  
 40 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 340 345 350  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 355 360 365  
 45  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 370 375 380  
 50  
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 385 390 395 400  
 55 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 405 410 415  
 60 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 420 425 430



Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 435 440 445  
 5  
 Ser Pro Gly Lys  
 450  
 10  
 <210> 17  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab1  
 20  
 <400> 17  
 Gln Met Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 25  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Gly Ser Ile Ile Ser Gly  
 20 25 30  
 30  
 Val Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45  
 35  
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60  
 40  
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95  
 45  
 Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Ser Tyr Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 50  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 55  
 <210> 18  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 60

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab2

5 <400> 18

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

10

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ile Ser Gly  
20 25 30

15

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

20

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

25

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

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

30

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

35

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

40

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> Людина розумна

45

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab3

<400> 19

50

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

55

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

60

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

5 Ser Val Ile Ser Asp Ser Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 10 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 15 Ala Arg His Asp Tyr Ser Asn Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 20 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 25 <210> 20  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab4  
 <400> 20  
 35 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 45 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 50 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 55 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 60 Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Ser Gly Phe Asp Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 5  
 <210> 21  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 10 <213> Людина розумна  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 15 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab3  
 <400> 21  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 20  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 25  
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 30  
 Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 35  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 40  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 45  
 Ala Arg Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly  
 100 105 110  
 50  
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125  
 55  
 <210> 22  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab6  
 <400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 5  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 10 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 15 Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr His Tyr Ala Gln Lys Leu  
 50 55 60  
 20 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 25 Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly  
 100 105 110  
 30 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 35 <210> 23  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab7  
 45 <400> 23  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 55 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 60 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60

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

5

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

10

Ala Arg Asp Asn Ser His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln  
 100 105 110

15

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

20

<210> 24  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна

25

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга Ab8

30

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

35

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

40

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

45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Phe Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

50

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

55

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

60

Ala Arg Asp Gly Ile Ala Gly Ala Arg Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 25  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 5 <213> Людина розумна

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <223> Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab1

<400> 25  
 Ser Gly Val Tyr Tyr Trp Ser  
 15 1 5

<210> 26  
 <211> 7  
 20 <212> PRT  
 <213> Людина розумна

<220>  
 25 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab2

<400> 26  
 30 Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser  
 1 5

<210> 27  
 35 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab3

<400> 27  
 45 Ser Tyr Ala Met Ser  
 1 5

50 <210> 28  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab4

60 <400> 28

Asn Tyr Gly Ile His  
 1 5

5  
 <210> 29  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна

10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SYDIN

15  
 <400> 29

Ser Tyr Asp Ile Asn  
 1 5

20  
 <210> 30  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 25 <213> Людина розумна

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 30 <223> Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab6

<400> 30

Ser Tyr Gly Ile Ser  
 35 1 5

40  
 <210> 31  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна

45  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab7

<400> 31

50 Thr Tyr Gly Met His  
 1 5

55  
 <210> 32  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна

60 <220>



<221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга Ab8  
  
 <400> 32  
 5 Ser Tyr Gly Met His  
 1 5  
  
 10 <210> 33  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab1  
  
 20 <400> 33  
  
 Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15  
  
 25 <210> 34  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 30  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab2  
 35  
 <400> 34  
  
 Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15  
 40  
  
 <210> 35  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 45 <213> Людина розумна  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 50 <223> Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab3  
  
 <400> 35  
  
 Val Ile Ser Asp Ser Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 55 1 5 10 15  
  
 Gly  
 60

<210> 36  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 5 <213> Людина розумна

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <223> Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab4

<400> 36  
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 15 1 5 10 15

Gly  
 20

<210> 37  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 25 <213> Людина розумна

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 30 <223> Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab5

<400> 37  
 Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 35 1 5 10 15

Gly  
 40

<210> 38  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 45 <213> Людина розумна

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 50 <223> Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab6

<400> 38  
 Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr His Tyr Ala Gln Lys Leu Gln  
 55 1 5 10 15

Gly  
 60

<210> 39  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 5 <213> Людина розумна

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <223> Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab7  
 <400> 39  
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys  
 15 1 5 10 15  
 Gly  
 20  
 <210> 40  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 25 <213> Людина розумна

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 30 <223> Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга Ab8  
 <400> 40  
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Phe Ala Asp Ser Val Lys  
 35 1 5 10 15  
 Gly  
 40  
 <210> 41  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 45 <213> Людина розумна

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 50 <223> Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab1  
 <400> 41  
 Ser Gly Tyr Ser Tyr Ala Leu Phe Asp Tyr  
 55 1 5 10  
 <210> 42  
 <211> 10  
 60 <212> PRT

<213> Людина розумна

<220>  
5 <221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab2

<400> 42

10 Ser Gly Tyr Ser Tyr Ala Leu Phe Asp His  
1 5 10

<210> 43  
15 <211> 11  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

<220>  
20 <221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab3

<400> 43

25 His Asp Tyr Ser Asn Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 44  
30 <211> 13  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

<220>  
35 <221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab4

<400> 44

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

<210> 45  
45 <211> 17  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

50 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> GYDFWSGYYYYYGM DV

55 <400> 45

Gly Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
1 5 10 15

60

Val

5

<210> 46  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

10

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab6

15

<400> 46

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

20

<210> 47  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

25

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab7

30

<400> 47

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

35

<210> 48  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

40

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга Ab8

45

<400> 48

Asp Gly Ile Ala Gly Ala Arg Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

50

<210> 49  
<211> 642  
<212> ДНК  
<213> Людина розумна

55

<220>

60

<221> misc\_feature

<223> Нуклеотидна послідовність, яка кодує легкий ланцюг Ab1

<400> 49

5 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat cttaggaga cagagtcacc 60  
 atcactgcc gggcaagtca gagcgttgac agatattca attggtatca gcagaaacct 120  
 10 gggaaagccc ctaaggtcct gatcttgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcggtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agctacagta ccccgtaggac gttcggccaa 300  
 15 gggaccaagg tggaagtcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat ctcccgcca 360  
 tctgatgagc agtgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480  
 20 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600  
 25 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 50

<211> 642

30 <212> ДНК

<213> Людина розумна

<220>

35 <221> misc\_feature

<223> Нуклеотидна послідовність, яка кодує легкий ланцюг Ab2

<400> 50

40 gacatccaga tgaccagtc cccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcagttgcc gggcaagtca gttcattggc agatattca attggtatca gcagcaacca 120  
 gggaaagccc ctaaggtcct gatctatgct gaatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 45 agattcagtg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caagatacta ctgtcaacag agttacagta ccccgtaggac gttcggccaa 300  
 gggaccaagg tggaatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat ctcccgcca 360  
 50 tctgatgagc agtgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480  
 55 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642  
 60

<210> 51  
 <211> 660  
 <212> ДНК  
 5 <213> Людина розумна

<220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <223> Нуклеотидна послідовність, яка кодує легкий ланцюг Ab4

<400> 51  
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60  
 15 atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg aatagtaatg gatacaacta ttggattgg 120  
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ttcctgatct attgggttc ttatcggggc 180  
 tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggtacaggca cagattttac actgagaatc 240  
 20 agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgta taaaaactct aaaaactcca 300  
 ttcactttcg gccctgggac caaagtggat atcaaacgta cgggtggctgc accatctgtc 360  
 25 ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420  
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480  
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540  
 30 agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac aaaaagtcta cgctgcgaa 600  
 gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc aaaaagagct tcaacagggg agagtgttag 660

35  
 <210> 52  
 <211> 651  
 <212> ДНК  
 40 <213> Людина розумна

<220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <223> Нуклеотидна послідовність, яка кодує легкий ланцюг Ab5

<400> 52  
 gaaattgtgt tgacgcagtc tcctggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtc agtggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaga 120  
 50 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180  
 gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagtctggag 240  
 55 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtctg cagtctggta gctctgtccc gtcactttc 300  
 ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaacgt acggtggctg caccatctgt ctcatcttc 360  
 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420  
 60

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 480

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540

5 ctgacgctga gcaaagcaga ctacagaaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600

cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta a 651

10 <210> 53  
<211> 651  
<212> ДНК  
<213> Людина розумна

15 <220>  
<221> misc\_feature  
<223> Нуклеотидна послідовність, яка кодує легкий ланцюг Ab6

20 <400> 53  
cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga attaattatg tatactggta ccagcagctc 120

25 ccaggaacgg cccccaact cctcatctat aggagtgatc agcggccctc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccctcag tgggctccgg 240

tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgag tgggtgtggtg 300

30 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggccaaccga aagcggcgcc ctcggtcact 360

ctgttccgc cctcctctga ggagcttcaa gccaacaagg ccacactggt gtgtctcata 420

35 agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag 480

gcgggagtgg agaccaccac accctcaaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc 540

tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg 600

40 catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gccctacag aatgttcata g 651

<210> 54  
45 <211> 651  
<212> ДНК  
<213> Людина розумна

50 <220>  
<221> misc\_feature  
<223> Нуклеотидна послідовність, яка кодує легкий ланцюг Ab7

<400> 54

55 cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcagggtatg atgtaaattg gtatcagcag 120

ttcccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatgttaaca acaatcggcc ctcaggagtc 180

60



cctgaccgat tctctggctc cacgtctggc acctcagcct ccctggccat cactggactc 240

caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acaccagcct gagtgttcg 300

5 gtattcggcg gagggaccag actgaccgtc ctaggccaac cgaaagcggc gccctcggtc 360

actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420

ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480

10 aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540

agctatctga gcctgacgcc tgagcagtggt aagtcacaca gaagctacag ctgccaggtc 600

15 acgcatgaag ggagcaccgt ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a 651

<210> 55

<211> 645

20 <212> ДНК

<213> Людина розумна

<220>

25 <221> misc\_feature

<223> Нуклеотидна послідовність, яка кодує легкий ланцюг Ab8

<400> 55

30 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcactgtc gggcgagtc gggcattagc aattatttag cctggttca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaggtgg ggtcccatca 180

35 aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caactatta ctgccaacaa tattataatt acccattcac ttccggccct 300

gggaccacag tggatatcaa acgtacgggtg gctgcacat ctgtctcat ctcccgcca 360

40 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taactctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactccag 480

45 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

50

<210> 56

<211> 214

<212> PRT

55 <213> Людина розумна

<220>

<221> MISC\_FEATURE

60 <223> Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ab1

<400> 56

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

30

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

35

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

40

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

45

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

50

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

55

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 57

60

<211> 214

<212> PRT

<213> Людина розумна

5

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ab2

<400> 57

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

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

35

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

40

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

45

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

50

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

55

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

60

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
 5  
 <210> 58  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 10 <213> Людина розумна  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 15 <223> Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ab4  
 <400> 58  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 20 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
 25 20 25 30  
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 30 Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 35 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ile Gln Thr  
 40 85 90 95  
 Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
 100 105 110  
 45 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125  
 50 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140  
 55 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 60 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 180 185 190  
 5  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 10  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215  
 15 <210> 59  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ab5  
 25 <400> 59  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 30  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 35 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45  
 40 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu  
 65 70 75 80  
 45  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Gly Ser Ser Val  
 85 90 95  
 50  
 Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val  
 100 105 110  
 55 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys  
 115 120 125  
 60 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
 130 135 140

5      Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
       145            150            155            160  
  
 10     Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
           165            170            175  
  
 15     Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
           180            185            190  
  
 20     Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
           195            200            205  
  
 25     Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
       210            215  
  
 30     <210> 60  
       <211> 216  
       <212> PRT  
       <213> Людина розумна  
  
 35     <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <223> Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ab6  
  
       <400> 60  
  
 40     Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
       1            5            10            15  
  
       Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn  
       20            25            30  
  
       Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
       35            40            45  
  
 45     Ile Tyr Arg Ser Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
       50            55            60  
  
 50     Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Leu Ser Gly Leu Arg  
       65            70            75            80  
  
 55     Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
           85            90            95  
  
 60     Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
       100            105            110

5 Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu  
 115 120 125  
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr  
 130 135 140  
 10 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys  
 145 150 155 160  
 15 Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr  
 165 170 175  
 20 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His  
 180 185 190  
 25 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys  
 195 200 205  
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 210 215  
 30 <210> 61  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ab7  
 40 <400> 61  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 45 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly  
 20 25 30  
 50 Tyr Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu  
 35 40 45  
 55 Leu Ile Tyr Val Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 50 55 60  
 60 Ser Gly Ser Thr Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu  
 65 70 75 80

5 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Ser  
 85 90 95  
 10 Leu Ser Ala Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110  
 15 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125  
 20 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
 145 150 155 160  
 25 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
 165 170 175  
 30 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
 180 185 190  
 35 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 210 215  
 40 <210> 62  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ab8  
 50 <400> 62  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 55 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 60 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45



Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 5

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 10

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Phe  
 85 90 95  
 15

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Thr Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 20

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 25

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 30

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 35

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 40

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 45

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 50

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 63  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab1  
 <400> 63

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 60

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Arg Tyr  
 20 25 30  
 5  
 Phe Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
 35 40 45  
 10  
 Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Gly Gly  
 50 55 60  
 15 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 20 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys  
 100 105  
 25  
 <210> 64  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 30 <213> Людина розумна  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 35 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab2  
 <400> 64  
 40 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Arg Tyr  
 20 25 30  
 45  
 Phe Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
 35 40 45  
 50  
 Tyr Ala Glu Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 55 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 60 Glu Asp Phe Ala Arg Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105  
 5  
 <210> 65  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 10 <213> Людина розумна  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 15 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab3  
 <400> 65  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 20 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Phe Ser Ser Asn  
 25 20 25 30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Phe  
 35 40 45  
 30 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 35 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Gly Ile Ser Pro  
 40 85 90 95  
 Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 45  
 <210> 66  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 50 <213> Людина розумна  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 55 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab4  
 <400> 66  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 60 1 5 10 15

5      Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
          20                   25                   30  
 10      Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
          35                   40                   45  
 15      Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro  
          50                   55                   60  
 20      Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile  
          65                   70                   75                   80  
 25      Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ile Gln Thr  
          85                   90                   95  
 30      Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
          100                   105                   110  
 35      <210> 67  
          <211> 109  
          <212> PRT  
          <213> Людина розумна  
          <220>  
          <221> MISC\_FEATURE  
          <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab5  
          <400> 67  
 40      Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
          1                   5                   10                   15  
 45      Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
          20                   25                   30  
 50      Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
          35                   40                   45  
 55      Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
          50                   55                   60  
 60      Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu  
          65                   70                   75                   80  
          Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Gly Ser Ser Val  
          85                   90                   95

Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105  
5

<210> 68  
<211> 110  
<212> PRT  
10 <213> Людина розумна

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
15 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab6  
<400> 68

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
20

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn  
20 25 30  
25

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

Ile Tyr Arg Ser Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
30

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Leu Ser Gly Leu Arg  
65 70 75 80  
35

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95  
40

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110  
45

<210> 69  
<211> 111  
<212> PRT  
50 <213> Людина розумна

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
55 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab7  
<400> 69

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
60

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly  
 20 25 30  
 5  
 Tyr Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu  
 35 40 45  
 10  
 Leu Ile Tyr Val Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 50 55 60  
 15  
 Ser Gly Ser Thr Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu  
 65 70 75 80  
 20  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Ser  
 85 90 95  
 Leu Ser Ala Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu  
 100 105 110  
 25  
 <210> 70  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга Ab8  
 35  
 <400> 70  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 40  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 45  
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45  
 50  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 55  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 60  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Phe  
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Thr Val Asp Ile Lys  
100 105

5

<210> 71  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

10

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab1

15

<400> 71

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Arg Tyr Phe Asn  
1 5 10

20

<210> 72  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

25

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab2

30

<400> 72

Arg Ala Ser Gln Phe Ile Gly Arg Tyr Phe Asn  
1 5 10

35

<210> 73  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

40

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab3

45

<400> 73

Arg Ala Ser Gln Ser Phe Ser Ser Asn Tyr Leu Ala  
1 5 10

50

<210> 74  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

55

<220>

60

<221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab4  
  
 <400> 74  
 5 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp  
 1 5 10 15  
  
 10 <210> 75  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab5  
  
 20 <400> 75  
  
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
 1 5 10  
  
 25 <210> 76  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 30  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab6  
 35  
 <400> 76  
  
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn Tyr Val Tyr  
 1 5 10  
 40  
  
 <210> 77  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 45 <213> Людина розумна  
  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 50 <223> Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab7  
  
 <400> 77  
  
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val Asn  
 55 1 5 10  
  
 <210> 78  
 <211> 11  
 60 <212> PRT



<213> Людина розумна

<220>  
5 <221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга Ab8

<400> 78

10 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 79  
15 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

<220>  
20 <221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab1

<400> 79

25 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5

<210> 80  
30 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

<220>  
35 <221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab2

<400> 80

40 Ala Glu Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5

<210> 81  
45 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

50 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab2

55 <400> 81

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

60

5 <210> 82  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab4  
 10 <400> 82  
  
 Leu Gly Ser Tyr Arg Ala Ser  
 1 5  
 15  
  
 <210> 83  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 20 <213> Людина розумна  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 25 <223> Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab5  
  
 <400> 83  
  
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
 30 1 5  
  
 <210> 84  
 <211> 7  
 35 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
  
 <220>  
 40 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab6  
  
 <400> 84  
  
 Arg Ser Asp Gln Arg Pro Ser  
 45 1 5  
  
 <210> 85  
 50 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
  
 <220>  
 55 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab7  
  
 <400> 85  
 60

	Val Asn Asn Asn Arg Pro Ser
	1            5
5	<210> 86
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Людина розумна
10	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<223> Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга Ab8
15	<400> 86
	Ala Ala Ser Ser Leu Gln Gly
	1            5
20	<210> 87
	<211> 9
	<212> PRT
	<213> Людина розумна
25	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<223> Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab1
30	<400> 87
	Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
	1            5
35	<210> 88
	<211> 9
	<212> PRT
40	<213> Людина розумна
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
45	<223> Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab2
	<400> 88
	Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
50	1            5
	<210> 89
	<211> 9
55	<212> PRT
	<213> Людина розумна
	<220>
60	<221> MISC_FEATURE

<223> Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab3

<400> 89

5 Gln Gln Tyr Gly Ile Ser Pro Cys Ser  
1 5

<210> 90  
10 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab4

<400> 90

20 Ile Gln Thr Leu Gln Thr Pro Phe Thr  
1 5

25 <210> 91  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab5

35 <400> 91

Leu Gln Ser Gly Ser Ser Val Pro Leu Thr  
1 5 10

40 <210> 92  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

45 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab6

50 <400> 92

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Val Val  
1 5 10

55 <210> 93  
<211> 11  
<212> PRT  
60 <213> Людина розумна

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <223> Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab7  
 <400> 93  
 Gln Ser Tyr Asp Thr Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 10 1 5 10  
 <210> 94  
 <211> 9  
 15 <212> PRT  
 <213> Людина розумна  
 <220>  
 20 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга Ab8  
 <400> 94  
 25 Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Phe Thr  
 1 5

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. CD27L білок, який зв'язує антиген, що включає варіабельну область легкого ланцюга і варіабельну область важкого ланцюга, де:
  - а) варіабельна область легкого ланцюга містить LCDR1, представлену SEQ ID NO: 74; LCDR2, представлену SEQ ID NO: 82; і LCDR3, представлену SEQ ID NO: 90; і варіабельна область важкого ланцюга містить HCDR1, представлену SEQ ID NO: 28; HCDR2, представлену SEQ ID
  - 10 NO: 36; і HCDR3, представлену SEQ ID NO: 44;
  - б) варіабельна область легкого ланцюга визначена, як в а), але має мутацію R24K і мутацію S26G, і варіабельна область важкого ланцюга визначена, як в а), але має мутацію N31S -I34M;
  - с) варіабельна область легкого ланцюга визначена, як в а), але має мутацію R24K і мутацію S26G, і варіабельна область важкого ланцюга визначена, як в а);
  - 15 д) варіабельна область легкого ланцюга визначена, як в а), але має мутацію L55I і мутацію Y58F, і варіабельна область важкого ланцюга визначена, як в а);
  - е) варіабельна область легкого ланцюга визначена, як в а), але має мутацію Q95N і мутацію T96S, і варіабельна область важкого ланцюга визначена, як в а), але має мутацію N31S - I34M;
  - ф) варіабельна область легкого ланцюга визначена, як в а), але має мутацію Q95N і мутацію T96S, і варіабельна область важкого ланцюга визначена, як в а).
  - 20 2. CD27L білок, який зв'язує антиген, за п. 1, який **відрізняється** тим, що
    - а) варіабельна область легкого ланцюга характеризується щонайменше 90% або щонайменше 95% ідентичністю з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 66 і/або
    - б) варіабельна область важкого ланцюга характеризується щонайменше 90% або щонайменше
    - 25 95% ідентичністю з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 20.
    3. CD27L білок, який зв'язує антиген, за п. 1, що включає:
      - а) варіабельну область легкого ланцюга, що включає не більше десяти або не більше п'яти приєднань, делецій або замін амінокислот в порівнянні з амінокислотною послідовністю, представлену в SEQ ID NO: 66;
      - 30 б) варіабельну область важкого ланцюга, що включає не більше десяти або не більше п'яти приєднань, делецій або замін амінокислот в порівнянні з амінокислотною послідовністю, представлену в SEQ ID NO: 20; або
      - с) варіабельну область легкого ланцюга з а) і варіабельну область важкого ланцюга з б).
    4. CD27L білок, який зв'язує антиген, за п. 1, який **відрізняється** тим, що варіабельна область легкого ланцюга включає амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 66.
    - 35 5. CD27L білок, який зв'язує антиген, за п. 1 або 4 який **відрізняється** тим, що варіабельна область важкого ланцюга включає амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 20.
    6. CD27L білок, який зв'язує антиген, за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що вказаний антигензв'язувальний білок специфічно зв'язується з CD27L людини з афінністю, яка менша або дорівнює  $2 \times 10^{-11}$  M.
    - 40 7. CD27L білок, який зв'язує антиген, за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що вказаний антигензв'язувальний білок інгібує зв'язування CD27L з CD27.
    8. CD27L білок, який зв'язує антиген, за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що вказаний антигензв'язувальний білок являє собою антитіло.
    - 45 9. CD27L білок, який зв'язує антиген, за п. 8, який **відрізняється** тим, що вказане антитіло являє собою антитіло людини.
    10. CD27L білок, який зв'язує антиген, за п. 9, що містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, причому легкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 58, і важкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 12.
    - 50 11. CD27L білок, який зв'язує антиген, за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що CD27L білок, який зв'язує антиген, являє собою біспецифічне антитіло.
    12. CD27L білок, який зв'язує антиген, за п. 11, який **відрізняється** тим, що біспецифічне антитіло зв'язується з CD27L і антигеном ефекторної клітини людини, яка являє собою CD3.
    13. CD27L білок, який зв'язує антиген, за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється**
    - 55 тим, що CD27L білок, який зв'язує антиген, являє собою фрагмент антитіла.
    14. CD27L білок, який зв'язує антиген, за п. 13, який **відрізняється** тим, що фрагмент антитіла вибраний з групи, яка складається з F(ab), Fab-фрагментів, що складаються з доменів VL, VH, CL і CH1, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> або Fd-фрагментів, які складаються з доменів CH і CH1, Fv, Fv-фрагментів, які складаються з доменів VL і VH одного антитіла, dAb-фрагментів,
    - 60 однокланових молекул Fv (scFv), біспецифічних однокланових димерів Fv, діатіл і

триатіл.

15. CD27L білок, який зв'язує антиген, за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що CD27L білок, який зв'язує антиген, кон'югований з хіміотерапевтичним агентом.

16. CD27L білок, який зв'язує антиген, за п. 15, який **відрізняється** тим, що лінкер зв'язує хіміотерапевтичний агент з CD27L білком, який зв'язує антиген.

17. CD27L білок, який зв'язує антиген, за п. 16, який **відрізняється** тим, що лінкер являє собою нерозщеплюваний лінкер.

18. CD27L білок, який зв'язує антиген, за п. 17, який **відрізняється** тим, що лінкер містить MCC.

19. CD27L білок, який зв'язує антиген, за будь-яким з пп. 16-18, який **відрізняється** тим, що хіміотерапевтичний агент кон'югований з одним або більше лізинами, що містяться в поліпептиді CD27L білка, який зв'язує антиген.

20. CD27L білок, який зв'язує антиген, за будь-яким з пп. 15-19, який **відрізняється** тим, що хіміотерапевтичний агент являє собою DM1.

21. Композиція CD27L білків, які зв'язують антиген, за п. 20, яка **відрізняється** тим, що середнє число молекул DM1 на CD27L білок, який зв'язує антиген, складає від 1 до 10.

22. Композиція CD27L білків, які зв'язують антиген, за п. 21, яка **відрізняється** тим, що середнє число молекул DM1 на CD27L білок, який зв'язує антиген, складає від 3 до 7.

23. Композиція CD27L білків, які зв'язують антиген, за п. 22, яка **відрізняється** тим, що середнє число молекул DM1 на CD27L білок, який зв'язує антиген, дорівнює від 4 до 6.

24. Композиція CD27L білків, які зв'язують антиген, за п. 22, яка **відрізняється** тим, що середнє число молекул DM1 на CD27L білок, який зв'язує антиген, становить приблизно 4,0, приблизно 4,1, приблизно 4,2, приблизно 4,3, приблизно 4,4, приблизно 4,5, приблизно 4,6, приблизно 4,7, приблизно 4,8, приблизно 4,9, приблизно 5,0, приблизно 5,1, приблизно 5,2, приблизно 5,3, приблизно 5,4, приблизно 5,5, приблизно 5,6, приблизно 5,7, приблизно 5,8, приблизно 5,9 або приблизно 6,0.

25. Композиція CD27L білків, які зв'язують антиген, за будь-яким з пп. 21-24, яка **відрізняється** тим, що вказана композиція являє собою фармацевтичну композицію, що містить терапевтично ефективну кількість CD27L білка, який зв'язує антиген.

26. Композиція CD27L білків, які зв'язують антиген, за п. 25, яка **відрізняється** тим, що вказана фармацевтична композиція ліофілізована.

27. Виділена нуклеїнова кислота, яка кодує поліпептид, причому вказаний поліпептид включає:

а) варіабельну область легкого ланцюга, що включає:

LCDR1, з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 74; LCDR2, з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 82; і LCDR3, з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 90;

б) варіабельну область легкого ланцюга, визначену в а), але з мутацією R24K і мутацією S26G, мутацією L55I, мутацією Y58F або мутацією Q95N і мутацією T96S;

с) варіабельну область важкого ланцюга, що включає:

HCDR1 з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 28; HCDR2 з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 36; і HCDR3 з амінокислотною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 44; або

д) варіабельну область важкого ланцюга, визначену в с), але з мутацією N31S і мутацією I34M.

28. Виділена нуклеїнова кислота за п. 27, яка **відрізняється** тим, що легкий ланцюг кодується нуклеїновою кислотою, що містить послідовність нуклеотидів, яка щонайменше на 80 % ідентична послідовності нуклеотидів, представлених в SEQ ID NO: 51.

29. Виділена нуклеїнова кислота за п. 28, яка **відрізняється** тим, що легкий ланцюг кодується нуклеїновою кислотою, що містить послідовність нуклеотидів, яка щонайменше на 90 % ідентична послідовності нуклеотидів, представлених в SEQ ID NO: 51.

30. Виділена нуклеїнова кислота за п. 29, яка **відрізняється** тим, що легкий ланцюг кодується нуклеїновою кислотою, що містить послідовність нуклеотидів, яка щонайменше на 95 % ідентична послідовності нуклеотидів, представлених в SEQ ID NO: 51.

31. Виділена нуклеїнова кислота за п. 30, яка **відрізняється** тим, що легкий ланцюг кодується нуклеїновою кислотою, що містить послідовність нуклеотидів, представлених в SEQ ID NO: 51.

32. Виділена нуклеїнова кислота за п. 27, яка **відрізняється** тим, що важкий ланцюг кодується нуклеїновою кислотою, що містить послідовність нуклеотидів, яка щонайменше на 80 % ідентична послідовності нуклеотидів, представлених в SEQ ID NO: 5.

33. Виділена нуклеїнова кислота за п. 32, яка **відрізняється** тим, що важкий ланцюг кодується нуклеїновою кислотою, що містить послідовність нуклеотидів, яка щонайменше на 90 % ідентична послідовності нуклеотидів, представлених в SEQ ID NO: 5.

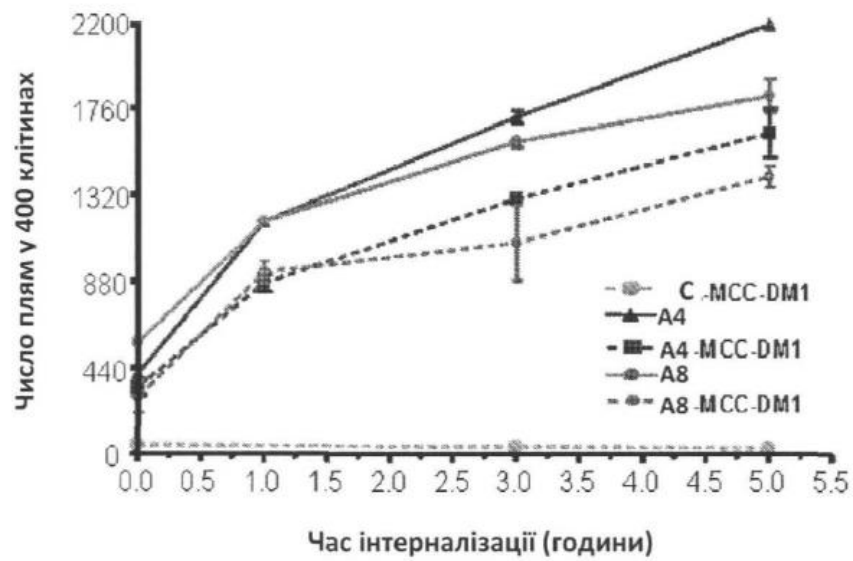
34. Виділена нуклеїнова кислота за п. 27, яка **відрізняється** тим, що важкий ланцюг кодується нуклеїновою кислотою, що містить послідовність нуклеотидів, яка щонайменше на 95 % ідентична послідовності нуклеотидів, представлений в SEQ ID NO: 5.
- 5 35. Виділена нуклеїнова кислота за п. 28, яка **відрізняється** тим, що важкий ланцюг кодується нуклеїновою кислотою, що містить послідовність нуклеотидів, представлений в SEQ ID NO: 5.
36. Експресійний вектор, що містить виділену нуклеїнову кислоту за будь-яким з пп. 27-35.
37. Експресійний вектор за п. 36, який **відрізняється** тим, що виділена нуклеїнова кислота кодує легкий ланцюг антитіла.
38. Експресійний вектор за п. 36, який **відрізняється** тим, що виділена нуклеїнова кислота кодує важкий ланцюг антитіла,
- 10 39. Експресійний вектор за п. 37, що додатково містить виділену нуклеїнову кислоту, що кодує важкий ланцюг антитіла.
40. Рекомбінантна клітина-хазяїн, яка містить виділену нуклеїнову кислоту за будь-яким з пп. 27-35, функціонально зв'язану з промотором.
- 15 41. Рекомбінантна клітина-хазяїн, що містить експресійний вектор за п. 37 або 38.
42. Рекомбінантна клітина-хазяїн за п. 41, причому вказана клітина-хазяїн містить експресійний вектор за п. 37 і 38.
43. Рекомбінантна клітина-хазяїн за п. 42, причому вказана клітина-хазяїн секретує антитіло, яке зв'язує CD27L.
- 20 44. Рекомбінантна клітина-хазяїн за будь-яким з пп. 40-43, причому вказана клітина походить з організму ссавця.
45. Рекомбінантна клітина-хазяїн за п. 44, причому вказана клітина належить до лінії клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO).
46. Спосіб отримання кон'югата антитіла до CD27L з лікарською сполукою, причому вказаний спосіб включає етапи:
- 25 а) отримання CD27L білка, який зв'язує антиген, за будь-яким з пп. 1-14;  
 б) кон'югування CD27L білка, який зв'язує антиген, з лінкером; і  
 с) кон'югування лікарського засобу з вказаним лінкером.
47. Спосіб отримання кон'югата антитіла до CD27L з лікарською сполукою, причому вказаний спосіб включає етапи:
- 30 а) отримання CD27L білка, який зв'язує антиген, за будь-яким з пп. 1-14; і  
 б) кон'югування лінкера, ковалентно зв'язаного з лікарською сполукою, з вказаним CD27L білком, який зв'язує антиген.
48. Спосіб за п. 46 або 47, який **відрізняється** тим, що CD27L білок, який зв'язує антиген, являє собою антитіло.
- 35 49. Спосіб за п. 48, який **відрізняється** тим, що антитіло містить амінокислотну послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлений в SEQ ID NO: 66, і амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлений в SEQ ID NO: 20.
50. Спосіб за п. 49, який **відрізняється** тим, що антитіло містить амінокислотну послідовність легкого ланцюга, представлений в SEQ ID NO: 58, і амінокислотну послідовність важкого ланцюга, представлений в SEQ ID NO: 12.
- 40 51. Спосіб за будь-яким з пп. 46-50, який **відрізняється** тим, що лінкер містить MCC.
52. Спосіб за будь-яким з пп. 46-51, який **відрізняється** тим, що лікарська сполука містить DM1.
53. Спосіб лікування раку, причому вказаний спосіб включає введення терапевтично ефективної кількості CD27L білка, який зв'язує антиген, за будь-яким з пп. 1-14 пацієнту, який потребує цього.
- 45 54. Спосіб за п. 53, який **відрізняється** тим, що CD27L білок, який зв'язує антиген, являє собою антитіло.
55. Спосіб за п. 54, який **відрізняється** тим, що антитіло містить амінокислотну послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлений в SEQ ID NO: 66, і амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлений в SEQ ID NO: 20.
- 50 56. Спосіб за п. 55, який **відрізняється** тим, що антитіло містить амінокислотну послідовність легкого ланцюга, представлений в SEQ ID NO: 58, і амінокислотну послідовність важкого ланцюга, представлений в SEQ ID NO: 12.
- 55 57. Спосіб за будь-яким з пп. 54-56, який **відрізняється** тим, що фармацевтична композиція містить антитіло.
58. Спосіб за п. 57, який **відрізняється** тим, що антитіло має підвищену ефекторну функцію.
59. Спосіб за п. 57, який **відрізняється** тим, що фармацевтична композиція містить популяцію кон'югатів антитіла з лікарською сполукою.



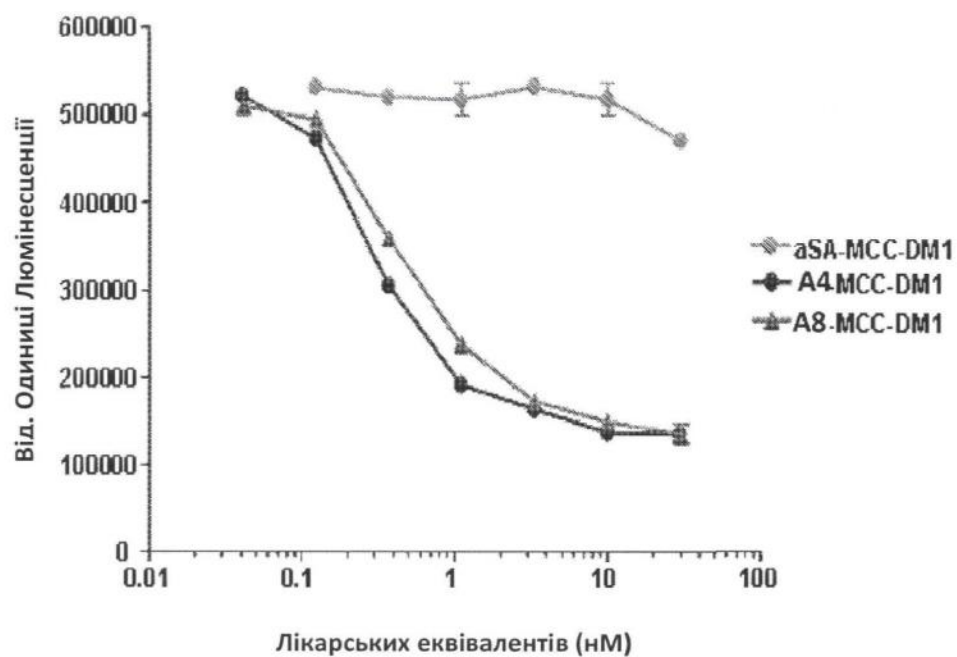
60. Спосіб за п. 59, який **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла з лікарською сполукою містить лінкер MCC.
61. Спосіб за п. 59 або 60, який **відрізняється** тим, що кон'югат антитіла з лікарською сполукою містить DM1.
- 5 62. Спосіб за п. 61, який **відрізняється** тим, що середнє число молекул DM1 на антитіло складає від 1 до 10.
63. Спосіб за п. 62, який **відрізняється** тим, що середнє число молекул DM1 на антитіло складає від 3 до 7.
- 10 64. Спосіб за п. 63, який **відрізняється** тим, що середнє число молекул DM1 на антитіло складає від 4 до 6.
65. Спосіб за п. 63, який **відрізняється** тим, що середнє число молекул DM1 на антитіло становить приблизно 4,0, приблизно 4,1, приблизно 4,2, приблизно 4,3, приблизно 4,4, приблизно 4,5, приблизно 4,6, приблизно 4,7, приблизно 4,8, приблизно 4,9, приблизно 5,0, приблизно 5,1, приблизно 5,2, приблизно 5,3, приблизно 5,4, приблизно 5,5, приблизно 5,6, приблизно 5,7, приблизно 5,8, приблизно 5,9 або приблизно 6,0.
- 15 66. Спосіб за будь-яким з пп. 53-65, який **відрізняється** тим, що взятий у пацієнта зразок досліджують на експресію CD27L.
67. Спосіб за п. 66, який **відрізняється** тим, що зразок досліджують на експресію мРНК CD27L.
68. Спосіб за п. 66, який **відрізняється** тим, що зразок досліджують на експресію білка CD27L.
- 20 69. Спосіб за будь-яким з пп. 66-68, який **відрізняється** тим, що зразок являє собою зразок крові.
70. Спосіб за будь-яким з пп. 66-68, який **відрізняється** тим, що зразок являє собою біоптат.
71. Спосіб за будь-яким з пп. 53-70, який **відрізняється** тим, що рак являє собою нирковоклітинні карциноми (НKK), світлоклітинну НKK, рак голови і шиї, гліобластому, рак молочної залози, пухлину мозку, назофарингеальну карциному, неходжкінську лімфому (НХЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ), хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), лімфому Беркитта, анапластичні великоклітинні лімфоми (ALCL), множинні міеломи, Т-клітинні лімфоми шкіри, вузликові дрібноклітинні лімфоми з розсіченими ядрами, лімфоцитарні лімфоми, периферичні Т-клітинні лімфоми, Лімфоми Ленерта, імунобластну лімфому, Т-клітинний лейкоз/лімфому (ATLL), Т-клітинний лейкоз дорослих (T-ALL), ентробластну/центроцитарну (cb/cc) фолікулярну злоякісну лімфому, дифузну В-великоклітинну лімфому, Т-клітинну лімфому по типу ангіоімунобластної лімфаденопатії (AILD), асоційовану з ВІЛ лімфому черевної порожнини, ембріональну карциному, недиференційовану карциному носоглотки, хворобу Кастлемана, саркому Капоші, множинні міеломи, макроглобулінемію Вальденстрема або інші В-клітинні лімфоми.
- 25 72. Спосіб за п. 71, який **відрізняється** тим, що рак являє собою НKK.
73. Спосіб за п. 71, який **відрізняється** тим, що рак являє собою НХЛ.
74. Спосіб за п. 71, який **відрізняється** тим, що рак являє собою ХЛЛ.
75. Спосіб лікування аутоімунного або запального порушення, причому вказаний спосіб включає введення терапевтично ефективної кількості CD27L білка, який зв'язує антиген, за будь-яким з пп. 1-14 пацієнту, який потребує цього.
- 40 76. Спосіб за п. 75, який **відрізняється** тим, що CD27L білок, який зв'язує антиген, являє собою антитіло.
77. Спосіб за п. 76, який **відрізняється** тим, що антитіло містить амінокислотну послідовність варіабельної області легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO: 66, і амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO: 20.
- 45 78. Спосіб за п. 75, який **відрізняється** тим, що антитіло містить амінокислотну послідовність легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO: 58, і амінокислотну послідовність важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO: 12.
- 50 79. Спосіб за п. 75, який **відрізняється** тим, що вказаний антиген зв'язувальний білок інгібує зв'язування CD27 з CD27L.
80. Спосіб за будь-яким з пп. 75-79, який **відрізняється** тим, що аутоімунне або запальне порушення являє собою системний червоний вовчак (СЧВ), інсулінозалежний цукровий діабет (IDDM), запальну хворобу кишечника (ЗХК, IBD), розсіяний склероз (РС), псоріаз, аутоімунний тиреоїдит, ревматоїдний артрит (РА) або гломерулонефрит.
- 55 81. Спосіб за будь-яким з пп. 75-79, який **відрізняється** тим, що лікування пригнічує або запобігає відторгненню трансплантата у пацієнта.
82. Спосіб за будь-яким з пп. 75-79, який **відрізняється** тим, що лікування пригнічує хворобу трансплантат проти хазяїна (GVHD, ТПХ).

	Eniron Bin	Афінність Hu Biacore K <sub>D</sub> нМ	Нативні клітини Авдн. ЕС50 нМ	Суно Авдн. ЕС50 нМ	АЗКЦ ЕС50 нМ	АЗКФ ЕС50 нМ	КЗЦ # ЕС50 нМ	Інтерналізація Т ½ (години)
Химерне антитіло миші до CD27L людини	3	1.25	0.60	2.22	0.195	2.17	2.64	0.41
Ab1	1	0.62	0.32	0.05	0.021	1.12	1.0	1.03
Ab2	1	0.59	0.24	0.24	0.034	1.19	1.17	0.69
Ab3	1	4.35	4.18	2.80	0.715	64.8	10.6	0.49
Ab4	3	3.05	0.25	0.48	0.332	1.55	1.54	0.30
Ab5	2	10.4	0.66	1.40	0.422	2.36	5.28	0.75
Ab6	4	6.06	0.87	0.87	0.167	1.88	4.20	1.08
Ab7	4	0.71	0.18	0.43	0.076	0.80	0.64	0.43
Ab8	2	10.8	0.09	0.34	> 67	1.60	> 67	1.81

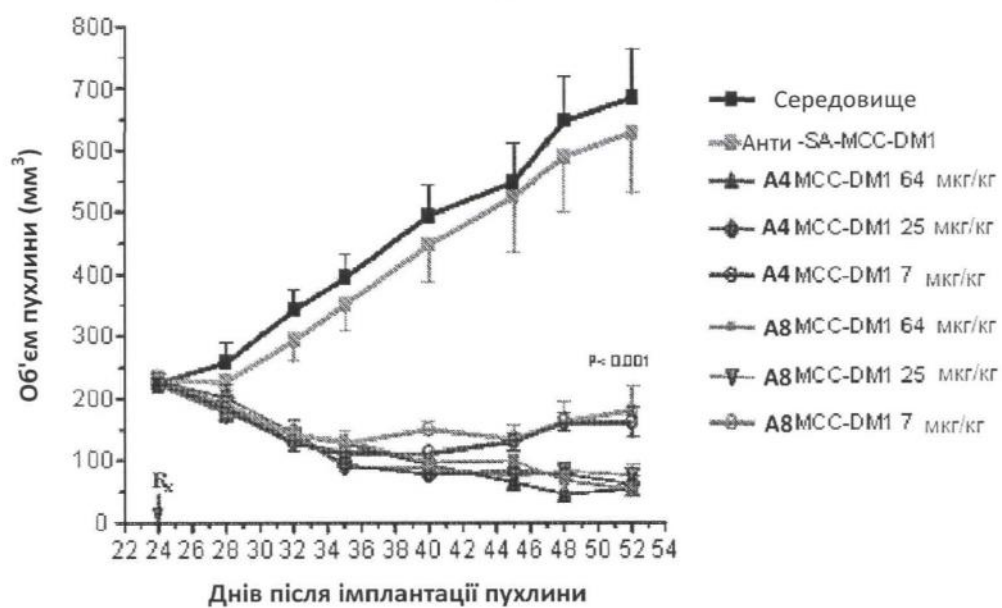
Фіг. 1



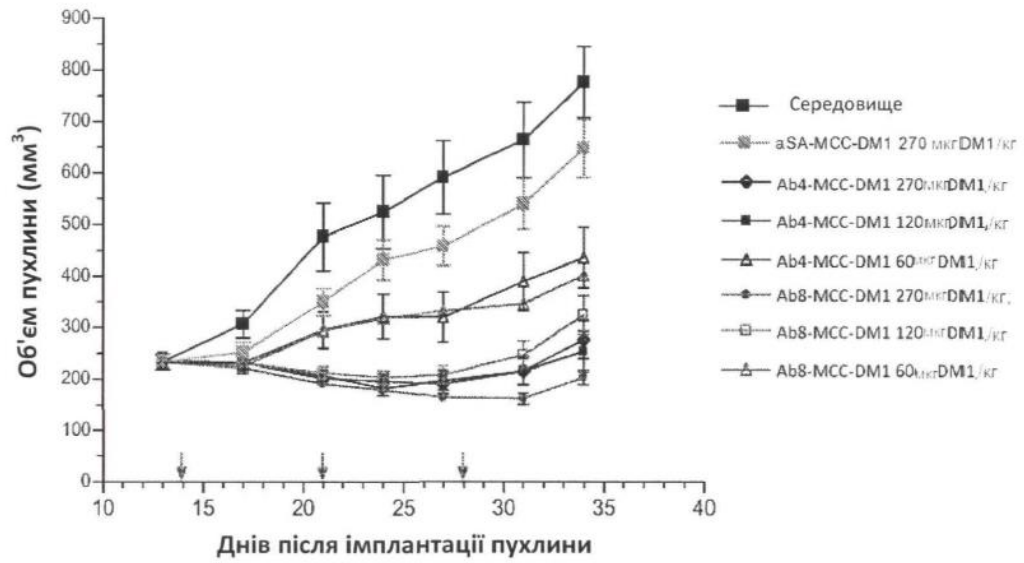
Фіг. 2



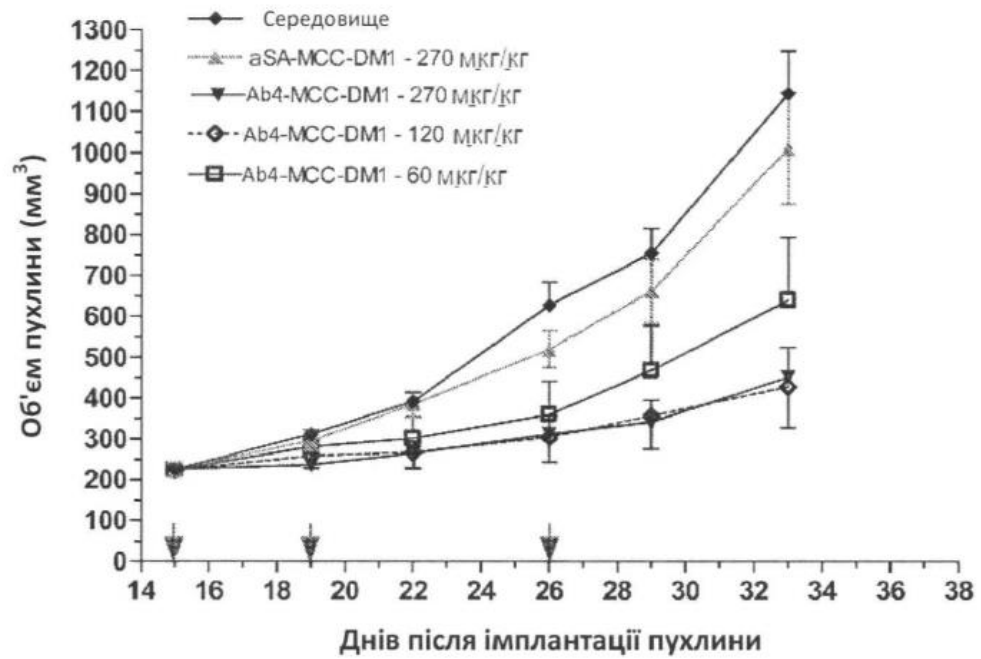
Фіг. 3



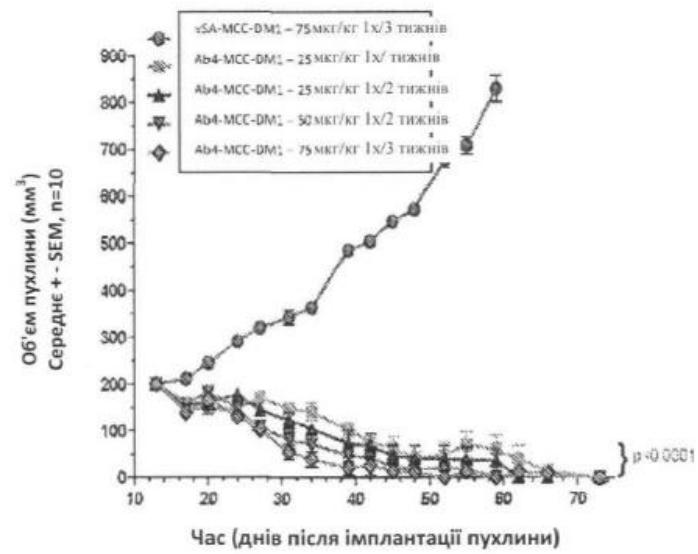
Фіг. 4



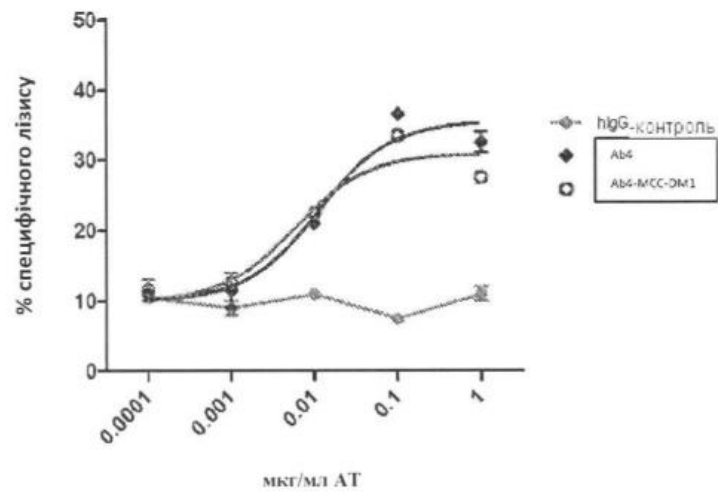
Фіг. 5



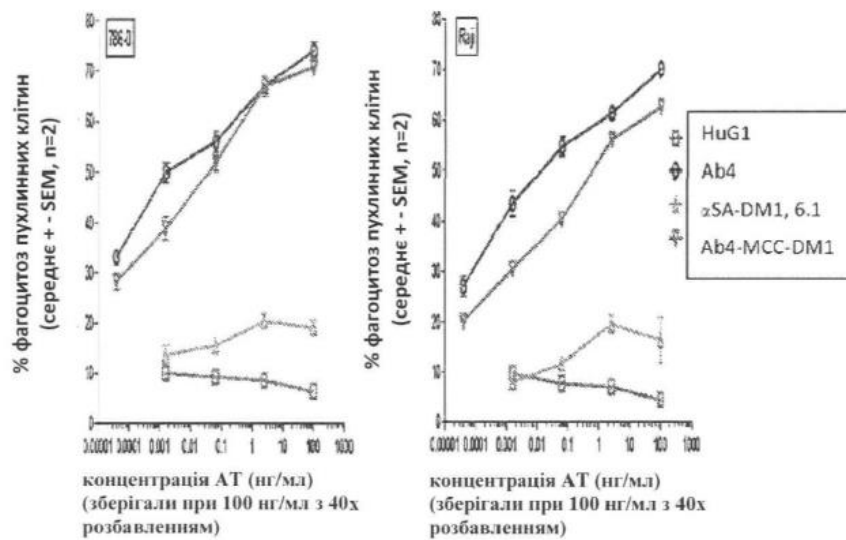
Фіг. 6



Фіг. 7

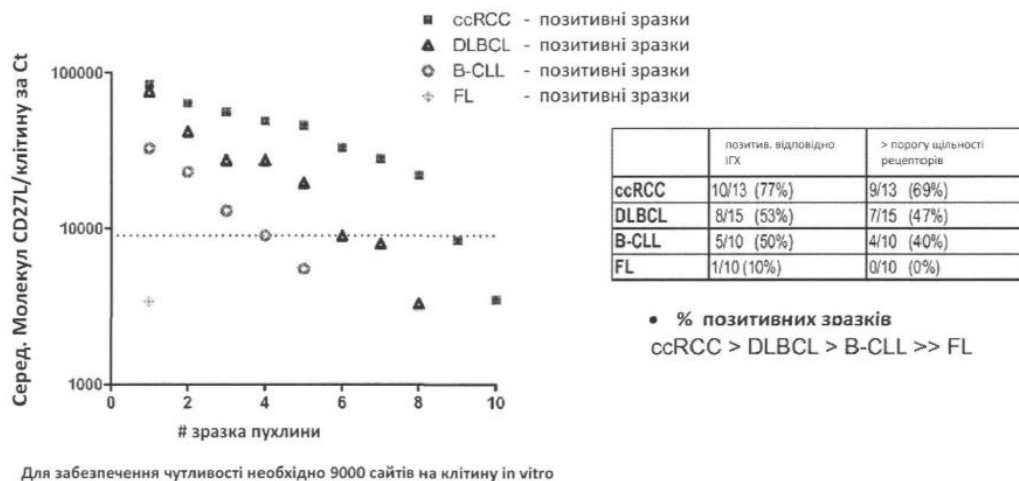


Фіг. 8



Фіг. 9

Порівняння CD27L експресії (помічені сайти/клітина) для первинних заморожених зразків пухлини, що визначені «позитивним» маскованим IHC



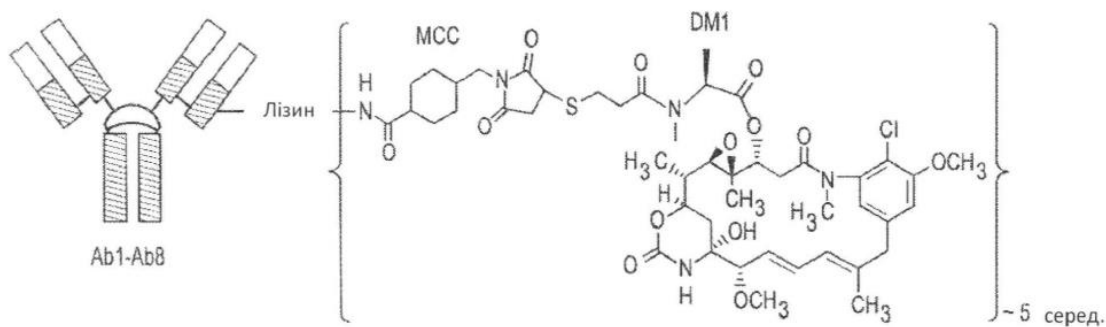
Фіг. 10

Тип пухлини	Експресія мРНК		ІГХ	Експресія білка		
	Література	Amgen		Потокова цитометрія		Amgen
пк ПКК						
з ОСТ.			100% (n=41/41)	100% (n=13/13)		
свіжозамороз.	86% (n=6/7) 100% (n=10/10)	90% (n=44/49) 94% (n=44/47)			n.d.	n.d.
FFPE			52% (n=189/230)			
Підгрупи В-НХЛ						
Дифуз. В-великоклітинна лімфома	85% (n=335/414)	100% (n=30/30) 100% (n=15/15)	71% (n=15/21)	67% (n=10/15)	n.d.	n.d.
Фолікулярна лімфома	n.d.	64% (n=21/33) 100% (n=10/10)	33% (n=6/18)	50% (n=5/10)	n.d.	n.d.
Лімфома мантийних клітин	n.d.	100% (n=10/10)	25% (n=1/4)	n.d.	n.d.	n.d.
Хроніч. лейкоцит. лейкоз	n.d.	75% (n=21/28) 90% (n=9/10)	50% (n=3/6)	50% (n=5/10)	90% (17/19)	100% (11/11)

Результати для мРНК Amgen показують від 35 до 50% зразків плоскоклітинного раку голови і шиї (в першу чергу, стравоходу) і приблизно 14% зразків пацієнтів із раком яєчника експресують CD27L; 40% папілярної ПКК експресує CD27L

ІГХ = імуногістохімія;  
qPCR = кількість ПЛР;  
n.d. = не визначено.

Фіг. 11



Фіг. 12

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601