



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119226** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2014 05805</p> <p>(22) Дата подання заявки: 05.11.2012</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 27.05.2019</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 11306416.6</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 03.11.2011</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.09.2014, Бюл.№ 17</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.05.2019, Бюл.№ 10</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/EP2012/071833, 05.11.2012</p>	<p>(72) Винахідник(и): Бо-Ларвор Шарлотт (FR), Гьотш Ліліан (FR), Бут Ніколя (FR)</p> <p>(73) Власник(и): ПЬЕР ФАБР МЕДІКАМЕНТ, 45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt, France (FR)</p> <p>(74) Представник: Новікова Лідія Аркадіївна, реєстр. №36</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: YE X. et al. An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies. <i>Oncogene</i>, 2010, Vol. 29, no. 38, P. 5254 - 5264 WO 2011091305 A2, 28.07.2011 WO 2011014457 A1, 03.02.2011 WO 2010130751 A1, 18.11.2010 EP 22283921, 15.09.2010 WO 2009062690 A1, 22.05.2009 EP 2270053 A1, 05.01.2011 WO 2010014755 A1, 04.02.2010 ZHANG YI-XIANG et al. AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. <i>Cancer research</i>, AACR, US Philadelphia, PA, 2008, Vol. 68, no. 6, P. 1905 – 1915 LIU REN et al. Induction, regulation, and biologic function of Axl receptor tyrosine kinase in Kaposi sarcoma. <i>Blood</i>, 2010, Vol. 116, no. 2, P. 297 – 305 LI Y. et al. Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis. <i>Oncogene</i>, Nature publishing group, GB, 2009, Vol. 28, no. 39, P. 3442 – 3455</p>
--	--

(54) АНТИТІЛО, ЯКЕ СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З AXL, ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ ЯК ПРОДУКТУ ДЛЯ АДРЕСНОЇ ДОСТАВКИ ПРИ ЛІКУВАННІ РАКУ

(57) Реферат:

UA 119226 C2

Винахід стосується антитіла, яке специфічно зв'язуватися з білком Axl, застосування такого антитіла, імунокон'югата, що містить таке антитіло, застосування імунокон'югата, фармацевтичної композиції та гібридоми, яка продукує таке антитіло.

Даний винахід стосується нового антигензв'язувального білка, зокрема моноклонального антитіла, здатного специфічно зв'язуватися з білком Axl, а також амінокислотної та нуклеотидної послідовностей, що кодують вказаний білок. В одному аспекті винахід стосується нового антигензв'язувального білка або антигензв'язувальних фрагментів, здатних специфічно зв'язуватися з Axl і, викликаючи інтерналізацію Axl, зазнавати інтерналізації в клітину. Винахід також стосується застосування вказаного антигензв'язувального білка як продукту для адресної доставки при кон'югації з іншими протипухлинними сполуками, такими як токсини, радіоактивні елементи або лікарські засоби, а також його застосування при лікуванні деяких форм раку.

"Axl" (також позначуваний "Ufo", "Ark" або "Tyro7") був клонований з клітин пацієнтів з хронічним мієлоїдним лейкозом як онкоген, який при надекспресії в мишачих NIH3T3 викликав трансформацію цих клітин. Він належить до сімейства рецепторів, що мають тирозинкіназну активність (RTK, від англ. receptor tyrosine kinases), яке носить назву сімейства TAM (Tyro3, Axl, Mer), що включає Tyro3 (Rse, Sky, Dtk, Etk, Brt, Tif), Axl та Mer (Eyк, Nyк, Tyro-12) [Lemke G. *Nat. Rev. Immunol.* (2008).8, 327-336].

Людський білок Axl є білком, що складається з 894 амінокислот, послідовність якого представлена послідовністю SEQ ID NO. 29. Амінокислоти 1-25 відповідають сигнальному пептиду, а людський білок Axl без вказаного сигнального пептиду представлений амінокислотою послідовністю SEQ ID NO. 30.

Gas6, спочатку виділений як ген блокування росту, є спільним лігандом для представників сімейства TAM [Varnum B.C. et al. *Nature* (1995).373, 623-626]. Gas6 має найбільшу афінність до Axl, за ним йде Tyro3 і, зрештою, Mer [Nagata K. et al. *J. Biol. Chem.* (1996).271, 30022-30027]. Gas6 містить домен, багатий γ -карбоксиглутаміною кислотою (Gla), який опосередковує зв'язування з фосфоліпідними мембранами, чотири домени, подібних епідермальному фактору росту, та два ламінін G-подібних (LG, від англ. laminin G-like) домени [Manfioletti G., Brancolini, C., Avanzi, G. & Schneider, C. *Mol. Cell Biol.* (1993).13, 4976-4985]. Як і у багатьох інших RTK, зв'язування ліганду приводить до димеризації рецептора та аутофосфорилювання залишків тирозину (тирозинові залишки 779, 821 та 866 рецептора Axl), які служать сайтами приєднання множини внутрішньоклітинних сигнальних молекул [Linger R.M. *Adv. Cancer Res.* (2008).100, 35-83]. Крім того, рецептор Axl може активуватися при ліганд-незалежних процесах. Така активація може мати місце при надекспресії рецептора Axl.

Відомо, що сигнальний шлях Gas6/Axl регулює різні клітинні процеси у цілому ряду клітин *in vitro*, включаючи клітинну проліферацію, адгезію, міграцію та виживаність [Hafizi S. & Dahlback, B. *FEBS J.* (2006).273, 5231-5244]. Крім того, рецептори TAM беруть участь в контролюванні природженого імунітету; вони інгібують запальні відповіді на патогени у дендритних клітин (ДК) та макрофагів. вони також сприяють фагоцитозу апоптотичних клітин цими клітинами імунної системи та є необхідними для дозрівання та цитолітичної активності природних кілерних (NK, від англ. natural killer) клітин [Lemke G. *Nat. Rev. Immunol.* (2008).8, 327-336].

При слабкій експресії нормальними клітинами, він переважно виявляється на фібробластах, мієлоїдних клітинах-попередниках, макрофагах, нервовій тканині, серцевій та скелетній мускулатурі, де він переважно підтримує виживаність клітин. Система Gas6/Axl відіграє важливу роль в судинній біології, регулюючи гомеостаз гладком'язових клітин судинної стінки [Korshunov V.A., Mohan, A.M., Georger, M.A. & Berk, B.C. *Circ. Res.* (2006).98, 1446-1452; Korshunov V.A., Daul, M., Massett, M.P. & Berk, B.C. *Hypertension* (2007).50, 1057-1062].

Axl відіграє важливу роль в регуляції інвазії та міграції пухлинних клітин. Надекспресія Axl асоційована не тільки з несприятливим прогнозом, але також з підвищеною пухлинною інвазією при різних формах раку людини, яка описана для раку молочної залози, товстої кишки, карциноми стравоходу, гепатоцелюлярної карциноми, раку шлунка, гліоми, раку легені, меланоми, остеосаркоми, раку яєчників, передміхурової залози, рабдоміосаркоми, раку нирки, щитоподібної залози та раку ендометрія матки [див. огляди Linger R.M. *Adv. Cancer Res.* (2008).100, 35-83, та Verma A. *Mol. Cancer Ther.* (2011).10, 1763-1773]. При раку молочної залози Axl є потужним ефектором епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП); механізм ЕМП відіграє важливу роль в міграції та дисемінації пухлинних клітин в організмі [Thiery J.P. *Curr. Opin. Cell Biol.* (2003).15, 740-746].

Також було показано, що Axl регулює ангіогенез. Дійсно, інактивація (нокдаун) Axl в ендотеліальних клітинах порушує формування мікротрубочок та міграцію [Holland S.J. et al. *Cancer Res.* (2005).65, 9294-9303], а також порушує роботу певних сигнальних шляхів, що беруть участь в регуляції ангіогенезу [Li Y. et al. *Oncogene* (2009).28, 3442-3455].

Зовсім недавно в декількох дослідженнях з використанням ряду клітинних моделей було продемонстровано, що надекспресія Axl зв'язана з феноменом резистентності до лікарських препаратів. В наведеній нижче Таблиці 1 узагальнені дані цих досліджень.

Таблиця 1

Публікація	Форма раку	Терапевтичний агент	Клітинна модель
Macleod et al., 2005	Рак яєчників	Цисплатин	PE01/PE01CDDP
Mahadevan et al., 2007	Стромальна пухлина ШКТ	Іматиніб (інгібітор c-kit/PDGFR)	GIST882 >GIST-R
Lay et al., 2007	Недрібноклітинний рак легені	Доксорубіцин	Клони CL-1 Клони CL1-5F4
Hong et al., 2008	Гострий мієлоцитарний лейкоз	Доксорубіцин/Цисплатин	U937
Liu et al., 2009	Рак молочної залози	Лапатиніб (інгібітор HER1 та HER2)	HER2 (+) BT474 (J4)
Keating et al., 2010	Астроцитوما	Темозоломід Карбоплатин Вінкрисин	G12 A172
Ye et al., 2010	Недрібноклітинний рак легені	Ерлотиніб	HCC827

У Таблиці 1 згадуються такі публікації:

- Macleod, K. et al. Cancer Res. (2005).65, 6789-6800
- Mahadevan D. et al. Oncogene (2007).26, 3909-3919
- Lay J.D. et al. Cancer Res. (2007).67, 3878-3887
- Hong C.C. et al. Cancer Lett. (2008).268, 314-324
- Liu L. et al. Cancer Res. (2009).69, 6871-6878
- Keating A.K. et al. Mol. Cancer Ther. (2010).9, 1298-1307
- Ye X. et al. Oncogene (2010).29, 5254-5264

У зв'язку з цим, Axl RTK є мішенню, цікавою з погляду онкології. Декілька груп дослідників вже розробили протипухлинні стратегії, націлені на вісь *gas6/Axl*, в яких використовуються голі моноклональні антитіла або низькомолекулярні інгібітори [Verma A. Mol. Cancer Ther. (2011).10, 1763-1773].

В першому втіленні винахід стосується антигензв'язувального білка або його антигензв'язувального фрагмента, який i) специфічно зв'язується з людським білком Axl, та ii) зазнає інтерналізації після його зв'язування з вказаним людським білком Axl.

Загалом, винахід стосується застосування білка Axl для відбору антигензв'язувального білка або його антигензв'язувального фрагмента, здатних зазнавати інтерналізації після зв'язування з вказаною мішенню Axl. Більш конкретно, вказана мішень є позаклітинним доменом Axl.

Таким чином, цей конкретний аспект даного винаходу стосується способу проведення скринінгу *in vitro* по відношенню до сполуки або її зв'язувального фрагмента, здатних здійснювати доставку в клітини ссавців або інтерналізацію клітинами ссавців молекули, що представляє інтерес, де вказана молекула, що представляє інтерес, ковалентно зв'язана з вказаною сполукою, при цьому вказаний спосіб включає такі етапи:

а) відбір сполуки, здатної специфічно зв'язуватися з білком Axl або його позаклітинним доменом (ECD) або його епітопом;

б) можливо, ковалентне зв'язування вказаної молекули, що представляє інтерес, або молекули, що служить контролем, з вказаною сполукою, відібраною на етапі а), з утворенням комплексу;

с) приведення в контакт вказаної сполуки, відібраної на етапі а), або вказаного комплексу, одержаного на етапі б), з клітиною ссавця, краще, з життєздатною клітиною, що експресує на своїй поверхні білок Axl або його функціональний фрагмент;

д) визначення, чи були вказана сполука або вказана молекула, що представляють інтерес, або вказаний комплекс, доставлені усередину клітини або чи зазнали інтерналізації вказаною клітиною ссавця; та

е) відбір вказаної сполуки як сполуки, здатної забезпечувати доставку в життєздатну клітину ссавця або інтерналізацію життєздатною клітиною ссавця молекули, що представляє інтерес.

В кращому втіленні вказана сполука, здатна забезпечувати доставку в життєздатну клітину ссавця або інтерналізацію життєздатною клітиною ссавця молекули, що представляє інтерес, є білком (також називаним в даному документі поліпептидом або пептидом) або подібною до білка сполукою, що має пептидну структуру, зокрема, амінокислотною послідовністю з принаймні 5, 10, 15 чи більше амінокислотних залишків, де вказані амінокислотні залишки можуть бути глікозиловані.

Коли вказана сполука, здатна забезпечувати доставку в життєздатну клітину ссавця або

інтерналізацію життєздатною клітиною ссавця молекули, що представляє інтерес, є білком або подібною до білка сполукою, вказана сполука в даному документі також називається "антигензв'язувальним білком", де вказаний антигензв'язувальний білок або його зв'язувальний фрагмент здатні:

- 5 - i) специфічно зв'язуватися з білком Axl, краще, з людським білком Axl, та
- ii) зазнавати інтерналізації в клітину ссавця після зв'язування з вказаним білком Axl, коли вказаний білок Axl експресується на поверхні вказаної клітини ссавця.

В кращому втіленні вказана життєздатна клітина ссавця є людською клітиною, краще, клітиною, що характеризується природною експресією білкового рецептора Axl.

- 10 В конкретному втіленні життєздатні клітини ссавців на етапі с) є клітинами ссавців, що експресують на своїй поверхні рекомбінантний білок (рекомбінантні білки) Axl.

В іншому кращому втіленні вказана молекула, що представляє інтерес, є цитотоксичною молекулою (також називаною в даному документі цитотоксичним або цитостатичним агентом).

- 15 В іншому кращому втіленні вказана молекула, що представляє інтерес, ковалентно зв'язана з вказаною сполукою, здатною зв'язувати білок Axl, за допомогою лінкера, ще краще, пептидного лінкера, ще краще розщеплюваного пептидного лінкера, ще краще, лінкера, який може розщеплюватися під дією природних внутрішньоклітинних компонентів, що містяться в клітинах ссавців, зокрема, в цитозолі вказаних клітин ссавців.

- 20 В ще одному кращому втіленні вказана сполука, здатна зв'язувати білок Axl, є антитілом або його функціональним зв'язувальним фрагментом, специфічними по відношенню до білка Axl або по відношенню до його епітопа, розташованого в складі позаклітинного домену Axl.

- Етап відбору згідно е) можна здійснювати будь-яким способом, відомим фахівцям в даній області, для оцінки внутрішньоклітинної доставки або інтерналізації. Дослідження або аналіз, здатні продемонструвати або оцінити наявність, відсутність або активність вказаної сполуки, здатної специфічно зв'язувати білок Axl, або вказаного комплексу, утвореного вказаною сполукою та вказаною молекулою, що представляє інтерес, або вказаної молекули, що представляє інтерес, ковалентно зв'язаної з вказаною сполукою, є добре відомими фахівцям (див. деякі приклади таких аналізів або досліджень, які розкриті нижче, але не є вичерпними).
- 25

- Більш конкретно, ці аналізи або дослідження можна здійснювати з використанням методу FACS (від англ. fluorescence-activated cell sorting, флуоресцентне сортування клітин), імунофлуоресцентних методів, протокової цитометрії, вестерн-блотингу, дослідження цитотоксичного/цитостатичного ефекту і т.д.
- 30

- В цьому аспекті даний винахід також стосується способу одержання in vitro цитотоксичного або цитостатичного комплексу, здатного забезпечувати доставку цитотоксичного компонента в клітину ссавця, краще, життєздатну клітину, де вказаний спосіб включає етапи:
- 35

- ковалентного зв'язування цитотоксичного агента зі сполукою, яка:
- i) є здатною специфічно зв'язувати білок Axl, краще білок Axl людини, та
- ii) зазнає інтерналізації клітиною ссавця після зв'язування з вказаним білком Axl, причому вказаний білок Axl експресується на поверхні вказаної клітини ссавця.
- 40

Краще, вказана сполука є подібною до білка сполукою, ще краще, антитілом, яке є специфічним по відношенню до білка Axl або по відношенню до його епітопа, розташованого в позаклітинному домені Axl, або функціонального зв'язувального фрагмента вказаного антитіла.

- В кращому втіленні вказаний цитотоксичний агент ковалентно зв'язаний з вказаним антитілом до Axl або його функціональним фрагментом за допомогою лінкера, ще краще пептидного лінкера, ще краще розщеплюваного пептидного лінкера, ще краще лінкера, який може бути розщеплений, наприклад, під дією природних внутрішньоклітинних сполук, що не має обмежувального характеру.
- 45

- Як і у інших представників сімейства TAM, позаклітинний домен (ECD) Axl має будову, близьку до будови позаклітинного домену адгезивних молекул. Позаклітинний домен Axl містить два імуноглобулін-подібних домени, до яких примикають два фібронектин III-подібних домени [O'Bryan J.P. et al. Mol. Cell Biol. (1991).11, 5016-5031]. Для зв'язування ліганду Gas6 достатньо двох N-кінцевих імуноглобулін-подібних доменив [Sasaki T. et al. EMBO J. (2006).25, 80-87].
- 50

- Позаклітинний домен людського білка Axl є фрагментом з 451 амінокислотних залишків, що відповідають амінокислотам 1-451 послідовності SEQ ID NO. 29, ця послідовність представлена в переліку послідовностей як SEQ ID NO. 31. Амінокислоти 1-25 відповідають сигнальному пептиду, позаклітинний домен людського білка Axl без сигнального пептиду відповідає амінокислотам 26-451 послідовності SEQ ID NO.29 та представлений послідовністю SEQ ID NO. 32.
- 55

- На даний момент виявлено декілька способів інтерналізації. Вони визначають шлях білків або білкових комплексів, що зазнали інтерналізації, у клітині. Після ендоцитозу більшість
- 60

мембранних білків або ліпідів повертаються на клітинну поверхність (рециркуляція), але деякі мембранні компоненти надходять в пізні ендосоми або комплекс Гольджі [Maxfield F.R. & McGraw, T.E. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. (2004).5, 121-132].

В кращому втіленні винахід стосується антигензв'язувального білка або його антигензв'язувального фрагмента, який i) специфічно зв'язується з людським білком Axl, та ii) зазнає інтерналізації після зв'язування з вказаним людським білком Axl, вказаний антигензв'язувальний білок містить принаймні амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з послідовностей SEQ ID NOs. 1-14 або будь-якої послідовності, ідентичної принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовностям SEQ ID NOs. 1-14.

В найкращому втіленні винахід стосується антигензв'язувального білка або його антигензв'язувального фрагмента, який

i) специфічно зв'язується з людським білком Axl, який краще має послідовність SEQ ID NO. 29 або 30 або природний варіант його послідовності, та

ii) зазнає інтерналізації після зв'язування з вказаним людським білком Axl, вказаний антигензв'язувальний білок містить принаймні амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NOs. 1-14.

"Зв'язувальний білок" або "антигензв'язувальний білок" є пептидним ланцюгом, який має специфічну або загальну афінність до іншого білка або молекули (яка звичайно називається антигеном). Білки приводять в контакт і вони утворюють комплекс, коли зв'язування є можливим. Антигензв'язувальний білок за винаходом краще може бути антитілом, фрагментом або похідним антитіла, білка або пептиду, але не вичерпується цими прикладами.

Під "антигензв'язувальним фрагментом" антигензв'язувального білка за винаходом розуміють будь-який пептид, поліпептид або білок, який зберігає здатність специфічно зв'язуватися з мішенню (як правило, також називаюся антигеном), і який містить амінокислотну послідовність принаймні з 5 суміжних амінокислотних залишків, принаймні з 10 суміжних амінокислотних залишків, принаймні з 15 суміжних амінокислотних залишків, принаймні з 20 суміжних амінокислотних залишків, принаймні з 25 суміжних амінокислотних залишків, принаймні з 40 суміжних амінокислотних залишків, принаймні з 50 суміжних амінокислотних залишків, принаймні з 60 суміжних амінокислотних залишків, принаймні з 70 суміжних амінокислотних залишків, принаймні з 80 суміжних амінокислотних залишків, принаймні з 90 суміжних амінокислотних залишків, принаймні зі 100 суміжних амінокислотних залишків, принаймні зі 125 суміжних амінокислотних залишків, принаймні зі 150 суміжних амінокислотних залишків, принаймні зі 175 суміжних амінокислотних залишків, принаймні з 200 суміжних амінокислотних залишків або принаймні з 250 суміжних амінокислотних залишків амінокислотної послідовності антигензв'язувального білка.

В кращому втіленні, у якому антигензв'язувальний білок є антитілом, такі "антигензв'язувальні фрагменти" вибрані з групи, що складається з Fv, scFv (sc позначає однокланцюговий, від англ. single chain), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc фрагментів або діател або будь-яких фрагментів, час напівжиття яких збільшений шляхом хімічної модифікації, наприклад, такої як додавання полі(алкілен)гліколю, такого як полі(етилен)гліколь ("пегілювання") (пегілювані фрагменти позначають Fv-ПЕГ, scFv-ПЕГ, Fab-ПЕГ, F(ab')₂-ПЕГ або Fab'-ПЕГ) ("ПЕГ" позначає Полі(Етилен)Гліколь), або шляхом включення в ліпосоми, при цьому вказані фрагменти містять принаймні один з CDR, притаманних антителу за винаходом. Краще, вказані "антигензв'язувальні фрагменти" будуть складатися з або будуть містити частину варіабельної ділянки послідовності важкого або легкого ланцюга антитіла, з якого вони одержані, вказана частина послідовності є достатньою для збереження такої саме специфічності зв'язування, що й у антитіла, з якого вони походять, та достатньою афінності до мішені, краще принаймні рівної 1/100, ще краще принаймні 1/10 від афінності антитіла, з якого вони походять. Такий функціональний фрагмент буде містити як мінімум 5 амінокислот, краще 10, 15, 25, 50 та 100 послідовних амінокислот послідовності антитіла, з якого він походить.

Термін "епітоп" позначає ділянку антигену, зв'язану з антигензв'язувальним білком, включаючи антитіла. Епітопи можна охарактеризувати як структурні або функціональні. Функціональні епітопи звичайно є підгрупою структурних епітопів та мають залишки, які роблять безпосередній внесок в афінність зв'язування. Епітопи можуть також бути конформаційними, тобто складатися з амінокислот, розташованих нелінійно. В деяких втіленнях епітопи можуть включати детермінанти, які є хімічно активними поверхневими групами молекул, таких як амінокислоти, вуглеводні бічні ланцюги, фосфорильні групи або сульфонільні групи і, в деяких втіленнях, можуть мати визначену тривимірну структуру та/або визначений заряд.

В даному описі епітоп локалізується в позаклітинному домені людського білка Axl.

Згідно з кращим втіленням винаходу, антигензв'язувальний білок або його

антигензв'язувальний фрагмент специфічно зв'язується з епітопом, локалізованим в позаклітинному домені людського білка Axl, який краще має послідовність SEQ ID NO. 31 або 32 або природний варіант його послідовності.

Поняття "специфічне зв'язування", "специфічно зв'язується" тощо означають, що антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент утворює комплекс з антигеном, який є відносно стабільним у фізіологічних умовах. Специфічне зв'язування можна охарактеризувати рівноважною константою дисоціації, рівною принаймні приблизно 1×10^{-6} М чи менше. Способи визначення специфічного зв'язування двох молекул є добре відомими в області техніки та включають, наприклад, рівноважний діаліз, поверхневий плазмонний резонанс тощо. Щоб уникнути сумнівів, це не означає, що вказаний антигензв'язувальний фрагмент не може зв'язуватися або взаємодіяти з іншим антигеном в низьких концентраціях. Тим не менш, в кращому втіленні вказаний антигензв'язувальний фрагмент зв'язується тільки з вказаним антигеном.

В цьому контексті "EC₅₀" позначає 50 % ефективну концентрацію. Більш конкретно, термін напівмаксимальна ефективна концентрація (EC₅₀) відповідає концентрації ліків, антитіла або токсичної речовини, яка викликає відповідь, яка має значення посередині між базовою лінією та максимумом після певного визначеного часу впливу. Її часто використовують як показник ефективності ліків. Таким чином, значення EC₅₀ безперервної кривої "доза-ефект" є концентрацією сполуки, при якій спостерігається ефект, який становить 50 % від максимального. EC₅₀ дискретної кривої "доза-ефект" є концентрацією сполуки, що викликає очікуваний ефект у 50 % особин популяції після визначеної тривалості впливу. Залежність ефекту від концентрації, як правило, описується сигмоїдною кривою, і ефективність різко зростає при відносно невеликій зміні концентрації. Її можна вивести математично при проведенні лінії найкращої відповідності.

В кращому втіленні даного винаходу визначення EC₅₀ характеризує ефективність зв'язування антитіла з позаклітинним доменом Axl, експресованого пухлинними клітинами. Показник EC₅₀ визначають за допомогою FACS-аналізу. Показник EC₅₀ відображає концентрацію антитіла, при якій зв'язування з людським Axl, експресованим пухлинними клітинами, становить 50 % від максимально можливого. Кожне значення EC₅₀ визначають як середню точку на кривій залежності "доза-ефект", за допомогою програми для побудови чотирипараметричної регресійної моделі (прикладна програма Prism). Цей показник вибраний як репрезентативний для фізіологічних/патологічних станів.

У втіленні винаходу антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент зв'язуються зі своїм епітопом із значенням EC₅₀, рівним принаймні 10^{-9} М, краще між 10^{-9} та 10^{-12} М.

Інше втілення винаходу є процесом або способом для відбору антигензв'язувального білка або його антигензв'язувального фрагмента, здатних зазнавати внутрішньоклітинної інтерналізації клітиною ссавця, краще людською клітиною, краще життєздатною клітиною, що включає етапи:

- i) відбору антигензв'язувального білка, який специфічно зв'язується з Axl, краще з його позаклітинним доменом або його епітопом; і
- ii) відбору вказаного антигензв'язувального білка з попереднього етапу i), який зазнає інтерналізації клітиною ссавця після зв'язування з білком Axl, експресованим на поверхні вказаної клітини ссавця.

В конкретному втіленні вказана клітина ссавця природно експресує білковий рецептор Axl на своїй поверхні або є клітиною ссавця, що експресує рекомбінантний білок Axl на своїй поверхні, краще людською клітиною.

Такий спосіб або процес може включати етапи i) відбору антигензв'язувального білка, який специфічно зв'язується з Axl із значенням EC₅₀, рівним принаймні 10^{-9} М, та ii) відбору антигензв'язувального білка з попереднього етапу, який зазнає інтерналізації після зв'язування з Axl. Етап відбору згідно ii) можна здійснювати способом для оцінки інтерналізації, відомим фахівцю в даній області. Більш конкретно, дослідження можна здійснювати з використанням методу FACS, імуофлуоресцентних методів, протокової цитометрії, вестерн-блотингу, дослідження цитотоксичного/цитостатичного ефекту і т.д.

Іншою характерною особливістю антигензв'язувального білка за винаходом є те, що він не виявляє істотної активності по відношенню до проліферації пухлинних клітин. Більш конкретно, як показано в наступних прикладах, антигензв'язувальний білок за винаходом не виявляє будь-якої істотної активності *in vitro* по відношенню до проліферації на моделі клітин SN12C.

В онкології існує множина механізмів, згідно з якими моноклональні антитіла (МкАт) можуть виявляти свою терапевтичну дію, але часто їх активність є недостатньою для забезпечення

тривалого ефекту. У зв'язку з цим було розроблено декілька стратегій для підсилення їх активності, зокрема їх комбінування з такими ліками, як хіміотерапевтичні агенти. Імунотоксини є новим можливим методом лікування раку, який є ефективною альтернативою комбінованій терапії [Beck A. et al. Discov. Med. (2010).10, 329-339; Alley S.C. et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. (2009).330, 932-938]. Кон'югати антитіло-ліки (ADC, від англ. antibody-drug conjugate) є одним з підходів, при якому можливість використовувати специфічність МкАт та здійснювати спрямовану доставку цитотоксичного агента до пухлини можуть істотно підвищувати активність як МкАт, так і лікарського засобу. Краще, МкАт буде специфічно зв'язуватися з антигеном, що характеризується значною експресією на пухлинних клітинах, але низьким рівнем експресії на нормальних клітинах.

Даний винахід стосується специфічного білка, що зв'язується з АхІ, більш конкретно, специфічного антитіла, спрямованого проти АхІ, що має високу здатність зазнавати інтерналізації після зв'язування з АхІ. Такий антигензв'язувальний білок є цікавим як один з компонентів імунokon'югата з лікарським засобом, оскільки він здійснює адресну доставку приєднаного цитотоксичного агента в пухлинні клітини-мішені. Після інтерналізації цитотоксичний агент запускає загибель пухлинної клітини.

Важливою складовою успіху терапії імунokon'югатами вважається специфічність до антигену-мішені та інтерналізація комплексів антиген-зв'язувальний білок пухлинними клітинами. Очевидно, що антигени, які не зазнають інтерналізації, менш ефективно здійснюють доставку цитотоксичних агентів порівняно з антигенами, які зазнають інтерналізації. Процеси інтерналізації можуть варіювати в залежності від антигену та залежать від множини параметрів, на які можуть чинити вплив приєднані білки. RTK клітинної поверхні є сімейством антигенів, цікавим для дослідження цього підходу.

Цитотоксичний агент в складі біомолекули забезпечує цитотоксичну активність, а антигензв'язувальний білок забезпечує її специфічність по відношенню до пухлинних клітин, та служить вектором, що проникає в клітини та забезпечує належну адресну доставку цитотоксичного агента.

Таким чином, для поліпшення властивостей молекули імунokon'югата білок, що зв'язується з носієм, повинен виявляти виражену здатність до інтерналізації пухлинними клітинами-мішенями. Ефективність, з якою зв'язувальні білки опосередковують інтерналізацію, істотно відрізняється в залежності від епітопа, який є мішенню. Для відбору білків, що ефективно зв'язуються з АхІ та зазнають інтерналізації, потрібне експериментальне вивчення не лише зниження рівня експресії АхІ, але й відслідковування походження АхІ-зв'язувальних білків у клітині.

В кращому втіленні інтерналізацію антигензв'язувального білка за винаходом краще оцінюють методом імунofлуоресценції (як показано в Прикладі, наведеному нижче в даному документі) або іншим способом чи процесом, специфічним по відношенню до механізму інтерналізації, відомим фахівцю в даній області.

В іншому кращому втіленні комплекс АхІ-антигензв'язувальний білок за винаходом зазнає інтерналізації після приєднання зв'язувального білка за винаходом до позаклітинного домену вказаного АхІ, викликаючи зниження кількості АхІ на поверхні клітин. Це зниження можна оцінити будь-яким способом, відомим фахівцю в даній області (вестерн-блотинг, FACS, імунofлуоресценція і т.д.).

У втіленні винаходу дане зниження, що відображає інтерналізацію, краще оцінюють методом FACS та виражають як різницю або показник дельта між середньою інтенсивністю флуоресценції (MFI, від англ. Mean Fluorescence Intensity) необроблених клітин та MFI клітин після впливу антигензв'язувального білка за винаходом.

Необмежувальним прикладом даного винаходу є визначення показника дельта на основі MFI, одержаної для необроблених клітин та клітин після впливу антигензв'язувального білка за винаходом згідно з описом в Прикладі 9 з використанням i) пухлинних клітин нирки людини SN12C через 24 години інкубації з антигензв'язувальним білком за винаходом, та ii) вторинного антитіла, міченого Alexa488. Цей параметр обчислюють за такою формулою:

$\Delta (MFI_{24\text{год.}} \text{ необроблених клітин} - MFI_{24\text{год.}} \text{ клітин після впливу антигензв'язувального білка})$.

Ця різниця між MFI відображає зниження рівня експресії АхІ, оскільки значення MFI є пропорційним експресії АхІ на клітинній поверхні.

В ще кращому та переважному аспекті антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент за винаходом є моноклональним антитілом, краще виділеним МкАт, яке обумовлює різницю між $MFI_{24\text{год.}}$ необроблених клітин та $MFI_{24\text{год.}}$ оброблених клітин (значення Δ), що становить принаймні 200, краще принаймні 300.

Антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент за винаходом

викликають зниження MFI, що становить принаймні 200.

Більш конкретно, вищезгадуване значення дельта можна визначити згідно з таким способом, який слід розглядати як ілюстративний та необмежувальний приклад:

а) обробка та інкубація пухлинних клітин, що представляють інтерес, з антигензв'язувальним білком за винаходом;

б) дія антигензв'язувального білка за винаходом на клітини, оброблені на етапі а) і, паралельно, на необроблені клітини,

с) вимірювання MFI оброблених та необроблених клітин (репрезентативних по відношенню до кількості Axl, присутнього на поверхні) з використанням вторинного антитіла, здатного зв'язуватися з антигензв'язувальним білком, та

д) розрахунок значення дельта шляхом віднімання значення MFI, одержаного для оброблених клітин, від значення MFI, одержаного для необроблених клітин.

Терміни "антитіло", "антитіла" або "імуноглобуліни" використовуються взаємозамінно в самому широкому розумінні і включають моноклональні антитіла, краще, виділені MkAt, (наприклад, повнорозмірні або інтактні моноклональні антитіла), поліклональні антитіла, мультивалентні антитіла або мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла, що виявляють бажану біологічну активність).

Більш конкретно, така молекула є глікопротеїном, який містить принаймні два важких ланцюги (H) та два легких ланцюги (L), з'єднані між собою дисульфідними зв'язками. Кожен важкий ланцюг містить варіабельну ділянку (або домен) важкого ланцюга (в даному документі позначається аббревіатурою HCVR або VH) та константну ділянку важкого ланцюга. Константна ділянка важкого ланцюга містить три домени, CH1, CH2 та CH3. Кожен легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (в даному документі позначається аббревіатурою LCVR або VL) та константну ділянку легкого ланцюга. Константна ділянка легкого ланцюга містить один домен, CL. Ділянки VH та VL можна далі поділити на гіперваріабельні ділянки, називані ділянками, що визначають комплементарність (CDR, від англ. complementarity determining regions), які переважаються більш консервативними ділянками, названими каркасними ділянками (FR, від англ. framework regions). Кожна ділянка VH та VL складається з трьох CDR та чотирьох FR, розташованих в напрямку від аміно-кінця до карбокси-кінця в такому порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варіабельні ділянки важкого та легкого ланцюгів містять зв'язувальний домен, який взаємодіє з антигеном. Константні ділянки антитіл можуть опосередковувати зв'язування імуноглобуліну з тканинами або факторами організму-хазяїна, включаючи різні клітини імунної системи (наприклад, ефекторні клітини) та перший компонент класичного шляху активації комплементу (C1q).

Антитіла за винаходом також включають деякі фрагменти антитіл. Вказані фрагменти антитіл виявляють необхідну специфічність та афінність зв'язування, незалежно від джерела або типу імуноглобуліну (тобто, IgG, IgE, IgM, IgA і т.д.), тобто вони здатні специфічно зв'язуватися з білком Axl з афінністю, яка є порівнянною з афінністю повнорозмірних антитіл за винаходом.

Як правило, для одержання моноклональних антитіл або їх функціональних фрагментів, особливо таких, що мають мишаче походження, можна звертатися до методів, описаних, зокрема, в посібнику "Antibodies" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) або до методики одержання з використанням гібридом, описаної Kohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

Термін "моноклональне антитіло" або "MkAt" в даному документі позначає молекулу антитіла, спрямовану проти специфічного антигену, яку може продукувати один клон В-клітин або гібридома. Моноклональні антитіла також можуть бути рекомбінантними, тобто одержаними методами білкової інженерії. Крім того, на відміну від препаратів поліклональних антитіл, які, як правило, містять різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант або епітопів, кожне моноклональне антитіло спрямоване проти одного епітопа антигену. Винахід стосується антитіл, виділених або одержаних шляхом очистки з природних джерел, або одержаних рекомбінантним методом або за допомогою хімічного синтезу.

Краще втілення винаходу стосується антигензв'язувального білка або його антигензв'язувального фрагмента, який включає або є антитілом, вказане антитіло містить три CDR легкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NOs. 1, 2 та 3 або будь-які послідовності, ідентичні принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовностям SEQ ID NOs. 1, 2 та 3; та три CDR важкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NOs. 4, 5 та 6 або будь-які послідовності, ідентичні принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовностям SEQ ID NOs. 4, 5 та 6.

В ще кращому втіленні винаходу антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний

фрагмент є антитілом, вказане антитіло містить три CDR легкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NOs. 1, 2 та 3; та три CDR важкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NOs. 4, 5 та 6.

В кращому аспекті ділянки CDR або CDR(s) позначають гіперваріабельні ділянки важкого та легкого ланцюгів імуноглобулінів, згідно з IMGT. Без будь-якого протиріччя, в даній заявці CDR визначають згідно із системою нумерації IMGT.

Єдина нумерація IMGT була розроблена для порівняння варіабельних доменів будь-яких антигенних рецепторів, типів ланцюгів або видів [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommie, C, Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol, 27, 55-77 (2003)]. В єдиній нумерації IMGT консервативні амінокислоти завжди займають однакове положення, наприклад, цистеїн 23 (1-й CYS), триптофан 41 (консервативний TRP), гідрофобна амінокислота 89, цистеїн 104 (2-й CYS), фенілаланін або триптофан 118 (J-PHE або J-TRP). Єдина нумерація IMGT дозволяє стандартно встановити границі каркасних ділянок (FR1-IMGT: позиції 1-26, FR2-IMGT: 39-55, FR3-IMGT: 66-104 та FR4-IMGT: 118-128) та ділянок, що визначають комплементарність: CDR1-IMGT: 27-38, CDR2-IMGT: 56-65 та CDR3-IMGT: 105-117. Оскільки розриви позначають незайняті позиції, довжини CDR-IMGT (показані в лапках та розділені точками, наприклад, [8.8.13]) набувають принципіального значення. Єдина нумерація IMGT використовується для двовимірних графічних зображень, що носять назву IMGT Colliers de Perles ("жемчужні буси") [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)] та для тривимірних структур в базі даних IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Слід розуміти, що в даній заявці, не викликаючи протиріч, ділянки, що визначають комплементарність, або CDR, позначають гіперваріабельні ділянки важкого та легкого ланцюгів імуноглобулінів згідно із системою нумерації IMGT.

Однак встановлювати границі CDR можна і згідно із системою нумерації Kabat (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, та пізніші видання). Існує три CDR важкого ланцюга та три CDR легкого ланцюга. В даному документі терміни "CDR" та "CDRs" використовуються для позначення, в залежності від обставин, однієї чи більше, або навіть усіх ділянок, що містять більшість амінокислотних залишків, що відповідають за афінність зв'язування антитіла з антигеном або епітопом, які він розпізнає.

Згідно із системою нумерації Kabat, даний винахід стосується антигензв'язувального білка або його антигензв'язувального фрагмента, які є антитілом, вказане антитіло містить три CDR легкого ланцюга, границі яких встановлені згідно із системою нумерації Kabat, що включають послідовності SEQ ID NOs. 9, 10 та 11, або будь-які послідовності, ідентичні принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовностям SEQ ID NOs. 9, 10 та 11; та три CDR важкого ланцюга, границі яких встановлені згідно із системою нумерації Kabat, що включають послідовності SEQ ID NOs. 12, 13 та 14, або будь-які послідовності, ідентичні принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовностям SEQ ID NOs. 12, 13 та 14.

В даному винаході виражений в процентах показник "ідентичності" між двома послідовностями нуклеїнових кислот або амінокислот позначає процентний вміст ідентичних нуклеотидів або амінокислотних залишків для двох порівнюваних послідовностей, одержаний при оптимальному вирівнюванні, цей показник є виключно статистичним та розбіжності між двома послідовностями розподілені в послідовностях случайно. Порівняння двох нуклеотидних або амінокислотних послідовностей, як правило, здійснюють шляхом порівняння послідовностей після їх оптимального вирівнювання, вказане порівняння можна виконувати з використанням "вікна порівняння". Оптимальне вирівнювання порівнюваних послідовностей можна здійснювати, крім порівняння вручну, за допомогою алгоритму пошуку локальної гомології Сміта та Уотермана (Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482]), за допомогою алгоритму пошуку локальної гомології Нідлмана та Вунша (Neddleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443]), за допомогою пошуку подібності методом Пірсона та Ліпмана (Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444]) або за допомогою комп'ютерної програми, що використовує ці алгоритми (GAP, BESTFIT, FASTA та TFASTA в пакеті програм Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, або за допомогою програм для порівняння BLAST NR чи BLAST P).

Виражений в процентах показник ідентичності між двома нуклеотидними або амінокислотними послідовностями визначають шляхом порівняння двох оптимально вирівняних послідовностей, причому порівнювані нуклеотидні або амінокислотні послідовності можуть мати

вставки або делеції відносно референсної послідовності для досягнення оптимального вирівнювання двох послідовностей. Виражений в процентах показник ідентичності розраховують, визначаючи число позицій, у яких амінокислотні залишки або нуклеотиди ідентичні між двома послідовностями, краще, між двома повними послідовностями, шляхом ділення числа ідентичних позицій на загальне число позицій у вікні порівняння та множення результату на 100 для одержання вираженого в процентах показника ідентичності між двома послідовностями.

Наприклад, можна використовувати програми BLAST, "BLAST 2 sequences" (Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol, 1999, Lett. 174:247-250) доступ до яких надається на сайті <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, з настройками за умовчанням (зокрема, з параметрами "штраф за введення розриву": 5 та "штраф за подовження розриву": 2; наприклад, з вибором матриці "BLOSUM 62", пропонованої програмою); виражений в процентах показник ідентичності між двома порівнюваними послідовностями розраховується безпосередньо програмою.

Для амінокислотної послідовності, ідентичної принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, референсній амінокислотній послідовності, кращі приклади включають такі, які мають визначення модифікації у порівнянні з референсною послідовністю, зокрема, делеції, вставки або заміни принаймні однієї амінокислоти, вкорочення або подовження. У випадку заміни одного чи декількох розташованих послідовно або ні амінокислотних залишків, кращі заміни, в яких заміщені амінокислоти замінені "еквівалентними" амінокислотами. В даному описі вираз "еквівалентні амінокислоти" позначає будь-які амінокислоти, які можуть бути заміщені однією з основних амінокислот без будь-якої модифікації біологічної активності відповідних антитіл та згідно з конкретними прикладами, наведеними нижче.

Еквівалентні амінокислоти можна визначити чи то за їх структурною гомологією з амінокислотами, якими вони заміщені, чи то на основі результатів порівняння біологічної активності різних антигензв'язувальних білків, які можуть утворюватися.

Як приклад, який не є вичерпним, в Таблиці 2 нижче наведені можливі заміни, при здійсненні яких, як вважають, не відбувається істотної модифікації біологічної активності відповідного модифікованого антигензв'язувального білка; зрозуміло, за таких саме умов можливі й зворотні заміни.

Таблица 2

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

Втілення винаходу стосується антигензв'язувального білка або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 7 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовності SEQ ID NO. 7; та три CDR важкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID

NOs. 4, 5 та 6 або будь-яку послідовність, ідентичну принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовностям SEQ ID NOs. 4, 5 та 6.

Згідно з кращим втіленням винаходу, антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент містять варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 7 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 % послідовності SEQ ID NO.7; три CDR важкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NOs. 4, 5 та 6.

Згідно з іншим кращим втіленням винаходу, антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент містять варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 7, або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 % послідовності SEQ ID NO.7.

Інше втілення винаходу стосується антигензв'язувального білка або його антигензв'язувального фрагмента, який містить три CDR легкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NOs. 1, 2 та 3 або будь-яку послідовність, ідентичну принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовностям SEQ ID NOs. 1, 2 та 3; та варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 8, або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовності SEQ ID NO. 8.

Згідно з кращим втіленням винаходу, антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент містять три CDR легкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NOs. 1, 2 та 3; та варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 8 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 % послідовності SEQ ID NO.8.

Згідно з іншим кращим втіленням винаходу, антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент містять варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 8 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 % послідовності SEQ ID NO.8.

Інше втілення винаходу стосується антигензв'язувального білка або його антигензв'язувального фрагмента, що містять варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 7 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовності SEQ ID NO. 7; та варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 8, або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовності SEQ ID NO. 8.

Згідно з кращим втіленням винаходу, антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент містять варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 7 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 % послідовності SEQ ID NO. 7, та варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 8 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 % послідовності SEQ ID NO. 8.

Для більшої ясності, в Таблиці 3а нижче наведені різні амінокислотні послідовності, що відповідають антигензв'язувальному білку за винаходом (Mu = мишачий).

Таблиця 3а

	Нумерація CDR	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID NO
1613F12	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		4
		CDR-H2		5
		CDR-H3		6
	Kabat		CDR-L1	9
			CDR-L2	10
			CDR-L3	11
		CDR-H1		12
		CDR-H2		13
		CDR-H3		14
			Мишачий варіабельний домен	7
		Мишачий варіабельний домен		8

Конкретний аспект даного винаходу стосується мишачого антитіла або похідних від нього компонентів або антигензв'язувальних фрагментів, які відрізняються тим, що вказане антитіло

також містить константні ділянки легкого ланцюга та важкого ланцюга, одержані з антитіла біологічного виду, гетерологічного для миши, зокрема, людини.

Інший конкретний аспект даного винаходу стосується химерного антитіла або похідних від нього компонентів або антигензв'язувальних фрагментів, які відрізняються тим, що вказане антитіло також містить константні ділянки легкого ланцюга та важкого ланцюга, одержані з антитіла біологічного виду, гетерологічного для миши, зокрема, людини.

Ще один конкретний аспект даного винаходу стосується гуманізованого антитіла або похідних від нього компонентів або антигензв'язувальних фрагментів, які відрізняються тим, що константні ділянки легкого ланцюга та важкого ланцюга, одержані з людського антитіла, є, відповідно, ділянками типу лямбда або каппа або ділянками гамма-1, гамма-2 чи гамма-4.

Інший аспект винаходу стосується антигензв'язувального білка, який є моноклональним антитілом 1613F12, одержаним з гібридами I-4505, депонованої в Національній колекції культур мікроорганізмів (CNCM) в Інституті Пастера, Франція 28 липня 2011 р., або його антигензв'язувального фрагмента.

Згідно з іншим аспектом винахід стосується мишачої гібридоми, здатної секретувати антигензв'язувальний білок за винаходом, зокрема, гібридоми мишачого походження, депонованої у Французькій колекції культур мікроорганізмів (CNCM, Інститут Пастера, Париж, Франція) 28 липня 2011 р., за номером I-4505. Вказана гібридома була одержана при злитті спленоцитів/лімфоцитів імунізованих мишей Balb/C та клітин мієломи лінії Sp 2/O-Ag 14.

Згідно з іншим аспектом винахід стосується мишачої гібридоми, здатної секретувати антитіло, яке містить три CDR легкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NOs. 1, 2 та 3; та три CDR важкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NOs. 4, 5 та 6, вказана гібридома була депонована в CNCM, Інститут Пастера, Париж, Франція, 28 липня 2011 р. за номером I-4505. Вказана гібридома була одержана при злитті спленоцитів/лімфоцитів імунізованих мишей Balb/C та клітин мієломи лінії Sp 2/O-Ag 14.

Об'єктом винаходу є мишача гібридома I-4505, депонована в CNCM, Інститут Пастера, Париж, Франція, 28 липня 2011 р.

Антигензв'язувальний білок за винаходом також включає химерні або гуманізовані антитіла.

Химерне антитіло є антитілом, що має в своєму складі варіабельну ділянку природного походження (легкого ланцюга та важкого ланцюга), одержану з антитіла визначеного біологічного виду в комбінації з константними ділянками легкого ланцюга та важкого ланцюга антитіла біологічного виду, гетерологічного для вказаного заданого виду.

Антитіла або їх химерні фрагменти можна одержувати за допомогою рекомбінантних генетичних методів. Наприклад, химерне антитіло можна одержувати шляхом клонування рекомбінантної ДНК, що містить промотор та послідовність, кодуєчу варіабельну ділянку моноклонального антитіла за винаходом, яке має не-людське походження, зокрема мишаче, та послідовність, кодуєчу константну ділянку людського антитіла. Химерне антитіло за винаходом, кодоване одним з таких рекомбінантних генів, может, наприклад, бути химерним антитілом миши-людини, специфічність такого антитіла визначається варіабельною ділянкою, кодовою ДНК миши, а його ізотип визначається константною ділянкою, кодовою ДНК людини. Способи одержання химерних антитіл описані Verhoeven et al. (BioEssays, 8:74, 1988).

В іншому аспекті винаходу описаний зв'язувальний білок, який є химерним антитілом.

В конкретному кращому втіленні химерне антитіло за винаходом або його антигензв'язувальний фрагмент містять варіабельну ділянку легкого ланцюга, послідовність якого містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO. 7, а також містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, послідовність якого містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO. 8.

В іншому аспекті винаходу описаний зв'язувальний білок, який є гуманізованим антитілом.

"Гуманізоване антитіло" позначає антитіло, що містить ділянки CDR, одержані з антитіла, яке не має людського походження, та інші частини молекули антитіла, що походять з одного (або декількох) людських антитіл. Крім того, деякі залишки сегментів скелета (позначувані FR) можуть бути модифіковані для збереження афінності зв'язування (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeven et al., Science, 239: 1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988).

Гуманізовані антитіла за винаходом або їх фрагменти можна одержати за допомогою методів, відомих фахівцям в даній області (наприклад, таких, які описані в публікаціях Singer et al., J. Immun., 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10: 1-142, 1992; та Bebbington et al., Bio/Technology, 10: 169-175, 1992). Такі гуманізовані антитіла є кращими для застосування в способах, що включають діагностику in vitro або превентивне та/або терапевтичне застосування in vivo. Можна згадати інші способи гуманізації, також відомі фахівцям в даній області, наприклад, такі як методика "пересадження CDR", описана заявником

Protein Design Labs в патентах EP 0451261, EP 0682040, EP 0939127, EP 0566647 або US 5530101, US 6180370, US 5585089 та US 5693761. Також можна процитувати патенти США US 5639641 або 6054297, 5886152 та 5877293.

Крім того, винахід також стосується гуманізованих антитіл, одержаних на основі мишачих антитіл, описаних вище.

Краще, константні ділянки легкого ланцюга та важкого ланцюга, одержані з людського антитіла, відповідно є ділянками типу лямбда або каппа та гамма-1, гамма-2 або гамма-4.

В кращому втіленні винахід стосується антигензв'язувального білка, який є гуманізованим антитілом або його антиген-зв'язувальним фрагментом, що містять варіабельний домен легкого ланцюга, який містить послідовність SEQ ID NO. 36 або будь-яку послідовність, ідентичну принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовності SEQ ID NO. 36; та три CDR важкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NO. 4, 5 та 6.

Інше втілення винаходу стосується антигензв'язувального білка або його антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю, вибраною з групи, що складається з послідовностей SEQ ID NO. 37-47, або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовностям SEQ ID NO. 37-47; та три CDR важкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NOs. 4, 5 та 6.

"Будь-яка послідовність, ідентична принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовностям SEQ ID NO. 36 або 37-47" позначає послідовності, що містять послідовності трьох CDR легкого ланцюга SEQ ID NOs. 1, 2 та 3 і, крім цього, ідентичні принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, повнорозмірним послідовностям SEQ ID NO. 36 або 37-47 за межами послідовностей, що відповідають CDR (тобто SEQ ID NO. 1, 2 та 3).

Для більшої ясності в Таблиці 36 нижче наведені різні амінокислотні послідовності, що відповідають варіабельному домену легкого ланцюга (VL) гуманізованого антигензв'язувального білка за винаходом (Hz = гуманізований)

Таблиця 36

	Версія	SEQ ID NO.
Hz1613F12 VL	Консенсусна послідовність	36
	VL1	37
	VL1 I2V	38
	VL1 M4I	39
	VL2.1	40
	VL2.1 V49T	41
	VL2.1 P50N	42
	VL2.2	43
	VL2.2 V49T	44
	VL2.2 P50N	45
	VL2.3	46
	VL3	47

У втіленні винаходу антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент містять варіабельний домен легкого ланцюга, вибраний з групи, що складається з:

i) варіабельного домену легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 7 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 % послідовності SEQ ID NO. 7,

ii) варіабельного домену легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 36 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 % послідовності SEQ ID NO. 36; і

iii) варіабельного домену легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 37-47 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 % послідовностям SEQ ID NO. 37-47.

В кращому втіленні винахід стосується антигензв'язувального білка, який є гуманізованим антитілом або антигензв'язувальним фрагментом, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який містить послідовність SEQ ID NO. 48 або будь-яку послідовність, ідентичну принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовності SEQ ID NO. 48; та три CDR легкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NO. 1, 2 та 3.

Інше втілення винаходу стосується антигензв'язувального білка або його антигензв'язувального фрагмента, які містять варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю, вибраною з групи, що складається з SEQ ID NO. 49-68 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовностям SEQ ID NO. 49-68.

послідовностям SEQ ID NO. 49-68; та три CDR легкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NOs. 1, 2 та 3.

"Будь-яка послідовність, ідентична принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовностям SEQ ID NO. 48 та 49-68" позначає послідовності, що містять три CDR важкого ланцюга з послідовностями SEQ ID NOs. 4, 5 та 6 і, крім того, ідентичні принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, повнорозмірним послідовностям SEQ ID NO. 48 та 49-68 за межами послідовностей, що відповідають CDR (тобто SEQ ID NO. 4, 5 та 6).

Для більшої ясності в Таблиці 3в нижче наведені різні амінокислотні послідовності, що відповідають варіабельному домену важкого ланцюга (VH) гуманізованого антигензв'язувального білка за винаходом (Hz = гуманізований)

Таблиця 3в

	Версія	SEQ ID NO.
	Консенсусна послідовність	48
Hz1613F12 VH	VH1	49
	VH1 M39I	50
	VH1 W55R N66K	51
	VH1 I84S	52
	VH1 S85N	53
	VH1 I84N S85N	54
	VH2.1	55
	VH2.1 Q3H	56
	VH2.1 W55R	57
	VH2.1 N66K	58
	VH2.1 W55R N66K	59
	VH2.1 R80S	60
	VH2.1 N66K R80S	61
	VH2.2	62
	VH2.2 M89L	63
	VH2.3	64
	VH2.2 W55R	65
	VH2.3 Q3H W55R	66
	VH2.4	67
	VH3	68

У втіленні винаходу антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент містять варіабельний домен важкого ланцюга, вибраний з групи, що складається з:

i) варіабельного домену важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 8 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 % послідовності SEQ ID NO.8;

ii) варіабельного домену важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 48 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 % послідовності SEQ ID NO. 48; і

iii) варіабельного домену важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 49-68 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 % послідовностям SEQ ID NO. 49-68.

У втіленні винаходу антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент містять варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 36 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовності SEQ ID NO. 36; та варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 48 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовності SEQ ID NO. 48.

В іншому втіленні винаходу антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент містять варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю, вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO. 37-47, або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовностям SEQ ID NO. 37-47; і варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю, вибраною з групи, що складається з SEQ ID NO. 49-68, або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовностям SEQ ID NO. 49-68.

У втіленні винаходу антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент містять:

i) варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 7, 36 або 37-47 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 % послідовностям SEQ ID NO.7, 36 або 37-47; та

ii) варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO. 8, 48 або 49-68 або будь-якою послідовністю, ідентичною принаймні на 80 % послідовностям SEQ ID NO.8, 48 або 49-68.

Новий аспект даного винаходу стосується виділеної нуклеїнової кислоти, яка відрізняється тим, що вона вибрана з таких нуклеїнових кислот (включаючи будь-який вироджений генетичний код):

a) нуклеїнової кислоти, кодує антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальний фрагмент за винаходом;

b) нуклеїнової кислоти, що містить:

- нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, що складається з послідовностей SEQ ID NOs. 15-28 та 69-99, або

- нуклеотидну послідовність, що містить 6 нуклеотидних послідовностей SEQ ID NOs.: 15-20, або

- нуклеотидну послідовність, що містить дві нуклеотидні послідовності SEQ ID NOs.: 21, 22, або дві нуклеотидні послідовності, вибрані з одного боку з SEQ ID NOs.: 69-79, а з іншого боку з SEQ ID NOs.: 80-99;

c) нуклеїнової кислоти, комплементарної нуклеїновій кислоті, визначення якої наведене в пунктах a) або b); та

d) нуклеїнової кислоти, яка краще містить принаймні 18 нуклеотидів, здатної гібридизуватися в жорстких умовах з нуклеїновою кислотою з послідовністю, визначення якої наведене в пунктах a) або b), або з послідовністю, ідентичною при оптимальному вирівнюванні принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, послідовності нуклеїнової кислоти, визначення якої наведене в пунктах a) або b).

В Таблиці 4a нижче наведені різні нуклеотидні послідовності, що стосуються зв'язувального білка за винаходом (Mu = мишачий).

Таблиця 4a

	Нумерація CDR	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID NO
1613F12	IMGT		CDR-L1	15
			CDR-L2	16
			CDR-L3	17
		CDR-H1		18
		CDR-H2		19
		CDR-H3		20
	Kabat		CDR-L1	23
			CDR-L2	24
			CDR-L3	25
		CDR-H1		26
		CDR-H2		27
		CDR-H3		28
			Мишачий варіабельний домен	21
		Мишачий варіабельний домен		22

Для більшої ясності в Таблиці 4b нижче наведені різні нуклеотидні послідовності, що відповідають варіабельному домену легкого ланцюга (VL) гуманізованого антигензв'язувального білка за винаходом (Hz = гуманізований)

Таблиця 4б

Hz1613F12 VL	Версія	SEQ ID NO.
	VL1	69
	VL1 I2V	70
	VL1 M4I	71
	VL2.1	72
	VL2.1 V49T	73
	VL2.1 P50N	74
	VL2.2	75
	VL2.2 V49T	76
	VL2.2 P50N	77
	VL2.3	78
	VL3	79

Для більшої ясності в Таблиці 4в нижче наведені різні нуклеотидні послідовності, що відповідають варіабельному домену важкого ланцюга (VH) гуманізованого антигензв'язувального білка за винаходом (Hz = гуманізований)

Таблиця 4в

Hz1613F12 VH	Версія	SEQ ID NO.
	VH1	80
	VH1 M39I	81
	VH1 W55R N66K	82
	VH1 I84S	83
	VH1 S85N	84
	VH1 I84N S85N	85
	VH2.1	86
	VH2.1 Q3H	87
	VH2.1 W55R	88
	VH2.1 N66K	89
	VH2.1 W55R N66K	90
	VH2.1 R80S	91
	VH2.1 N66K R80S	92
	VH2.2	93
	VH2.2 M89L	94
	VH2.3	95
	VH2.3 W55R	96
	VH2.3 Q3H W55R	97
	VH2.4	98
	VH3	99

Терміни "нуклеїнова кислота", "нуклеїнова послідовність", "послідовність нуклеїнової кислоти", "полінуклеотид", "олігонуклеотид", "полінуклеотидна послідовність" та "нуклеотидна послідовність" в даному описі використовуються взаємозамінно, позначають точну послідовність нуклеотидів, модифікованих або немодифікованих, що описують фрагмент або ділянку нуклеїнової кислоти, які містять нуклеотиди, що зустрічаються або не зустрічаються в природі, та які є дволанцюговою ДНК, одноланцюговою ДНК або продуктами транскрипції вказаних ДНК.

Послідовності за даним винаходом були виділені та/або очищені, тобто, їх відібрали напряму або опосередковано, наприклад, через копії, їх оточення було принаймні частково модифіковано. До них також належать виділені нуклеїнові кислоти, одержані рекомбінантними генетичними методами, наприклад, з клітин-хазяїв, або одержані методом хімічного синтезу.

"Нуклеїнові послідовності, ідентичні принаймні на 80 %, краще на 85 %, 90 %, 95 % та 98 %, після оптимального вирівнювання з кращою послідовністю" позначають нуклеїнові послідовності, які мають у порівнянні з референсною нуклеїновою послідовністю деякі модифікації, зокрема, такі як делеція, укорочення, подовження, химеризація та/або заміна,

зокрема точкова. Краще, це послідовності, які кодують ті самі амінокислотні послідовності, що й референсна послідовність, внаслідок виродженості генетичного коду, або комплементарні послідовності, які можуть специфічно гібридизуватися з референсною послідовністю, краще в жорстких умовах, зокрема, описаних нижче.

5 Гібридизація в жорстких умовах означає, що умови, які стосуються температури та іонної сили, вибрані таким чином, що вони забезпечують гібридизацію двох комплементарних фрагментів ДНК. Виключно в ілюстративних цілях нижче наведені жорсткі умови для етапу гібридизації з метою характеристики полінуклеотидних фрагментів, описаних вище.

10 Гібридизація ДНК-ДНК або ДНК-РНК здійснюється в два етапи: (1) прегібридизація при 42 °C протягом трьох годин в фосфатному буфері (20 мМ, pH 7,5) що містить 5× SSC (1× SSC відповідає розчину 0,15 М NaCl + 0,015 М цитрату натрію), 50 % формамід, 7 % додецилсульфат натрію (ДСН), 10 × розчин Денхардта, 5 % сульфат декстрану та 1 % ДНК молочка пососевих; (2) первинна гібридизація протягом 20 годин при температурі, що залежить від довжини зонда (тобто 42 °C для зонда довжиною >100 нуклеотидів) з подальшими двома 20-хвилинними відмиваннями при 20 °C в 2 × SSC+2 % ДСН, одним 20-хвилинним відмиванням при 20 °C в 0,1 × SSC+0,1 % ДСН. Останнє відмивання здійснюють в 0,1 × SSC+0,1 % ДСН протягом 30 хвилин при 60 °C для зонда довжиною >100 нуклеотидів. Жорсткі умови гібридизації, описані вище для полінуклеотиду визначеного розміру, фахівець в даній області може адаптувати для більш довгих чи більш коротких олігонуклеотидів згідно з протоколами, описаними Sambrook, et al. (Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3rd edition, 2001).

Винахід також стосується вектора, що містить нуклеїнову кислоту, описану у винаході.

Винахід, зокрема, стосується клонуючих та/або експресуючих векторів, що містять таку нуклеотидну послідовність.

25 Вектори за винаходом краще містять елементи, що забезпечують експресію та/або секрецію нуклеотидної послідовності в заданій клітині-хазяїні. Таким чином, вектор повинен містити промотор, сигнали ініціації та термінації трансляції, а також придатні області, що регулюють транскрипцію. Він повинен зберігати стабільність у клітині-хазяїні та можливо нести певні сигнальні послідовності, що забезпечують секрецію трансльованого білка. Фахівці в даній області вибирають та оптимізують ці різні елементи в залежності від використовуваної клітини-хазяїна. З цією метою нуклеотидні послідовності можна вбудовувати в самореплікативні вектори, що містяться у вибраних хазяях, або вектори, що інтегруються в геном клітини-хазяїна.

30 Такі вектори одержують способами, стандартно використовуваними фахівцями в даній області, а одержані клони можна вводити в придатну клітину-хазяїна з використанням стандартних способів, таких як ліпофекція, електропорація, тепловий шок або хімічні методи.

35 Вектори, наприклад, можуть бути створені на основі плазмід або вірусів. Їх використовують для трансформації клітин-хазяїв для клонування або експресії нуклеотидних послідовностей за винаходом.

40 Винахід також стосується виділених клітин-хазяїв, трансформованих або таких, що містять вектор, описаний в даному винаході.

Клітина-хазяїн може бути вибрана з прокаріотичних або еукаріотичних систем, наприклад, таких як бактеріальні клітини, а також клітини дріжджів або клітини тварин, зокрема, клітини ссавців (за винятком людини). Також можна застосовувати клітини комах або рослин.

45 Винахід також стосується тварин, відмінних від людини, які мають трансформовані клітини за винаходом.

Інший аспект винаходу стосується способу одержання антигензв'язувального білка за винаходом або його антигензв'язувального фрагмента, які відрізняються тим, що вказаний спосіб включає такі етапи:

50 а) культивування в середовищі при умовах культивування, придатних для клітини-хазяїна за винаходом; та

б) виділення антигензв'язувального білка або одного з його антигензв'язувальних фрагментів, одержаних у такий спосіб з культурального середовища або з вказаних культивованих клітин.

55 Трансформовані клітини за винаходом застосовують в способах одержання рекомбінантних антигензв'язувальних білків за винаходом. Способи одержання антигензв'язувальних білків за винаходом в рекомбінантній формі, які відрізняються тим, що у вказаних способах використовують вектор та/або клітину, трансформовану вектором за винаходом, також входять до обсягу даного винаходу. Краще, клітини, трансформовані вектором за винаходом, культивують в умовах, які забезпечують експресію вищезгаданого антигензв'язувального білка та виділення вказаного рекомбінантного білка.

Як вже згадувалося вище, клітина-хазяїн може бути вибрана з прокаріотичних або еукаріотичних систем. Зокрема, можна встановити нуклеотидні послідовності за винаходом, які полегшують секрецію в таких прокаріотичних або еукаріотичних системах. Вектор за винаходом, що несе таку послідовність, можна успішно застосовувати для одержання секретованих

рекомбінантних білків. Дійсно, очистка таких рекомбінантних білків, що представляють інтерес, буде полегшена, оскільки вони будуть перебувати в надосадній культуральній рідині, а не усередині клітин-хазяїв.

Антигензв'язувальний білок за винаходом можна також одержувати за допомогою хімічного синтезу. Один з таких способів одержання також є об'єктом винаходу. Фахівцю в даній області відомі способи хімічного синтезу, такі як методи твердофазового синтезу (зокрема, див. Steward et al., 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed., pp 71-95) або методи конвергентного твердофазового синтезу з конденсацією фрагментів або стандартного синтезу в розчині. Поліпептиди, одержані методом хімічного синтезу, що можуть мати в своєму складі відповідні амінокислоти, які не зустрічаються в природі, також входять до

обсягу винаходу.

Антигензв'язувальний білок або його антигензв'язувальні фрагменти, які можливо одержати способом за винаходом, також входять до обсягу даного винаходу.

Конкретний аспект винаходу стосується антигензв'язувального білка або його антигензв'язувального фрагмента, описаних вище, для застосування як продукт для адресної доставки цитотоксичного агента в сайт-мішень хазяїна, вказаний сайт-мішень має в своєму складі епітоп, який перебуває в позаклітинному домені білка Axl, краще в позаклітинному домені людського білка Axl, ще краще в позаклітинному домені людського білка Axl, що має послідовність SEQ ID NO. 31 або 32, або природні варіанти його послідовності.

В кращому втіленні вказаний сайт-мішень хазяїна є сайтом-мішенню клітини ссавця, ще краще клітини людини, ще краще клітин, які природно або в результаті генетичної рекомбінації експресують білок Axl.

Винахід стосується імунокон'югата, що містить антигензв'язувальний білок, описаний в даній заявці, кон'югований з цитотоксичним агентом.

В даному винаході вираз "імунокон'югат" або "імуно-кон'югат" позначає сполуку, яка містить принаймні продукт для забезпечення адресної доставки, фізично зв'язаний з одним чи декількома терапевтичними агентами, дозволяючи таким чином одержати високоспецифічні сполуки.

В кращому втіленні такі терапевтичні агенти є цитотоксичними агентами.

Під "цитотоксичним агентом" або "цитотоксичною сполукою" розуміють агент, який при введенні суб'єкту впливає на клітинну проліферацію або запобігає їй, краще впливає на або запобігає розвитку раку в організмі суб'єкта, шляхом інгібування або попередження реалізації клітинної функції та/або викликаючи загибель клітини.

Було виділено або синтезовано множину цитотоксичних агентів, що пригнічують клітинну проліферацію або викликають руйнування або скорочення числа пухлинних клітин, якщо не абсолютне, то принаймні істотне. Однак, токсична активність цих агентів не обмежена пухлинними клітинами, і клітини, які не є пухлинними, також зазнають впливу і можуть руйнуватися. Зокрема, побічні ефекти стосуються клітин, які швидко оновлюються, таких як гемопоетичні клітини або клітини епітелія, зокрема епітелію слизових оболонок. Як ілюстрації можна привести клітини шлунково-кишкового тракту, які зазнають значного впливу при застосуванні таких цитотоксичних агентів.

Однією з цілей даного винаходу є створення цитотоксичного агента, який дозволить скоротити побічні ефекти по відношенню до нормальних клітин при збереженні високої цитотоксичної активності по відношенню до пухлинних клітин.

Зокрема, цитотоксичний агент краще може мати в своєму складі, крім іншого, лікарський засіб (тобто "кон'югат антитіло-лікарський засіб"), токсин (тобто "імунотоксин" або "кон'югат антитіло-токсин"), ізоторадіоп (тобто "радіоімунокон'югат" або "кон'югат антитіло-радіоізотоп") і т.д.

В першому кращому втіленні винаходу імунокон'югат має в своєму складі зв'язувальний білок, з'єднаний принаймні з лікарським засобом або лікарським препаратом. Такий імунокон'югат називається кон'югатом антитіло-лікарський засіб (або "ADC", від англ. antibody-drug conjugate), у якому зв'язувальний білок є антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом.

В першому втіленні такі ліки можна описати з урахуванням їх способу дії. Як приклад, який не є вичерпним, можна навести алкілувальні агенти, такі як азотистий іприт (мехлоретамін), алкілсульфонати, нітрозосечовину, оксазофорини, азиридици або іміноетилені,

антиметаболіти, протипухлинні антибіотики, інгібітори мітозу, інгібітори функціонування хроматину, антиангіогенні агенти, антиестрогени, антиандрогени, хелатуючі агенти, стимулятори абсорбції заліза, інгібітори циклооксигенази, інгібітори фосфодіестерази, інгібітори ДНК, інгібітори синтезу ДНК, стимулятори апоптозу, інгібітори синтезу тимідилату, інгібітори Т-клітин, агоністи інтерферону, інгібітори рибонуклеозидтрифосфат-редуктази, інгібітори ароматази, антагоністи естрогенових рецепторів, інгібітори тирозинкінази, інгібітори клітинного циклу, таксани, інгібітори тубуліну, інгібітори ангіогенезу, стимулятори макрофагів, антагоністи нейрокінінових рецепторів, агоністи канабіноїдних рецепторів, агоністи допамінових рецепторів, агоністи гранулоцитарного колоніестимулювального фактора, агоністи рецепторів еритропоєтину, агоністи рецепторів соматостатину, агоністи ЛГРГ, кальцієві сенсibilізатори (що підвищують чутливість до іонів кальцію), антагоністи рецепторів фактора росту судинного ендотелію, антагоністи інтерлейкінових рецепторів, інгібітори остеокластів, стимулятори утворення вільних радикалів, антагоністи рецепторів ендотеліну, алкалоїд барвінку, антигормони або імуномодулятори або будь-які інші нові ліки, що відповідають критеріям, висуваним до активності цитотоксичного агента або токсину.

Такі лікарські засоби, наприклад, є згадуваними в довіднику VIDAL 2010, на сторінці, присвяченій сполукам, що належать до розділу "цитотоксичні препарати" в онкології та гематології, і ці цитотоксичні сполуки, перелічені з посиланням на даний документ, згадуються в даній заявці як кращі цитотоксичні агенти.

Більш конкретно, поміж інших, кращими за винаходом є такі лікарські засоби: мехлоретамін, хлорумбукол, мелфалан, хлоргідрат, піпоброман, преднімустин, динамій-фосфат, естрамустин, циклофосфамід, алтретамін, трофосфамід, сульфосфосфамід, іфосфамід, тіотеп, триетиленамін, алтретамін, кармустин, стрептозоцин, фотемустин, ломустин, бусульфан, треосульфан, імпросульфан, дакарбазин, цисплатин, оксалиплатин, лобоплатин, гептаплатин, міриплатину гідрат, карбоплатин, метотрексат, пеметрексед, 5-фторурацил, флоксурин, 5-фтордезоксифлуоридин, капецитабін, цитарабін, флударабін, цитозин-арабінозид, 6-меркаптопурин (6-МП), неларабін, 6-тіоганін (6-ТГ), хлордезоксиденозин, 5-азацитидин, гемцитабін, кладрибін, дезоксиформіцин, тегафур, пентостатин, доксорубіцин, даунорубіцин, ідарубіцин, валрубіцин, мітоксантрон, дактиноміцин, мітраміцин, плікаміцин, мітоміцин С, блеомицин, прокарбазин, паклітаксел, доцетаксел, вінбластин, вінкрестин, віндезин, вінорелбін, топотекан, іринотекан, етопозид, валрубіцин, амрубіцин гідрохлорид, пірарубіцин, еліптінію ацетат, зорубіцин, епірубіцин, ідарубіцин та теніпозид, разоксин, маримастат, батимастат, приномастат, таномастат, іломастат, CGS-27023A, галофугінон, COL-3, неовастат, талідомід, CDC 501, DMXAA, L-651582, скваламін, ендостатин, SU5416, SU6668, інтерферон-альфа, EMD121974, інтерлейкін-12, IM862, ангіостатин, тамоксифен, тореміфен, ралоксифен, дролоксифен, йодоксифен, анастрозол, летрозол, екземестан, флутамід, нілутамід, спіронолактон, ципротерону ацетат, фінастерид, цимітидин, бортезоміб, велкейд, бікалутамід, ципротерон, флутамід, фулвестрант, екземестан, дазатиніб, ерлотиніб, гефітініб, іматиніб, лопатиніб, нілотиніб, сорафеніб, сунітініб, ретиноїд, рексін, метоксален, метиламінолевулінат, алдеслейкін, ОСТ-43, денілейкін дифтитокус, інтерлейкін-2, тазонермін, лентинан, сизофілан, роквінімекс, підотимод, пегадемаза, тимопентин, полі-І/Ц (поліінозинова - поліцитидилова кислота), прокодазол, Тайс БЦЖ, *corynebacterium parvum*, NOV-002, україн, левамизол, 1311-chTNT, H-101, целмолейкін, інтерферон альфа-2a, інтерферон альфа-2b, інтерферон гамма-1a, інтерлейкін-2, мобенакін, рексин (Rexin-G), тецелейкін, акларубіцин, актиноміцин, арглабін, аспарагіназа, карцинофілін, хромомицин, дауномицин, лейковорин, масопротект, неокарциностан, пепломицин, саркоміцин, соламаргін, трабектедин, стрептозоцин, тестостерон, кунекатехіні (kuncatechins), синекатехіні, алітретиніон, белотекану гідрохлорид, калустерон, дромостанолон, еліптінію ацетат, етиніл естрадіол, етопозид, флюоксистерон, формістан, фосфетрол, гозереліну ацетат, гексиламінолевулінат, гістрелін, гідроксипрогестерон, іксабепілон, лейпролід, медроксипрогестерону ацетат, мегестролу ацетат, метилпреднізолон, метилтестостерон, мілтефозин, мітобронітол, надролону фенілпропіонат, норетиндрону ацетат, преднізолон, преднізон, темсиролімум, тестолактон, триамцинолон, трипторелін, вапреотиду ацетат, циностанин-стималамер, амсакрин, триоксид арсену, бізантрону гідрохлорид, хлорамбуцил, хлортрианізен, цис-діамінодихлороплатина, циклофосфамід, діетилстилбестрол, гексаметилмеламін, гідроксисечовина, леналідомід, лонідамін, мехлоретамін, мітотан, неапластин, німустину гідрохлорид, памідронат, піпоброман, порфімер натрій, ранімустан, разоксан, семустин, собузоксан, мезилат, триетиленмеламін, золедронові кислота, камостату мезилат, фадрозол HCl, нафоксидин, аміноглутетимід, кармофур, клофарабін, цитозину арабінозид, децитабін, доксифлуоридин, еноцитабін, флударабіну фосфат, фторурацил, фторафур, урамустин, абарелікс, бексаротен,

ралтитрексид, тамібаротен, темозоломід, вориностат, мегестрол, динатрію клодронат, левамизол, ферумокситол, заліза ізомальтозид, целококсид, ібудиласт, бендамустин, алтретамін, мітолактол, темсиролімус, пралатрексат, TS-1, децитабін, бікалутамід, флутамід, летрозол, динатрію клодронат, дегарелікс, тореміфену цитрат, гістаміну дигідрохлорид, DW-166HC, нітракрин, децитабін, іринотекану гідрохлорид, амсакрин, ромідепсин, третиніон, кабазитаксел, вандетаніб, леналідомід, ібандронова кислота, мілтефозин, вітеспен, міфамуртид, надропарин, гранісетрон, ондансетрон, тропісетрон, алізаприд, рамосетрон, доласетрону месилат, фосапрепітанту димеглумін, набілон, апрепітант, дронабінол, TY-10721, лізуриду гідромалеат, епіцерам, дефібротид, дабігатрану етексилат, філграстим, пегфілграстим, редитукс, епоетин, молграмостим, опрелвекін, сипулейцел-Т, M-Vax, ацетил L-карнітин, донепезилу гідрохлорид, 5-амінолевулінова кислота, метиламінолевулінат, цетрореліксу ацетат, ікодекстрин, лейпрорелін, метилфенідат, октреотид, амлексанокс, плериксафор, менатетренон, анетолу дитіол-тіон, доксеркальциферол, цинакальцету гідрохлорид, алефацепт, роміпlostим, тимоглобулін, тимальфазин, убенімекс, іміквімод, еверолімус, сиролімус, H-101, лазофоксифен, трилостан, інкадронат, гангліозиди, октанатрію пегаптаніб, вертопорфин, мінодроронова кислота, золедроронова кислота, галію нітрат, натрію алендронат, динатрію етидронат, динатрію памідронат, дутастерид, натрію стибоглюконат, армодафініл, дексразоксан, аміфостин, WF-10, темопорфін, дарбепоетин альфа, анцестим, сарграмостим, паліфермін, R-744, непідермін, опрелвекін, денілейкін дифтитокс, крисантаспаза, бусерелін, деслорелін, ланреотид, октреотид, пілокарпін, бозентан, каліхіміцин, майтанзиноїди та циклонікат.

Для більш докладної інформації фахівці в даній області можуть звернутися до посібника під ред. Французької асоціації викладачів медичної хімії, озаглавленого "Трактат з медичної хімії" ("Traite de chimie therapeutique, vol. 6, Medicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, edition TEC & DOC, 2003").

Друге краще втілення винаходу стосується імунокон'югату, який має в своєму складі зв'язувальний білок, зв'язаний принаймні з радіоізотопом. Такий імунокон'югат називають кон'югатом антитіло-радіоізотоп (або "ARC", від англ. antibody-radioisotope conjugate), у якому зв'язувальний білок є антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом.

Для вибіркового руйнування пухлини антитіло може містити високорадіоактивні атоми. Для одержання ARC існує ряд радіоактивних ізотопів, що включає At^{211} , C^{13} , N^{15} , O^{17} , Fl^{19} , I^{123} , I^{131} , I^{125} , In^{111} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Tc^{99m} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} , радіоактивні ізотопи Lu, гадолінію, марганцю або заліза, без обмеження ними.

Для інкорпорування цих радіоізотопів в склад ARC можна застосовувати будь-які способи або процеси, відомі фахівцям в даній області техніки (див., наприклад, "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", Chatal, CRC Press 1989). Як приклад, який не є вичерпним, Tc^{99m} або I^{123} , Re^{186} , Re^{188} та In^{111} можуть бути приєднані по залишкам цистеїну. У можна приєднувати по залишкам лізину. I^{123} можна приєднувати за допомогою способу IODOGEN (Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57).

Для ілюстрації відомого рівня техніки можна навести декілька прикладів ARC, таких як Зевалін[®], який є ARC, що складається з моноклонального антитіла до CD20 та радіоізотопів In^{111} або Y^{90} , зв'язаних з хелатоутворювальним комплексом тіосечовина-лінкер (Wiseman et al. (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7): 766-77; Wiseman et al. (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69); або Мілотарг[®], що складається з антитіла до CD33, зв'язаного з каліхіміцином (US 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Можна також згадати кон'югат "антитіло-лікарський засіб", який носить назву Адцетрис (або брентуксимаб ведотин), нещодавно схвалений Управлінням з контролю якості харчових продуктів та лікарських засобів США для лікування лімфоми Ходжкіна (Nature, vol. 476, pp380-381, 25 August 2011).

В третьому кращому втіленні винаходу імунокон'югат має в своєму складі зв'язувальний білок, зв'язаний принаймні з токсином. Такий імунокон'югат називають кон'югат "антитіло-токсин" (або "ATC", від англ. antibody-toxin conjugate), у якому зв'язувальний білок є антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом.

Токсини є ефективними та специфічними отрутами, вироблюваними живими організмами. Вони як правило є амінокислотним ланцюгом, молекулярна вага якого може варіювати від двохсот (пептиди) до ста тисяч (білки). Вони також можуть бути низькомолекулярними органічними сполуками. Токсини продукують множина мікроорганізмів, наприклад, бактерії, гриби, водорості та рослини. Багато з них є надзвичайно ядовитими, їх токсичність на декілька порядків перевищує токсичність отруйних речовин нервово-паралітичної дії.

Токсини, застосовувані в складі ATC, можуть включати усі види токсинів, у яких механізм

цитотоксичної дії включає зв'язування тубуліну, зв'язування ДНК або інгібування топоізомерази, без обмеження ними.

Застосовувані ензиматично активні токсини та їх фрагменти включають А-ланцюг дифтерійного токсину, незв'язувальні активні фрагменти дифтерійного токсину, А-ланцюг екзотоксину (з *Pseudomonas aeruginosa*), А-ланцюг рицину, А-ланцюг абрину, А-ланцюг модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантини, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII та PAP-S), інгібітор *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор *Saponaia officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин та трихотецени.

Низькомолекулярні токсини, такі як доластатини, ауристатини, трихотецен та CC1065 та похідні цих токсинів, що мають токсичну активність, також входять до обсягу даного опису. Було показано, що доластатини та ауристатини порушують динаміку мікротрубочок, перешкоджають гідролізу ГТФ і ядерному та клітинному діленню і виявляють протипухлинну та протигрибкову активність.

"Лінкер", "лінкерна ланка" або "зв'язуюча ланка" позначають хімічну групу, що містить ковалентний зв'язок або ланцюг атомів, які ковалентно приєднують зв'язувальний білок до принаймні одного цитотоксичного агента.

Лінкери можуть бути одержані із застосуванням різних біфункціональних блоків-зв'язувальних агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональних похідних імідоєфірів (таких як диметиладіпімідат HCl), активних ефірів (таких як дисукцинімідил-суберат), альдегідів (таких як глутаральдегід), біс-азидосполук (таких як біс-(п-азидобензоїл)гександіамін), похідних бісдіазонію (таких як біс-(п-діазонійбензоїл)етилендіамін), діізоціанатів (таких як толуол-2,6-діізоціанат) та сполук з двома активними атомами фтору (таких як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Прикладом хелатуючого агента для кон'югації цитотоксичних агентів із системою для адресної доставки є мічена вуглецем-14 1-ізоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінопентаоцтова кислота (MX-DTPA). Іншими сшивальними агентами можуть бути BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC та сульфо-SMPB і SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфо)бензоат), доступні з комерційних джерел (наприклад, від компанії Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, 111., U.S.A.).

Лінкер може бути "нерозщеплюваним" або "розщеплюваним".

В кращому втіленні він є "розщеплюваним лінкером", що сприяє вивільненню цитотоксичного агента у клітині. Наприклад, можна застосовувати чутливий до кислот лінкер, чутливий до пептидів лінкер, фотолабільний лінкер, диметиловий лінкер або дисульфід-вмісний лінкер. В кращому втіленні лінкер є розщеплюваним у внутрішньоклітинних умовах лінкером, так що розщеплення лінкера приводить до відокремлення цитотоксичного агента від зв'язувального білка у внутрішньоклітинний простір.

Наприклад, в деяких втіленнях лінкер розщеплюється розщеплювальним агентом, присутнім у внутрішньоклітинному середовищі (наприклад, усередині лізосом або ендосом або кавеол). Лінкер може бути, наприклад, пептидним лінкером, розщеплюваним внутрішньоклітинними пептидазами або протеазами, включаючи лізосомальні або едосомальні протеази, без обмеження ними. Як правило, пептидний лінкер складається принаймні з двох амінокислот або принаймні з трьох амінокислот. Розщеплювальні агенти можуть включати катепсини В та D та плазмін, відомі своєю здатністю гідролізувати дипептидні похідні лікарських засобів, що приводить до вивільнення активних агентів усередині клітин-мишеней. Наприклад, можна застосовувати пептидний лінкер, розщеплюваний тіол-залежною протеазою катепсином-В, високий рівень експресії якої спостерігається в пухлинних тканинах (наприклад, лінкер Phe-Leu або Gly-Phe-Leu-Gly). У певних втіленнях пептидний лінкер, розщеплюваний внутрішньоклітинною протеазою, є лінкером Val-Cit або лінкером Phe-Lys. Однією з переваг використання цитотоксичних агентів, що вивільняються при внутрішньоклітинному протеолізі, є те, що токсичність агента, як правило, знижується при кон'югації, а стабільність кон'югатів в сироватці, як правило, є високою.

В інших втіленнях розщеплюваний лінкер є рН-чутливим, тобто зазнає гідролізу при певних значеннях рН. Як правило, рН-чутливий лінкер гідролізується в кислому середовищі. Наприклад, можна використовувати чутливий до кислот лінкер, що гідролізується в лізосомах (наприклад, гідразон, семікарбазон, тіосемікарбазон, цис-аконітовий амід, ортоєфір, ацеталь, кеталь тощо). Такі лінкери можуть бути відносно стабільними при нейтральних значеннях рН, таких як характерні для крові, але нестабільними при рН нижче 5,5 або 5,0, що є приблизними значеннями рН в лізосомах. У певних втіленнях лінкер, що гідролізується, є тіоефірним

лінкером (наприклад, таким як тіоефір, приєднаний до терапевтичного агента через ацилгідразоновий зв'язок).

В інших втіленнях лінкер розщеплюється у відновних умовах (наприклад, дисульфідний лінкер). Фахівцям відома множина дисульфідних лінкерів, включаючи, наприклад, такі, які можуть бути утворені з використанням SATA (N-сукцинімідил-S-ацетилтіоацетату), SPDП (N-сукцинімідил-3-(2-піридилтіо)пропіонату), SPDB (N-сукцинімідил-3-(2-піридилтіо)бутирату) та SMPT (N-сукцинімідил-оксикарбоніл-альфа-метил-альфа-(2-піридилтіо)толуолу), SPDB та SMPT.

Як невичерпний приклад нерозщеплюваних або "невідновлюваних" лінкерів можна згадати імунокон'югат трастузумаб-DM1 (TDM1), в якому об'єднані трастузумаб та хіміотерапевтичний агент майтанзин (Cancer Research 2008; 68: (22). November 15, 2008).

В кращому втіленні імунокон'югат за винаходом може бути одержаний будь-яким способом, відомим фахівцям в даній області, наприклад, таким як i) реакція нуклеофільної групи антигензв'язувального білка з бівалентним зв'язуючим реагентом з подальшою реакцією з цитотоксичним агентом, або ii) реакція нуклеофільної групи цитотоксичного агента з бівалентним зв'язуючим реагентом з подальшою реакцією з нуклеофільною групою антигензв'язувального білка.

Нуклеофільні групи антигензв'язувального білка включають N-кінцеві аміногрупи, аміногрупи бічних ланцюгів, наприклад, лізину, тіолові групи бічних ланцюгів та гідроксильні або аміногрупи вуглеводів у випадку, якщо антигензв'язувальний білок є глікозилованим, без обмеження ними. Аміногрупи, тіолові групи та гідроксильні групи є нуклеофільними групами та здатні вступати в реакцію з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами лінкерних компонентів та лінкерних реагентів, які включають активні складні ефіри, такі як N-гідроксисукцинімідні ефіри, гідроксибензотриазольні ефіри, галогенформіати та галогенангідриди; алкілгалогеніди та бензилгалогеніди, такі як галоацетаміди; альдегіди, кетони, карбоксильні та малеїмідні групи, без обмеження ними. Антигензв'язувальний білок може мати відновлювані внутрішньоланцюгові дисульфідні зв'язки, тобто цистеїнові місточки. Під дією відновного агента, такого як ДТТ (дитіотреїтол), антигензв'язувальним білкам можна надати здатність вступати в реакцію кон'югації з лінкерними реагентами. Таким чином, кожний цистеїновий місточок теоретично здатний утворювати дві реакційноздатні тіолові нуклеофільні групи. Додаткові нуклеофільні групи можна вводити в антигензв'язувальний білок за допомогою будь-якої реакції, відомої фахівцям в даній області техніки. Як приклад, який не є вичерпним, можна навести введення реакційноздатних тіолових груп в антигензв'язувальний білок за рахунок введення одного чи декількох залишків цистеїну.

Імунокон'югати також можна одержувати шляхом модифікації антигензв'язувального білка з введенням електрофільних компонентів, здатних вступати в реакцію з нуклеофільними замісними групами лінкерних реагентів або цитотоксичних агентів. Вуглеводні компоненти глікозилованих антигензв'язувальних білків можуть бути окисненими та утворювати альдегідні або кетонні групи, здатні вступати в реакцію з амінними групами лінкерних реагентів або цитотоксичних агентів. Утворювані в результаті іміногрупи основ Шифа можуть утворювати стабільні зв'язки або можуть відновлюватися з утворенням стабільних амінних зв'язків. В одному втіленні реакція вуглеводневої частини глікозилизованого антигензв'язувального білка з галактозооксидазою або мета-періодатом натрію може давати карбонільні (альдегідні та кетонні) групи білка, які можуть вступати в реакцію з відповідними групами лікарського засобу. В іншому втіленні білки, що містять N-кінцеві залишки серину або треоніну, можуть вступати в реакцію з мета-періодатом натрію з утворенням альдегіду на місці першої амінокислоти.

В деяких кращих втіленнях лінкерна ланка може мати таку загальну формулу:

--Ta--Ww--Yu--, де:

-T- позначає подовжувальну ланку;

а дорівнює 0 або 1;

-W- позначає амінокислотну ланку;

w незалежно позначає ціле число від 1 до 12;

-Y- позначає спейсерну ланку;

y дорівнює 0, 1 або 2.

Подовжувальна ланка (-T-), при наявності, з'єднує антигензв'язувальний білок з амінокислотною ланкою (-W-). Придатні функціональні групи, які можуть бути присутніми в антигензв'язувальному білку чи то природно, чи то в результаті хімічних маніпуляцій, включають сульфгідрильні, амінні, гідроксильні, аномерні гідроксильні та карбоксильні групи вуглеводів. Придатними функціональними групами є сульфгідрильні та амінні. Сульфгідрильні групи можуть бути одержані при відновленні внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків

антигензв'язувального білка, при їх наявності. В альтернативному випадку сульфгідрильні групи можуть бути одержані при реакції аміногрупи лізину антигензв'язувального білка з 2-імінотіолоном або іншим реагентом, що утворює сульфгідрильні групи. У певних втіленнях антигензв'язувальний білок є рекомбінантним антитілом та створюється у такий спосіб, що несе один чи декілька лізинів. Ще краще, антигензв'язувальний білок створюється таким чином, що несе один чи декілька цистеїнів (порівн. ThioMabs).

В деяких конкретних втіленнях подовжувальна ланка утворює зв'язок з атомом сірки антигензв'язувального білка. Атом сірки може походити з сульфгідрильної (-SH) групи відновленого антигензв'язувального білка.

В деяких інших конкретних втіленнях подовжувальна ланка зв'язана з антигензв'язувальним білком за допомогою дисульфідного зв'язку між атомом сірки антигензв'язувального білка та атомом сірки подовжувальної ланки.

В інших конкретних втіленнях реакційноздатна група подовжувальної ланки містить реакційноздатний центр, який може вступати в реакцію з аміногрупою антигензв'язувального білка. Аміногрупа може бути аміногрупою аргініну або лізину. Придатні реакційноздатні амінні групи включають активовані складні ефіри, такі як сукцинімідні ефіри, 4-нітрофенілові ефіри, пентафторфенілові ефіри, ангідриди, хлорангідриди, сульфонілхлориди, ізоціанати та ізотіоціанати, без обмеження ними.

В іншому аспекті реакційноздатна група подовжувача містить реакційноздатний центр, здатний вступати в реакцію з модифікованими вуглеводними групами, які можуть бути присутніми в антигензв'язувальному білку. В конкретному втіленні антигензв'язувальний білок піддають ферментативному глікозилюванню з утворенням вуглеводного компонента (слід відзначити, що коли антигензв'язувальний білок є антитілом, вказане антитіло, як правило, є природно глікозилованим). Під дією такого реагенту, як періодат натрію, може відбуватися неповне окиснення вуглеводу, і утворюваний в результаті карбонільний компонент окисненого вуглеводу може вступати в реакцію конденсації з подовжувачем, що містить таку функціональну групу, як гідразид, оксим, реакційноздатний амін, гідразин, тіосемікарбазид, гідразинкарбоксилат або арилгідразид.

Амінокислотна ланка (-W-) з'єднує подовжувальну ланку (-T-) зі спейсерною ланкою (-Y-), якщо спейсерна ланка є присутньою, і з'єднує подовжувальну ланку з цитотоксичним агентом, якщо спейсерна ланка відсутня.

Як вказано вище, -Ww- може бути дипептидом, трипептидом, тетрапептидом, пентапептидом, гексапептидом, гептапептидом, октапептидом, нонапептидом, декапептидом, ундекапептидом або додекапептидом.

В деяких втіленнях амінокислотна ланка може містити амінокислотні залишки, такі як аланін, валін, лейцин, ізолейцин, метіонін, фенілаланін, триптофан, пролін, лізин з ацетильною або формільною захисною групою, аргінін, аргінін із захисною тозилною групою або нітрогрупою, гістидин, орнітин, орнітин з ацетильною або формільною захисною групою та цитрулін, без обмеження ними. Ілюстративні приклади амінокислотних лінкерних компонентів краще включають дипептид, трипептид, тетрапептид або пентапептид.

Ілюстративні приклади дипептидів включають: Val-Cit, Ala-Val, Lys-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Phe, Phe-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-тозил-Arg, Phe-N⁹-нітро-Arg.

Ілюстративні приклади трипептидів включають: Val-Ala-Val, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Phe-Phe-Lys, Gly-Gly-Gly, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys.

Ілюстративні приклади тетрапептидів включають: Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO. 33), Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO. 34).

Ілюстративні приклади пентапептидів включають: Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO. 35).

Амінокислотні залишки, які складають амінокислотний лінкерний компонент, включають ті, що існують в природі, а також міnorні амінокислоти та аналоги амінокислот, які не зустрічаються в природі, такі як цитрулін. Амінокислотні лінкерні компоненти можна конструювати та оптимізувати за їх вибірковістю для ферментативного розщеплення конкретними ферментами, наприклад, пухлина-асоційованими протеазами, катепсином В, С та D або протеазою плазміном.

Амінокислотна ланка лінкера може зазнавати ферментативного розщеплення для вивільнення цитотоксичного агента під дією ферментів, що включають пухлина-асоційовану протеазу, без обмеження ними.

Амінокислотну ланку можна створювати та оптимізувати за її вибірковістю для ферментативного розщеплення конкретними пухлина-асоційованими протеазами. Придатними ланками є такі, розщеплення яких каталізується протеазами катепсином В, С та D та плазміном.

Спейсерна ланка (-Y-), при наявності, з'єднує амінокислотну ланку з цитотоксичним агентом. Спейсерні ланки належать до двох основних типів: саморуйнівні спейсери та спейсери, які не зазнають саморуйнування. Спейсерна ланка, яка не зазнає саморуйнування, залишається частково або повністю зв'язаною з цитотоксичним агентом після ферментативного відщеплення амінокислотної ланки від імунокон'югата. Приклади спейсерних ланок, які не зазнають саморуйнування, включають спейсерні ланки (гліцин-гліцин) та гліцинові спейсерні ланки, без обмеження ними. Для вивільнення цитотоксичного агента необхідно проведення незалежної реакції гідролізу усередині клітини-мішені для розщеплення зв'язку між гліцином та лікарським компонентом.

В іншому втіленні спейсерною ланкою (-Y-), що не зазнає саморуйнування, є -Gly-.

В одному втіленні імунокон'югат не має спейсерної ланки (y=0). В альтернативному випадку, імунокон'югат, який містить саморуйнівну спейсерну ланку, може вивільняти цитотоксичний агент без необхідності в проведенні окремого етапу гідролізу. В цих втіленнях -Y- є р-амінобензиловим спиртом (PAB), з'єднаним з -Ww- через атом азоту групи PAB та приєднаний безпосередньо до -D через карбонатну, карбаматну або ефірну групу.

Інші приклади саморуйнівних спейсерів включають ароматичні сполуки, які є електронно-схожими з групою PAB, такі як похідні 2-аміноімідазол-5-метанолу та орто- або пара-амінобензилацеталі, без обмеження ними. Можна застосовувати спейсери, які легко зазнають циклізації при гідролізі амідних зв'язків, такі як заміщені та незаміщені аміди 4-амінобутирової кислоти, відповідно заміщені циклічні системи біцикло[2.2.1] та біцикло[2.2.2] і аміди 2-амінофенілпропіонової кислоти.

В альтернативному втіленні спейсерною ланкою є розгалужений біс-(гідроксиметил)стирол (BHMS), який можна застосовувати для інкорпорування додаткових цитотоксичних агентів.

Наконець, винахід стосується імунокон'югата, описаного вище, для застосування в лікуванні раку.

Рак краще може бути вибраний з Axl-залежних форм раку, включаючи пухлинні клітини, які характеризуються експресією або надекспресією білка Axl або його частини на своїй поверхні.

Більш конкретно, вказаний рак є раком молочної залози, товстої кишки, карциномою стравоходу, гепатоцелюлярною карциномою, раком шлунка, гліомою, раком легені, меланомою, остеосаркомою, раком яєчників, передміхурової залози, рабдоміосаркомою, раком нирки, щитоподібної залози та раком ендометрія матки, а також будь-яким феноменом лікарської резистентності. Інший об'єкт винаходу є фармацевтична композиція, що містить імунокон'югат, описаний в даній заявці.

Більш конкретно, винахід стосується фармацевтичної композиції, яка має в своєму складі імунокон'югат за винаходом з принаймні одним ексципієнтом та/або фармацевтично прийнятним носієм.

В даному описі вираз "фармацевтично прийнятний носій" або "ексципієнт" призначений для позначення сполуки або комбінації сполук, включених до фармацевтичної композиції, які не викликають побічних реакцій та дозволяють, наприклад, полегшити введення діючої речовини (діючих речовин), збільшити тривалість її перебування та/або ефективність в організмі, збільшити її розчинність в розчині або поліпшити її збережність. Такі фармацевтично прийнятні носії та ексципієнти є добре відомими і можуть бути адаптовані фахівцем в даній області в залежності від природи вибраної діючої речовини (діючих речовин) та способу їх введення.

Краще, ці імунокон'югати вводять системно, зокрема, внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, внутрішньошкірним, внутрішньоочеревинним або підшкірним шляхом або оральним шляхом. Ще краще, композицію, що містить імунокон'югати за винаходом, вводять декілька разів послідовно.

Способи введення, дозування та оптимальні лікарські форми можна встановити згідно з критеріями, які звичайно беруть до уваги при доборі лікування, придатного для конкретного пацієнта, наприклад, вік або маса тіла пацієнта, тяжкість його/її загального стану здоров'я, переносності лікування та спостережуваних побічних ефектів.

Інші ознаки та переваги винаходу будуть очевидні з продовження опису, Прикладів та графічних матеріалів, підписи до яких наведені нижче.

Стислий опис графічних матеріалів

Фіг. 1: дослідження цитотоксичності по відношенню до клітин SN12C in vitro із застосуванням кон'югованого вторинного антитіла Mab-zap.

Фіг. 2A, 2B та 2C: визначення специфічності зв'язування 1613F12 з іммобілізованими білками rhAxl-Fc (2A), rhDtk-Fc (2B) або rhMer-Fc (2C) за допомогою твердофазового ІФА.

Фіг. 3: FACS-аналіз зв'язування 1613F12 з людськими пухлинними клітинами.

Фіг. 4: твердофазовий ІФА з використанням іммобілізованого білка gmAxl-Fc ("gm" позначає

мишачий рекомбінантний).

Фіг. 5: визначення зв'язування 1613F12 з клітинами COS7 методом непрямой імунофлуоресценції з оцінкою результатів за допомогою протокової цитометрії.

Фіг. 6: дослідження зв'язування Gas6 методом конкурентного ІФА з використанням 1613F12.

5 Фіг. 7: аналіз епітопів методом вестерн-блотингу із застосуванням лізату клітин SN12C. NH (без нагрівання); NR (в невідновних умовах); H (з нагріванням); R (у відновних умовах). Для підтвердження того, що в гель завантажено однакову кількість зразків, використовували GAPDH.

10 Фіг. 8A та 8B: дослідження зниження рівня експресії Axl після зв'язування 1613F12 з клітинами SN12C методом вестерн-блотингу. Фіг. 8A: репрезентативний вестерн-блот для 3 незалежних експериментів (дослідження методом вестерн-блотингу проводили через 4 год. та 24 год. інкубації 1613F12 з клітинами SN12C); Фіг. 8B: для вимірювання оптичної густини проявленої плівки використовували програмне забезпечення "QuantityOne".

15 Фіг. 9A, 9B та 9C: імунофлуоресцентна мікроскопія клітин SN12C після інкубації з 1613F12. Фіг. 9A: ізотиповий контроль mIgG1 для оцінки неспецифічного поверхневого та внутрішньоклітинного забарвлювання. Фіг. 9B: забарвлення клітинної мембрани. Фіг. 9C: внутрішньоклітинне забарвлювання рецептора Axl з використанням 1613F12, а також ранніх ендосом з використанням маркера EEA1. Нижче представлені суміщені зображення, а ділянки колокалізації вказані стрілками.

20 Фіг. 10: вплив 1613F12 на проліферацію клітин SN12C in vitro у порівнянні з впливом антитіла mIgG1, яке служило ізотиповим контролем.

Фіг. 11A-11K: дослідження прямого цитотоксичного ефекту імунокон'югата 1613F12-сапорин з використанням різних ліній пухлинних клітин людини. A-SN12C, B-Cal-1, C-A172, D-A431, E-DU145, F-MDA-MB435S, G-MDA-MB231, H-PC3, I-NCI-H226, J-NCI-H125, K-Pancl.

25 Фіг. 12: дослідження зв'язування білка rhAxl-Fc з антитілами m1613F12 та hz1613F12 методом твердофазового ІФА.

Фіг. 13: порівняння зв'язування мишачого, химерного та гуманізованого антитіл 1613F12 з клітинами SN12C.

30 Фіг. 14: дослідження прямого цитотоксичного ефекту в присутності імунокон'югата мишачого та гуманізованого 1613F12 із сапорином та ізотипових контролей з використанням лінії пухлинних клітин нирки людини SN12C.

Фіг. 15: дослідження прямого цитотоксичного ефекту в присутності імунокон'югата мишачого та гуманізованого 1613F12 із сапорином та ізотипових контролей з використанням лінії клітин карциноми легені людини Calu-1.

35 Опис прикладів здійснення винаходу

В наведених нижче Прикладах експресія антитіл 1613F12 або m1613F12 позначає мишачу форму антитіла 1613F12. Гуманізовані форми антитіла 1613F12 позначені hz1613F12.

40 Аналогічно, антитіло, використовуване як ізотиповий контроль, є IgG1 миши та позначається 9G4. Це означає, що в наведених нижче Прикладах вирази контроль mIgG1 та 9G4 позначають одне й те саме.

Приклад 1. Інтерналізація рецептора Axl

45 Оскільки використання імунокон'югата є більш ефективним у випадку, коли цільовий антиген є білком, який зазнає інтерналізації, вивчали інтерналізацію рецептора Axl шляхом дослідження цитотоксичності по відношенню до ліній пухлинних клітин людини з використанням реагенту Mab-Zap. Більш конкретно, реагент Mab-Zap є хімічним кон'югатом, який має в своєму складі афінно очищене антитіло кози до IgG миши та інактивуючий рибосоми білок сапорин. При інтерналізації імунного комплексу сапорин відокремлюється від агента, який забезпечує адресну доставку, та інактивує рибосоми, що в результаті приводить до пригнічення синтезу білка і, в кінцевому підсумку, до клітинної загибелі. Визначення життєздатності клітин через 72 години інкубації клітин, позитивних по Axl, з 1613F12 або з антитілом, яке є ізотиповим контролем (mIgG1), дозволяє зробити висновок про те, що 1613F12 індукує інтерналізацію рецептора Axl.

50 В даному Прикладі використовували клітини, що характеризуються високим рівнем експресії Axl, згідно з результатами визначення з використанням реагенту Qifikit (Dako). Результати представлені нижче в Таблиці 5.

Таблиця 5

Антигензв'язувальна здатність доступного для придбання антитіла MAB154, виміряна з використанням пухлинних клітин нирки людини SN12C	
RTK	AXL
Клітинна лінія	MAB154
SN12C	>100000

В цьому Прикладі клітини SN12C використовували як приклад, який не є вичерпним. Можна використовувати будь-які інші клітинні лінії, що експресують достатню кількість рецепторів Axl на своїй поверхні.

Антитіла 1613F12 або ізотиповий контроль mIgG1 в різних концентраціях преінкубували з вторинним антитілом Mab-Zap (Advanced Targeting Systems) в кількості 100 нг в середовищі для культивування клітин протягом 30 хв. при кімнатній температурі. Цю суміш додавали до субконфлюентних клітин SN12C, висіяних в білі 96-лункові планшети для мікротитрування. Планшети інкубували протягом 72 год. при 37 °C в присутності 5 % CO₂. Життєздатність клітин визначали за допомогою набору для дослідження клітинної проліферації Cell Titer Glo згідно з інструкціями виробника (Promega). Використовували декілька контролей: i) без вторинного імунокон'югата та ii) без первинного антитіла. Паралельно проводили дослідження з ізотиповим контролем mIgG1.

Одержані результати представлені на Фіг. 1.

Максимальний цитотоксичний ефект 1613F12 по відношенню до клітин SN12C складав ~36 %. В присутності антитіла 9G4, яке використовувалося в експерименті як ізотиповий контроль, цитотоксичний ефект не спостерігався. В лунках, що містять тільки первинні антитіла, цитотоксичність не спостерігалася (результати не наведені). Таким чином, рецептор Axl є придатним антигеном для створення імунокон'югатів, оскільки імунний комплекс, який містить Axl-1613F12-MabZap, чинить виражений цитотоксичний вплив на цільові клітини.

Приклад 2. Одержання антитіла, спрямованого проти позаклітинного домену rhAxl

Для одержання мишачих моноклональних антитіл (МкАт), спрямованих проти позаклітинного домену (ECD) людського рецептора Axl, 5 мишей BALB/c імунізували 5-кратно п/ш клітинами CHO-Axl в кількості 15-20×10⁶ та двократно rh Axl ECD в кількості 20 мкг. Першу імунізацію проводили в присутності повного ад'юванта Фрейнда (Sigma, St Louis, MD, USA). Для подальших імунізацій використовували неповний ад'ювант Фрейнда (Sigma).

За три дні до проведення злиття, імунізовані миши одержували бустерну ін'єкцію клітин CHO-Axl в кількості 20×10⁶ та rhAxl ECD в кількості 20 мкг разом з неповним ад'ювантом Фрейнда.

Для одержання гібридом виділяли спленоцити та лімфоцити шляхом перфузії селезінки та подрібнення проксимальних лімфовузлів, відповідно, відріжених у 1 з 5 імунізованих мишей (відібраної за результатами титрування сироватки) та зливали з клітинами мієломи SP2/0-Ag14 (ATCC, Rockville, MD, USA). Протокол злиття описаний Kohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975). Потім проводили відбір гібридних клітин в селективному середовищі, що містить гіпоксантин, аміноптерин та тимідин. Як правило, для одержання моноклональних антитіл або їх функціональних фрагментів, зокрема, мишачого походження, можна використовувати методики, описані, зокрема, в посібнику "Antibodies" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988).

Приблизно через 10 днів після процедури злиття проводили скринінг колоній гібридних клітин. При первинному скринінгу в супернатанті гібридом визначали рівень секреції МкАт, спрямованих проти позаклітинного домену білка Axl методом твердофазового ІФА. Паралельно проводили FACS-аналіз для відбору МкАт, здатних зв'язувати клітинну форму Axl, присутнього на поверхні клітин, з використанням клітин CHO дикого типу та клітин CHO, що експресують Axl (ATCC).

Відібрані гібридами якомога раніше клонували шляхом предельного розведення і потім проводили скринінг їх здатності взаємодіяти з позаклітинним доменом білка Axl. Потім визначали ізотип клонованих МкАт з використанням набору для ізотипизації антитіл (cat #5300.05, Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). Для кожної гібридомі відбирали та культивували один клон.

Твердофазовий ІФА виконували, як описано нижче, з використанням нерозведеного супернатанта гібридом або, після визначення вмісту IgG в супернатанті, проводили титрування,

починаючи з концентрації 5 мкг/мл. Потім виконували послідовні розведення $\frac{1}{2}$ в наступних 11 рядах. Стисло, 96-лункові планшети для ІФА (Costar 3690, Corning, NY, USA) покривали білком Axl-Fc в кількості 50 мкл/лунку (R and D Systems, кат. № 154-AL) або rhAxl ECD в концентрації 2 мкг/мл в фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) протягом ночі при 4 °С. Потім планшети блокували

5 ФСБ, що містить 0,5 % желатину (#22151, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) протягом 2 год. при 37 °С. Після видалення блокувального буфера шляхом різкого струшування планшетів, в планшети для ІФА додавали 50 мкл нерозведеного супернатанта гібридом або 50 мкл розчину з концентрацією 5 мкг/мл та інкубували протягом 1 год. при 37 °С. Після трьох відмивань додавали по 50 мкл поліклонального антитіла кози до IgG миши, кон'югованого з

10 пероксидазою хрому (#115-035-164, Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) в розведенні 1/5000 в ФСБ, що містить 0,1 % желатину та 0,05 % Tween 20 (мас.:мас.) та інкубували протягом 1 год. при 37 °С. Потім планшети для ІФА відмивали 3 рази та додавали субстрат ТМВ (#UP664782, Uptima, Interchim, France). Після 10-хвилинної інкубації при кімнатній температурі реакцію зупиняли додаванням 1 М сірчаної кислоти та визначали оптичну густину

15 при 450 нм.

Для відбору методом протокової цитометрії 10^5 клітин (СНО дикого типу (wt) або СНО-Axl) висіювали в кожен лунку 96-лункового планшета в ФСБ, що містить 1 % бичачого сироваткового альбуміну (БСА) та 0,01 % азиду натрію (буфер FACS) при 4 °С. Після центрифугування протягом 2 хв. при 2000 об/хв буфер видаляли і додавали досліджувані супернатанти гібридом

20 або очищені МкАт (1 мкг/мл). Через 20 хв. інкубації при 4 °С клітини двічі відмивали та додавали кон'юговане з Alexa 488 антитіло кози до імуноглобулінів миши, розведене 1/500 в буфері FACS (#A1 1017, Molecular Probes Inc., Eugene, USA) та інкубували протягом 20 хв. при 4 °С. Після фінального відмивання буфером FACS клітини аналізували на протоковому цитометрі (FacsCalibur, Becton-Dickinson) після додавання в кожен пробірник пропідію йодиду в кінцевій

25 концентрації 40 мкг/мл. Лунки, що містять тільки клітини та клітини, що інкубувалися з вторинним антитілом, кон'югованим з Alexa 488, служили негативним контролем. В кожному експерименті використовували ізотиповий контроль (Sigma, ref M90351MG). Для розрахунку середніх значень інтенсивності флуоресценції (MFI, від англ. mean fluorescence intensity) аналізували принаймні 5000 клітин.

Більш конкретно, для злиття використовували 300×10^6 одержаних спленоцитів та 300×10^6 клітин мієломи (співвідношення 1:1). Двісті клітин з одержаної клітинної суспензії висіювали в концентрації 2×10^6 клітин/мл в 30 96-лункових планшетів.

Перший скринінг (приблизно на 14 день після злиття) шляхом твердофазового ІФА з використанням білка rhAxl ECD та за допомогою FACS-аналізу з використанням клітин СНО

35 дикого типу та клітин СНО, експресуючих Axl, дозволив відібрати 10 гібридом, у яких значення оптичної густини (OD) при покритті rh AxlECD перевищували 1, а значення MFI становили менше 50 для клітин СНО дикого типу та вище 200 для клітин СНО-Axl.

Ці 10 гібридом культивували та клонували методом предельного розведення. Кожний 96-лунковий планшет мав кодове позначення. Через 9 днів після висівання супернатанти з

40 планшетів, у яких здійснювали клонування, піддавали скринінгу методом ІФА по відношенню до специфічності зв'язування з позаклітинним доменом білка rh AxlECD. Для кожного планшета з одним кодовим позначенням відбирали три клони та здійснювали їх культивування та ізотипування. Після одержання антитіл до Axl вивчали їх здатність зазнавати інтерналізації при зв'язуванні з Axl на клітинній поверхні.

45 Приклад 3. Специфічність зв'язування Axl

В даному Прикладі спочатку вивчали зв'язування 1613F12 з білком rhAxl-Fc. Потім вивчали його зв'язування з двома іншими представниками сімейства TAM, rhDtk-Fc та rhMer-Fc.

Стисло, рекомбінантні людські білки Axl-Fc (R and D Systems, кат. № 154AL/CF), rhDtk (R and D Systems, кат. № 859-DK) або rhMer-Fc (R and D Systems, кат. № 891-MR) наносили на 96-

50 лункові планшети Immulon II та залишали при 4 °С протягом ночі. Після блокування протягом 1 год. 0,5 % розчином желатину додавали очищене антитіло 1613F12 в початковій концентрації 5 мкг/мл ($3,33 \times 10^{-8}$ М) та інкубували ще 1 год. при 37 °С. Потім виконували послідовні розведення $\frac{1}{2}$ в 12 рядах. Планшети відмивали та додавали антитіло кози, специфічне до імуноглобулінів миши, кон'юговане з пероксидазою хрому (Jackson) на 1 год. при 37 °С. Для проявлення забарвлення використовували розчин субстрату ТМВ. Паралельно також використовували

55 ізотиповий контроль (mIgG1) та доступне для придбання антитіло Mab 154, спрямоване проти Axl. Для підтвердження того, що планшети були покриті досліджуваним білком, використовували мічене HRP антитіло кози, спрямоване проти IgG людини, специфічне до фрагмента Fc (Jackson, ref 109-035-098) та/або кон'юговане з HRP антитіло, спрямоване проти гістидину (R and D Systems, ref: MAB050H). Результати представлені на Фіг. 2А, 2В та 2С,

60

відповідно.

В даному Прикладі показано, що антитіло 1613F12 зв'язується тільки з білком rhAxl-Fc і не зв'язується з двома іншими представниками сімейства TAM, rhDtk або rhMer. Перехресна специфічність зв'язування антитіла 1613F12 з представниками сімейства TAM не спостерігалася. За відсутності первинного антитіла (дилуент) неспецифічного зв'язування не спостерігалася. В присутності ізотипового контрольного антитіла зв'язування не спостерігалася.

Приклад 4: 1613F12 розпізнає клітинну форму Axl, експресовану пухлинними клітинами

Рівень експресії Axl на поверхні пухлинних клітин людини спочатку визначали з використанням доступного для придбання антитіла проти Axl (R and D Systems, ref: MAB 154) одночасно з використанням калібрувальних бусин для кількісної оцінки рівня експресії Axl. Потім вивчали зв'язування Axl, присутнього на клітинній поверхні, з використанням 1613F12.

Для дослідження поверхневого зв'язування готували послідовні двократні розведення розчину первинного антитіла з концентрацією 10 мкг/мл ($6,66 \times 10^{-8}$ М) (1613F12, антитіло MAB154 або ізотиповий контроль (mIgG1) МкАт 9G4) та додавали до клітин в кількості 2×10^5 на 20 хв. при 4 °С. Після 3 відмивань фосфатно-сольовим буфером (ФСБ) з додаванням 1 % БСА та 0,01 % NaN_3 , клітини інкубували з вторинним антитілом кози, спрямованим проти імуноглобулінів миши, кон'югованим з Alexa 488 (в розведенні 1/500) протягом 20 хвилин при 4 °С. Після 3 додаткових відмивань ФСБ з додаванням 1 % БСА та 0,1 % NaN_3 , клітини аналізували на протоковому цитометрі (FacsCalibur, Becton-Dickinson). Для розрахунку середніх значень інтенсивності флуоресценції аналізували принаймні 5000 клітин.

Для кількісного визначення антигенів клітинної поверхні в одиницях ABC (від англ. antibody binding capacity, антитіло-зв'язувальна здатність) з використанням антитіла MAB 154 застосовували калібрувальні бусини QIFIKIT®. Потім клітини інкубували одночасно з бусинами QIFIKIT® та поліклональним антитілом кози (F(ab')_2) до імуноглобулінів миши, кон'югованим з FITC, в насичувальній концентрації. Потім визначали кількість антигенних сайтів на поверхні клітин в досліджуваному зразку при інтерполяції калібрувальної кривої (залежності інтенсивності флуоресценції окремих популяцій бусин від числа молекул МкАт на бусинах).

4.1. Кількісне визначення рівня експресії Axl на клітинній поверхні

Рівень експресії Axl на поверхні пухлинних клітин людини визначали непрямим імунofлуоресцентним методом за допомогою протокової цитометрії з використанням набору для кількісного визначення антигенів клітинної поверхні (QIFIKIT®, Dako, Denmark). Побудова графіка залежності середньої інтенсивності флуоресценції (MFI) від антитіло-зв'язувальної здатності калібрувальних бусин дозволяє визначити антитіло-зв'язувальну здатність клітинних ліній.

В Таблиці 6 представлений рівень експресії Axl, виміряний на поверхні різних ліній клітин пухлин людини (SN12C, Calu-1, A172, A431, DU145, MDA-MB435S, MDA-MB231, PC3, NCI-H226, NCI-H125, MCF7, Panel) (ATCC, NCI) з використанням набору QIFIKIT® та доступного для придбання антитіла MAB154 (R and D Systems). Значення виражені як антитіло-зв'язувальна здатність (ABC).

Таблиця 6

	MCF7	NCI-H125	MDA-MB-4355	Panc1	MDA-MB-231	Calu-1	SN12C
Тип пухлини / орган	Молочна залоза	НДКРЛ	Молочна залоза	Підшлункова залоза	Молочна залоза	Легені	Нирки
ABC (Qifikit)	71	5540	17814	36809	61186	>100000	>100000

	A172	A431	DU-145	PC3	NCI-H226
Тип пухлини / орган	Гліобластома	Плоскоклітинна карцинома	Передміхурова залоза	Передміхурова залоза	НДКРЛ
ABC (Qifikit)	52421	3953	55268	8421	32142

Результати, одержані з доступним для придбання моноклональним антитілом, спрямованим проти Axl (MAB154), показали, що рецептор Axl експресується на різних рівнях, в залежності від досліджуваних людських пухлинних клітин.

4.2. Детекція Axl на людських пухлинних клітинах з використанням 1613F12

Більш конкретно, зв'язування Axl вивчали з використанням 1613F12.

Будували криві залежності доза-ефект для 1613F12. Значення MFI, одержані для різних людських пухлинних клітин, аналізували в програмі Prism. Результати представлені на Фіг. 3.

Результати показують, що 1613F12 специфічно зв'язується з мембранним рецептором Axl, що підтверджується профілем кривої насиченості. Однак, спостерігається різна інтенсивність мічення, що відображає різний рівень експресії поверхневого рецептора Axl на людських пухлинних клітинах. При використанні лінії пухлинних клітин молочної залози людини MCF7 зв'язування з рецептором Axl не спостерігалось.

Приклад 5: Міжвидова перехресна специфічність 1613F12

Міжвидову перехресну специфічність 1613F12 вивчали з використанням двох біологічних видів: миши та мавпи. Спочатку досліджували зв'язування рекомбінантного мишачого (rm) рецептора Axl методом твердофазового ІФА (Фіг. 4). Потім виконували дослідження методом протокової цитометрії з використанням клітин мавпи COS7, оскільки ці клітини експресують на своїй поверхні рецептор Axl (Фіг. 5). Клітинна лінія COS7 була одержана шляхом іморталізації клітин лінії CV-1, одержаних з клітин нирок африканської зеленої мавпи, за допомогою вірусу SV40 з версією геному, що забезпечує продукцію великого Т-антигену, але є дефектною по реплікації.

Імуноферментний аналіз rmAxl-Fc

Стикло, рекомбінантні мишачі білки Axl-Fc (R and D Systems, кат. № 854-AX /CF) наносили на 96-лункові планшети Immulon II та залишали при 4 °C протягом ночі. Після блокування протягом 1 год. 0,5 % розчином желатину додавали очищене антитіло 1613F12 ще на 1 год. при 37 °C в початковій концентрації 5 мкг/мл ($3,33 \times 10^{-8}$ М). Потім виконували послідовні розведення $\frac{1}{2}$ в 12 рядах. Планшети відмивали та додавали антитіло кози, специфічне до імуноглобулінів миши, кон'юговане з пероксидазою хрому (Jackson) на 1 год. при 37 °C. Для проявлення забарвлення використовували розчин субстрату TMB. Паралельно також використовували ізотиповий контроль (mIgG1) та доступне для придбання антитіло Mab 154. Для підтвердження того, що планшети були покриті досліджуваним білком, використовували мічене HRP антитіло кози, спрямоване проти IgG людини, специфічне до фрагмента Fc (Jackson, ref 109-035-098) та/або кон'юговане з HRP антитіло, спрямоване проти гістидину (R and D Systems, ref: MAB050H).

Результати представлені на Фіг. 4. На даній Фіг. показано, що 1613F12 не зв'язується з позаклітинним доменом Axl миши. За відсутності первинного антитіла (дилуент) специфічного зв'язування не спостерігалось.

FACS COS7

Для дослідження зв'язування з клітинами 1613F12 використовували клітини COS7, 2×10^5 клітин інкубували з антитілом в діапазоні концентрацій, одержаних при послідовному розведенні $\frac{1}{2}$ (12 точок) розчину антитіла 1613F12 з концентрацією 10 мкг/мл ($6,66 \times 10^{-8}$ М) або ізотипового контролю (mIgG1) протягом 20 хв. при 4 °C. Після 3 відмивань фосфатно-сольовим буфером (ФСБ) з додаванням 1 % БСА та 0,01 % NaN_3 , клітини інкубували з вторинним антитілом кози, спрямованим проти імуноглобулінів миши, кон'югованим з Alexa 488 (в розведенні 1/500) протягом 20 хвилин при 4 °C. Після 3 додаткових відмивань ФСБ з додаванням 1 % БСА та 0,1 % NaN_3 , клітини аналізували на протоковому цитометрі (FacsCalibur, Becton-Dickinson). Для розрахунку середніх значень інтенсивності флуоресценції аналізували принаймні 5000 клітин. Дані аналізували в програмі Prism.

Результати представлені на Фіг. 5. Крива титрування, побудована для клітин COS7 з використанням 1613F12, підтверджує, що антитіло 1613F12 є здатним розпізнавати клітинну форму рецептора Axl мавп, експресовану на поверхні клітин COS7. Плато досягається при концентраціях 1613F12 вище 0,625 мкг/мл ($4,2 \times 10^{-10}$ М). В присутності ізотипового контролю (mIgG1) зв'язування не спостерігалось.

Даний Приклад ілюструє той факт, що 1613F12 не має перехресної реактивності по відношенню до рецептора Axl миши. Навпаки, він міцно зв'язується з рецептором Axl мавпи, експресованим на поверхні клітин COS7.

Приклад 6. Аналіз конкурентного зв'язування Gas6, що проводився в присутності 1613F12

Для додаткової характеристики 1613F12 досліджували його конкуренцію з Gas6. В даному дослідженні вільний білок rhAxl-Fc та 1613F12 інкубували для утворення комплексу антиген-антитіло і потім комплекси наносили на поверхність аналітичних планшетів, покритих Gas6. Незв'язані комплекси антиген-антитіло потім відмивали перед додаванням міченого ферментом вторинного антитіла, спрямованого проти Fc-частини білка rhAxl-Fc, що має людське походження. Потім додавали субстрат та визначали концентрацію антигену за величиною

сигналу, що розвивався в результаті реакції фермент-субстрат.

Стисло, реакційну суміш, що містить білок rhAxl-Fc в присутності або за відсутності досліджуваних моноклональних антитіл до Axl, готували в окремих планшетах, заблокованих 0,5 % розчином желатину в ФСБ 1×. Виконували послідовні розведення 1:2 мишачих антитіл до Axl (в 12 рядках, починаючи з 80 мкг/мл). Потім додавали білок rhAxl-Fc в концентрації 0,5 мкг/мл (R and D Systems, ref. 154AL/CF) за винятком ряду, що служив негативним контролем, у якому знаходився тільки дилуент (0,1 % желатин, 0,05 % Tween 20 в ФСБ 1×). Після перемішування зразки для проведення конкурентного аналізу додавали в планшети, покриті Gas6, з використанням розчину rhGas6 в ФСБ (R and D Systems кат. № 885-GS-CS / CF) в концентрації 6 мкг/мл. Після інкубації та декількох відмивань зв'язаний білок rhAxl-Fc детектували з використанням кон'югованого з HRP антитіла кози до IgG людини (Jackson, ref. 109-035-098). Після зв'язування в планшети додавали субстрат TMB. Реакцію зупиняли додаванням 1М розчину H₂SO₄ та вимірювали одержану оптичну густину при 450 нм за допомогою планшетного спектрофотометра.

Даний експеримент показує (Фіг. 6), що 1613F12 конкурує з іммобілізованим лігандом за зв'язування rhAxl-Fc. Конкуренція з Gas6 за зв'язування спостерігається в присутності антитіла 1613F12 в концентраціях вище 2,5 мкг/мл ($1,67 \times 10^{-8}$ М). Зв'язування rhAxl-Fc з іммобілізованим Gas6 в присутності 1613F12 в концентраціях вище 10 мкг/мл ($6,67 \times 10^{-8}$ М) вже не спостерігалось. 1613F12 блокує зв'язування Gas6 з rhAxl-Fc.

Приклад 7. Дослідження епітопів методом вестерн-блотингу

Для визначення, чи розпізнає 1613F12 лінійний або конформаційний епітоп, проводили аналіз методом вестерн-блотингу з використанням лізатів клітин SN12C. Зразки обробляли у відновних або невідновних умовах. Якщо виявляється смуга, що відповідає відновленій формі зразка, досліджуване антитіло розпізнає лінійний епітоп позаклітинного домену, в противному випадку воно спрямоване проти конформаційного домену Axl ECD.

Клітини SN12C висіювали в середовищі RPMI з додаванням 10 % інактивованої нагріванням ембріональної телячої сироватки (FBS, від англ. fetal bovine serum) + 2 мМ L-глутаміну в концентрації 5×10^4 клітин/см² у флаконах T162 см² на 72 год. при 37 °C в атмосфері з вмістом 5 % CO₂. Потім клітини двічі відмивали фосфатним сольовим буфером (ФСБ) та лізували в 1,5 мл льодяного лізуючого буфера [50 мМ Tris-HCl (pH 7,5); 150 мМ NaCl; 1 % Nonidet P40; 0,5 % дезоксихолат та 1 таблетка повного коктейлю інгібіторів протеаз + 1 % антифосфатаз]. Клітинні лізати перемішували протягом 90 хв. при 4 °C та центрифугували при 15000 об/хв протягом 10 хв. для видалення клітинного дебрису. Концентрацію білка визначали методом з біцинхоніною кислотою. Завантажували різні зразки. Спочатку готували 10 мкг клітинного лізату (10 мкг в 20 мкл) у відновних умовах (1× буфер для внесення зразків (BIORAD) + 1× відновний агент (BIORAD)) та після 2 хв. інкубації при 96 °C завантажували в ДСН-ПАГ. Потім в невідновних умовах (тільки в 1× буфері для внесення зразків (BIORAD)) готували два інших зразки клітинного лізату по 10 мкг. До завантаження в ДСН-ПАГ, один з цих двох останніх зразків нагрівали протягом 2 хв. при 96 °C; інший залишали на льоді. Після закінчення міграції білки переносили на нітроцелюлозну мембрану. Мембрани блокували протягом 1 год. при кімнатній температурі за допомогою TBS-Tween 20 0,1 % (TBST) з 5 % знежиреного молока та інкубували з 1613F12 в концентрації 10 мкг/мл протягом ночі при 4 °C. Антитіла розводили в Трис-сольовому буфері з додаванням 0,1 % Tween 20 (об./об.) (TBST) з 5 % знежиреного сухого молока. Потім мембрани відмивали TBST та інкубували з вторинним антитілом, кон'югованим з пероксидазою (розведення 1/1000) протягом 1 год. при кімнатній температурі. Для виявлення імунореактивних білків використовували ECL (Pierce #32209). Після візуалізації Axl мембрани знов промивали однократно TBST та інкубували протягом 1 год. при кімнатній температурі з мишачим антитілом до GAPDH (в розведенні 1/200000). Потім мембрани відмивали TBST та інкубували з вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою, протягом 1 год. при кімнатній температурі. Мембрани відмивали і для виявлення GAPDH використовували ECL.

Результати представлені на Фіг. 7.

1613F12 переважно розпізнає конформаційний епітоп, оскільки специфічна смуга в основному спостерігається в невідновних умовах. Однак, слабкий сигнал спостерігається при міграції лізату клітин SN12C в денатуруючих умовах, що вказує на те, що 1613F12 має здатність слабо зв'язуватися з лінійним епітопом.

Приклад 8. Вимірювання знижувальної регуляції Axl, викликуваної 1613F12, методом вестерн-блотингу

В наступному Прикладі для вивчення активності антитіл, спрямованих проти Axl, по відношенню до експресії рецептора Axl, вибрали лінію клітин карциноми нирки людини SN12C (ATCC). Клітини лінії SN12C характеризуються підвищеною експресією рецептора Axl. Зниження

експресії Axl вивчали методом вестерн-блотингу з використанням клітинних екстрактів, як показано на Фіг. 8A-8B.

Клітини SN12C інкубували в середовищі RPMI з додаванням 10 % інактивованої нагріванням FBS та 2 mM L-глутаміну в концентрації 6×10^4 клітин/см² в 6-лункових планшетах протягом 48 год. при 37 °C в атмосфері з вмістом 5 % CO₂. Після двох відмивань фосфатно-сольовим буфером (ФСБ) клітини піддавали сироватковому голодуванню в середовищі, що містить або ліганд - рекомбінантний gas6 миши в концентрації 800 нг/мл (R and D Systems, ref: 986-GS/CF), або антитіло 9G4 в концентрації 10 мкг/мл, що використовувалося як ізотиповий контроль (mIgG1), або антитіло до Axl за даним винаходом в концентрації 10 мкг/мл та інкубували додатково протягом 4 год. або 24 год. Потім середовище акуратно видаляли, а клітини двічі промивали холодним ФСБ. Клітини лізували в 200 мкл льодяного лізуючого буфера [50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 % Nonidet P40; 0,5 % дезоксихолат та 1 таблетка повного коктейлю інгібіторів протеаз + 1 % антифосфатаз]. Клітинні лізати перемішували протягом 90 хв. при 4 °C та центрифугували при 15000 об/хв протягом 10 хв. для видалення клітинного дебрису. Концентрацію білка визначали методом з біцінхоніною кислотою. Клітинні лізати (10 мкг в 20 мкл) розділяли методом ДСН-ПАГ та переносили на нітроцелюлозну мембрану. Мембрани блокували протягом 1 год. при кімнатній температурі за допомогою TBS-Tween 20 0,1 % (TBST) з 5 % знежиреного молока та інкубували з доступним для придбання антитілом M02, спрямованим проти Axl, в концентрації 0,5 мкг/мл (AbNova H00000558-M02) протягом ночі при 4 °C. Антитіла розводили в Трис-сольовому буфері з додаванням 0,1 % Tween 20 (об./об.) (TBST) з 5 % знежиреного сухого молока. Потім мембрани відмивали TBST та інкубували з вторинним антитілом, кон'югованим з пероксидазою (розведення 1/1000) протягом 1 год. при кімнатній температурі. Для виявлення імунореактивних білків використовували ECL (Pierce #32209). Після візуалізації Axl мембрани знов промивали однократно TBST та інкубували протягом 1 год. при кімнатній температурі з мишачим антитілом до GAPDH (в розведенні 1/200000). Потім мембрани відмивали TBST та інкубували з вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою, протягом 1 год. при кімнатній температурі. Мембрани відмивали і для виявлення GAPDH використовували ECL. Інтенсивність сигналу визначали за допомогою денситометрії.

Результати, представлені на Фіг. 8A та 8B, є репрезентативними для 3 незалежних експериментів та показують, що 1613F12 знижує рівень експресії Axl в пухлинних клітинах людини, що характеризуються надекспресією Axl. Через 4 год. 1613F12 знижує рівень експресії Axl на 66 %, а через 24 год. інкубації з 1613F12 - на 87 %.

Приклад 9. Дослідження впливу 1613F12 на експресію Axl на поверхні клітин методом протокової цитометрії

Методика протокової цитометрії дозволяє детектувати поверхневі рецептори Axl. Застосування цієї методики дозволяє продемонструвати вплив антитіл на експресію Axl на клітинній мембрані. В даному Прикладі використовували пухлинні клітини нирки людини SN12C, що експресують високий рівень Axl.

Пухлинні клітини лінії SN12C культивували в середовищі RPMI1640 з додаванням 1 % L-глутаміну та 10 % FCS протягом 3 днів до початку експерименту. Потім клітини трипсинізували та висіювали в 6-лункові планшети в середовищі RPMI1640 з додаванням 1 % L-глутаміну та 5 % FBS. Наступного дня додавали досліджувані антитіла в концентрації 10 мкг/мл. Декілька лунок залишали необробленими. Клітини інкубували при 37 °C, 5 % CO₂. Через 24 години клітини відмивали ФСБ, відділяли та інкубували з тими самими досліджуваними антитілами в буфері FACS (ФСБ, 1 % BSA, 0,01 % азид натрію). Необроблені лунки також забарвлювали тим самим антитілом для порівняння інтенсивності сигналу, одержаного з тим самим MкАт у оброблених та необработаних клітин. Клітини інкубували протягом 20 хвилин при 4 °C та відмивали три рази буфером FACS. Мічене Alexa 488 антитіло кози до IgG миши інкубували протягом 20 хвилин і клітини відмивали три рази перед проведенням FACS-аналізу клітинної популяції, негативної по пропідію йодиду.

Визначали два показники: (i) різницю між флуоресцентним сигналом на поверхні необроблених (без антитіла (Ат)) клітин у порівнянні з обробленими антитілом клітинами через 24 год., та (ii) процентний вміст залишку Axl на клітинній поверхні. Процентний вміст залишку Axl розраховували у такий спосіб:

$$\% \text{ залишку Axl} = (\text{MFI}_{\text{з Ат 24 год.}} / \text{MFI}_{\text{без Ат 24 год.}}) \times 100$$

В Таблиці 7 представлені результати одного експерименту, який є репрезентативним. Результати відтворювалися в трьох незалежних експериментах.

Різниця в значеннях MFI при забарвленні MкАт необроблених клітин та забарвленні тим самим антитілом в умовах обробки відображає зниження рівня експресії білка Axl на поверхні

клітин внаслідок зв'язування досліджуваного МкАт. В умовах без антитіла та в присутності ізотипового контрольного антитіла (m9G4) були одержані схожі результати.

Таблиця 7

Мічення	Обробка	MFI через 24 год.	Δ (MFI _{без Ат 24год.} необроблених клітин – MFI _{з-Ат 24год.})	Залишок AxI (%)
1613F12	Без антитіла	938	514	45,2
	1613F12	424		
9G4	Без антитіла	11	-2	117
	9G4	13		
MAV154	Без антитіла	950	не вимір.	не вимір.
	9G4	не вимір.		

5 Результати показують, що середня інтенсивність флуоресцентного сигналу, зареєстрованого на поверхні клітин, оброблених 1613F12 протягом 24 годин, знижена (-514) порівняно з MFI, одержаною для необроблених клітин, мічених 1613F12. Через 24 год. інкубації з антитілом 1613F12 на поверхні клітин SN12C залишається 45,2 % рецепторів AxI клітинної поверхні.

10 Приклад 10. Вивчення інтерналізації 1613F12 імуногістохімічним методом з флуоресцентною детекцією

Додаткові результати були одержані при вивченні інтерналізації методом непрямой імунофлуоресценції з використанням конфокальної мікроскопії.

15 Стисло, пухлинні клітини лінії SN12C культивували в середовищі RPMI1640 з додаванням 1 % L-глутаміну та 10 % FCS протягом 3 днів до початку експерименту. Потім клітини відокремлювали за допомогою трипсину та висіювали в 6-лункові планшети з накривним склом, що містять RPMI1640 з додаванням 1 % L-глутаміну та 5 % FCS. Наступного дня додавали 1613F12 в концентрації 10 мкг/мл. Крім того, використовували клітини, оброблені нерелевантним антитілом. Потім клітини інкубували протягом 1 год. та 2 год. при 37 °C, 5 % CO₂. Для точки часу 0 год. клітини інкубували протягом 30 хвилин при 4 °C для визначення зв'язування антитіла з клітинною поверхністю. Клітини відмивали ФСБ та фіксували параформальдегідом протягом 15 хвилин. Для детекції антитіла, що залишилося на клітинній поверхні, клітини промивали та інкубували з антитілом кози, спрямованим проти IgG миши, кон'югованим з Alexa 488, протягом 60 хвилин при 4 °C. Для реєстрації проникнення антитіла усередину клітин, клітини фіксували та пермеабілізували сапоніном. Для забарвлення антитіла на поверхні мембрани та усередині клітини використовували антитіло кози, спрямоване проти IgG миши, мічене Alexa 488 (Invitrogen). Ранні ендосоми ідентифікували за допомогою поліклонального кролячого антитіла, спрямованого проти EEA1 та антитіла кози, спрямованого проти IgG кроля, міченого Alexa 555 (Invitrogen). Клітини відмивали три рази та забарвлювали ядра Draq5. Після забарвлення клітини заключали в гістологічне середовище Prolong Gold (Invitrogen) та аналізували за допомогою конфокального мікроскопа Zeiss LSM 510.

Фотографії представлені на Фіг. 9A-9C.

35 Зображення були одержані за допомогою конфокальної мікроскопії. В присутності ізотипового контролю mIgG1 (9G4) не спостерігалось ані мембранного, ані внутрішньоклітинного забарвлення (Фіг. 9A). Вже через 1 год. інкубації клітин SN12C з 1613F12 спостерігалось поступове зниження інтенсивності забарвлення мембрани на AxI (Фіг. 9B). Через 1 год. та 2 год. виразно спостерігалось накопичення антитіла 1613F12 усередині клітин (Фіг. 9C). Відзначалась колокалізація антитіла усередині клітин з маркером ранніх ендосом EEA1. Ці знімки підтверджують, що відбувається інтерналізація 1613F12 клітинами SN12C.

40 Приклад 11. Протипухлинна активність in vitro, опосередковувана антитілом, спрямованим проти AxI

Дослідження проліферації SN12C

45 Клітини SN12C в кількості 10000 на лунку висіювали в середовищі, що не містить FCS, в 96-лункові планшети на ніч при 37 °C в атмосфері, що містить 5 % CO₂. Наступного дня клітини попередньо інкубували з кожним антитілом в концентрації 10 мкг/мл протягом 1 год. при 37 °C. Клітини обробляли в присутності або за відсутності mGas6 (R and D Systems, кат. N°986-GS/CF), додаючи ліганд безпосередньо в лунку, а потім залишали рости протягом 72 год. Проліферацію оцінювали за включенням ³H тимідину.

Результати представлені на Фіг. 10. При додаванні 1613F12 до клітин SN12C ефект не

спостерігався.

Приклад 12. Цитотоксичність імунокон'югата 1613F12-сапорин по відношенню до різних ліній пухлинних клітин людини

Даний Приклад демонструє цитотоксичність 1613F12, зв'язаного із сапорином. З цією метою досліджували прямий цитотоксичний ефект *in vitro* з використанням великої панелі ліній пухлинних клітин людини (Фіг. 11A-11K). Ця панель пухлинних клітинних ліній характеризується різною експресією AxI на клітинній поверхні.

Стикло, 5000 клітин висіювали в 96-лункові культуральні планшети в 100 мкл відповідного середовища для культивування, що містить 5 % FBS (день 0). Через 24 години інкубації в атмосфері з вмістом 5 % CO₂ при 37 °C, до клітин додавали різні концентрації імунокон'югата (1613F12-сапорин або 9G4-сапорин) або голого антитіла (1613F12 або 9G4). Потім культуральні планшети інкубували при 37 °C в інкубаторі у вологій атмосфері, що містить 5 % CO₂, протягом 72 годин.

На 4 день оцінювали життєздатність клітин люмінесцентним методом за допомогою набору CellTiter-Glo® (Promega Corp., Madison, Wis.), що дозволяє визначити число життєздатних клітин в культурі по кількості АТФ, як індикатору метаболічно активних клітин. Люмінесценцію реєстрували за допомогою люмінометра.

За величиною люмінесцентного сигналу розраховували цитотоксичність, виражену в процентах, за такою формулою:

цитотоксичність (%) = $100 - [(RLU_{\text{Ат-сап}} \times 100) / RLU_{\text{без Ат}}]$

На Фіг. 11A-11K представлені графіки, які зображують цитотоксичність, виражену в процентах, в залежності від концентрації імунокон'югатів, одержану в окремих дослідженнях цитотоксичності *in vitro* по відношенню до пухлинних клітин (A) SN12C, (B) Calu-1, (C) A 172, (D) A431, (E) DU145, (F) MDA-MB-435S, (G) MDA-MB-231, (H) PC3, (I) NCI-H226, (J) NCI-H125 або (K) Рапс1, оброблених різними концентраціями імунокон'югата 1613F12-сапорин.

На Фіг. 11A-11K показано, що імунокон'югат 1613F12-сапорин виявляє цитотоксичність по відношенню до цих різних ліній пухлинних клітин людини. Потужність цитотоксичного ефекту залежить від лінії пухлинних клітин людини.

Приклад 13. Гуманізація варіабельних доменів антитіла 1613F12

Застосування мишачих антитіл (МкАт) в терапевтичних цілях у людей, як правило, приводить до серйозних небажаних ефектів, у пацієнтів розвивається імунна відповідь на мишачі антитіла (НАМА-відповідь, від англ. human anti-mouse antibody), тим самим знижуючи ефективність лікування та роблячи неможливим тривале введення. Одним з підходів до подолання даної проблеми є гуманізація мишачих МкАт шляхом заміни мишачих послідовностей їх еквівалентами людського походження без зміни антигензв'язувальної активності. Цього можна досягти двома способами: (i) шляхом конструювання химерних антитіл миша/людина, в яких мишачі варіабельні ділянки приєднані до людських константних ділянок (Boulianne et al., 1984), та (ii) шляхом пересадження ділянок, що визначають комплементарність (CDR), з варіабельних ділянок миши на ретельно вибрані людські варіабельні ділянки і потім приєднання цих "реконструйованих людських" варіабельних ділянок до людських константних ділянок (Riechmann et al., 1988).

13.1. Створення гуманізованих версій антитіла 1613F12

13.1.1. Гуманізація варіабельного домену легкого ланцюга VL

На попередньому етапі нуклеотидну послідовність 1613F12 VL порівнювали з послідовностями мишачих генів зародкової лінії з бази даних IMGT (<http://www.imgt.org>). Були ідентифіковані мишачі гени зародкової лінії IGKV16-104*01 та IGKJ5*01. Для ідентифікації найкращих людських кандидатних послідовностей для пересаджування CDR проводили пошук людських генів зародкової лінії, які мають найбільшу ідентичність з послідовністю 1613F12 VL миши. За допомогою опції для аналізу бази даних IMGT ідентифікували можливі акцепторні людські V-ділянки для мишачих CDR 1613F12 VL: IGKV 1-27*01 та IGKJ4*02. Для гуманізації варіабельного домену легкого ланцюга усі залишки, що відрізняються між людською та мишачою послідовностями, були ранжовані за значущістю. Ці порядкові номери (1-4) використовували для створення 11 різних гуманізованих варіантів варіабельної ділянки легкого ланцюга, які мають до 14 зворотних мутацій.

	FR1-IMGT	CDR1-IMGT	FR2-IMGT	CD
1613F12VL	DVQITQSPSSSLASVGDRTITTCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVNKLLIY	SG
Homsap IGKV1-27*01	DIQMTQSPSSSLASVGDRTITTCRAS	QGI.....SNY	LAWYQKPGKVPKLLIY	AA
Priority	V I Y A T P E T I N 1 1 3 34 4 433 2		E T N 3 33	
hz1613F12 (VL1)	DIQMTQSPSSSLASVGDRTITTCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL1I2V)	DVQMTQSPSSSLASVGDRTITTCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL1M4I)	DIQITQSPSSSLASVGDRTITTCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL2.1)	DVQITQSPSSSLASVGDRTITTCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL2.1V49T)	DVQITQSPSSSLASVGDRTITTCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL2.1P50N)	DVQITQSPSSSLASVGDRTITTCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL2.2)	DVQITQSPSSSLASVGDRTITTCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL2.2V49T)	DVQITQSPSSSLASVGDRTITTCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL2.2P50N)	DVQITQSPSSSLASVGDRTITTCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL2.3)	DVQITQSPSSSLASVGDRTITTCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
hz1613F12 (VL3)	DVQITQSPSSSLASVGDRTITTCRAS	KSI.....SKY	LAWYQKPGKVPKLLIY	SG
	R2-IMGT	FR3-IMGT		
1613F12VLS TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC			
Homsap IGKV1-27*01S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		E F M F 4 4 4 2	
Priority				
hz1613F12 (VL1)S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC			
hz1613F12 (VL1I2V)S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC			
hz1613F12 (VL1M4I)S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC			
hz1613F12 (VL2.1)S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC			
hz1613F12 (VL2.1V49T)S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC			
hz1613F12 (VL2.1P50N)S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC			
hz1613F12 (VL2.2)S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC			
hz1613F12 (VL2.2V49T)S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC			
hz1613F12 (VL2.2P50N)S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC			
hz1613F12 (VL2.3)S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC			
hz1613F12 (VL3)S TLQSGVP.SRFSGSG..SGTDFTLTISSLQPEDVATYYC			
	CDR3-IMGT	FR4-IMGT		
1613F12VL	QQHNEYPLT FGAGTELEIK			
Homsap IGKJ4*02	LT FGGGTKVEIK			
Priority	A E L L 3 33 4			
hz1613F12 (VL1)	QQHNEYPLT FGGGTKVEIK			
hz1613F12 (VL1I2V)	QQHNEYPLT FGGGTKVEIK			
hz1613F12 (VL1M4I)	QQHNEYPLT FGGGTKVEIK			
hz1613F12 (VL2.1)	QQHNEYPLT FGGGTKVEIK			
hz1613F12 (VL2.1V49T)	QQHNEYPLT FGGGTKVEIK			
hz1613F12 (VL2.1P50N)	QQHNEYPLT FGGGTKVEIK			
hz1613F12 (VL2.2)	QQHNEYPLT FGGGTKVEIK			
hz1613F12 (VL2.2V49T)	QQHNEYPLT FGGGTKVEIK			
hz1613F12 (VL2.2P50N)	QQHNEYPLT FGGGTKVEIK			
hz1613F12 (VL2.3)	QQHNEYPLT FGGGTKVEIK			
hz1613F12 (VL3)	QQHNEYPLT FGAGTELEIK			

13.1.2 Гуманізація варіабельного домену важкого ланцюга VH

- Для ідентифікації найкращих людських кандидатних послідовностей для пересаджування CDR, проводили пошук мишачих та людських генів зародкової лінії, які мають найбільшу ідентичність з послідовністю 1613F12 VH. Нуклеотидну послідовність 1613F12 VH зіставляли з послідовностями генів зародкової лінії миши та людини за допомогою програми для вирівнювання послідовностей "IMGT/V-QUEST", яка є частиною бази даних IMGT. Також здійснювали вирівнювання амінокислотних послідовностей для верифікації вирівнювання нуклеотидних послідовностей за допомогою програми "Align X" пакету програм VectorNTI. Вирівнювання з мишачими генами зародкової лінії показало, що мишачі зародкові V-ген IGHV14-3*02 та J-ген IGHJ2*01 є найбільш гомологічними мишачими генами зародкової лінії. За допомогою бази даних IMGT мишачий зародковий D-ген IGHD1-1*01 ідентифікували як гомологічну послідовність. Для відбору придатних людських генів зародкової лінії для пересадження CDR ідентифікували людські гени зародкової лінії, які мають найбільшу гомологію з послідовністю мишачого 1613F12 VH. Використовуючи базу даних та опції для аналізу IMGT, як людську акцепторну послідовність для мишачих CDR 1613F12 VH вибрали людський ген зародкової лінії IGHV1-2*02 та людський зародковий J-ген IGHJ5*01. Для гуманізації варіабельного домену важкого ланцюга усі залишки, що розрізняються між

людською та мишачою послідовностями, були ранжовані за значущістю. Ці порядкові номери (1-4) використовували для створення 20 різних гуманізованих варіантів варіабельної ділянки важкого ланцюга, які мають до 18 зворотних мутацій.

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CD (
1613F12	EVHLQQSGA.ELVKPGASVKLSCTAS	GFNI....RDY	IHWVKQAPGQGLEWIGR	LD
Homsap IGHV1-2*02	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GYTF....TGYY	MHWVRQAPGQGLEWMGW	IN
Priority	E H Q 3 2 3	L T 3 3	I K R E I R 1 3 4 4 3 2	
h21613F12 {VH1}	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	MHWVRQAPGQGLEWMGW	LD
h21613F12 {VH1M39I}	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	IHWVRQAPGQGLEWMGW	LD
h21613F12 {VH1W55RN66K}	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	MHWVRQAPGQGLEWMGR	LD
h21613F12 {VH1I84S}	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	MHWVRQAPGQGLEWMGW	LD
h21613F12 {VH1S85N}	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	MHWVRQAPGQGLEWMGW	LD
h21613F12 {VH1I84NS85N}	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	MHWVRQAPGQGLEWMGW	LD
h21613F12 {VH2.1}	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	IHWVRQAPGQGLEWMGW	LD
h21613F12 {VH2.1Q3H}	QVHLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	IHWVRQAPGQGLEWMGW	LD
h21613F12 {VH2.1W55R}	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	IHWVRQAPGQGLEWMGR	LD
h21613F12 {VH2.1N66K}	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	IHWVRQAPGQGLEWMGW	LD
h21613F12 {VH2.1W55RN66K}	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	IHWVRQAPGQGLEWMGR	LD
h21613F12 {VH2.1R80S}	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	IHWVRQAPGQGLEWMGR	LD
h21613F12 {VH2.1N66KR80S}	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	IHWVRQAPGQGLEWMGW	LD
h21613F12 {VH2.2}	QVHLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	IHWVRQAPGQGLEWMGW	LD
h21613F12 {VH2.2M89L}	QVHLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS	GFNI....RDY	IHWVRQAPGQGLEWMGW	LD
h21613F12 {VH2.3}	QVQLQQSGA.EVKKPGASVKLSCTAS	GFNI....RDY	IHWVRQAPGQGLEWMGW	LD
h21613F12 {VH2.3W55R}	QVQLQQSGA.EVKKPGASVKLSCTAS	GFNI....RDY	IHWVRQAPGQGLEWMGR	LD
h21613F12 {VH2.3Q3HW55R}	QVHLQQSGA.EVKKPGASVKLSCTAS	GFNI....RDY	IHWVRQAPGQGLEWMGR	LD
h21613F12 {VH2.4}	QVQLQQSGA.EVKKPGASVKLSCTAS	GFNI....RDY	IHWVRQAPGQGLEWIGR	LD
h21613F12 {VH3}	EVHLQQSGA.ELVKPGASVKLSCTAS	GFNI....RDY	IHWVKQAPGQGLEWIGR	LD
	R2-IMGT (56-65)	FR3-IMGT (66-104)		
1613F12	PA..NGHT KYGPNFQ.GRATMTSDTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYC			
Homsap IGHV1-2*02	PN..SGGT NYAQKFQ.GRVMTTRDTSISTAYMELSRSLSDDTAVYYC			
Priority	K GPN 2 344	A S SN LQ S T E 4 2 11 33 4 4 4		
h21613F12 {VH1}	PA..NGHT NYAQKFQ.GRVMTTRDTSISTAYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH1M39I}	PA..NGHT NYAQKFQ.GRVMTTRDTSISTAYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH1W55RN66K}	PA..NGHT KYAQKFQ.GRVMTTRDTSISTAYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH1I84S}	PA..NGHT NYAQKFQ.GRVMTTRDTS SS TAYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH1S85N}	PA..NGHT NYAQKFQ.GRVMTTRDTS INT AYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH1I84NS85N}	PA..NGHT NYAQKFQ.GRVMTTRDTS SNT AYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH2.1}	PA..NGHT NYAQKFQ.GRVMTTRDTS SNT AYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH2.1Q3H}	PA..NGHT NYAQKFQ.GRVMTTRDTS SNT AYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH2.1W55R}	PA..NGHT NYAQKFQ.GRVMTTRDTS SNT AYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH2.1N66K}	PA..NGHT KYAQKFQ.GRVMTTRDTS SNTAYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH2.1W55RN66K}	PA..NGHT KYAQKFQ.GRVMTTRDTS SNTAYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH2.1R80S}	PA..NGHT NYAQKFQ.GRVMT SDTS SNTAYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH2.1N66KR80S}	PA..NGHT KYAQKFQ.GRVMTSDTS SNTAYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH2.2}	PA..NGHT KYAQKFQ.GRVMTSDTS SNTAYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH2.2M89L}	PA..NGHT KYAQKFQ.GRVMTSDTS SNTAY L ELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH2.3}	PA..NGHT KYAQKFQ.GRVMTSDTS SNTAYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH2.3W55R}	PA..NGHT KYAQKFQ.GRVMTSDTS SNTAYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH2.3Q3HW55R}	PA..NGHT KYAQKFQ.GRVMTSDTS SNTAYMELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH2.4}	PA..NGHT KYAQKFQ.GRVMTSDTS SNTAY L ELSRSLSDDTAVYYC			
h21613F12 {VH3}	PA..NGHT KYGQKFQ.GRVMTSDTS SNTAY L QLSRSLSDDTAVYYC			
	CDR3-IMGT	FR4-IMGT		
1613F12VH	ARGAYYYGSSGLFYFDY	WGQGTTLVSVSS		
Homsap IGHJ5*01		WGQGTTLVTVSS		
Priority		TLS 444		

hz1613F12 (VH1)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH1M39I)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH1W55RN66K)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH1I84E)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH1S85N)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH1I84NS85N)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH2.1)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH2.1Q3H)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH2.1W55R)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH2.1N66K)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH2.1W55RN66K)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH2.1R80S)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH2.1N66KR80S)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH2.2)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH2.2 M89L)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH2.3)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH2.3W55R)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH2.3Q3HW55R)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH2.4)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS
hz1613F12 (VH3)	ARGAYYYGSSGLFYFDY WGQGTlVTVSS

13.2. Валідація hz1613F12 у порівнянні з m1613F12

Для порівняння гуманізованого 1613F12 з мишачою формою 1613F12 досліджували зв'язування методом ІФА з використанням білка rhAxl-Fc, а також за допомогою FACS-аналізу з використанням клітин SN12C. Додатково досліджували прямий цитотоксичний ефект *in vitro* з використанням пухлинних клітин нирки людини SN12C та лінії клітин карциноми легені людини Calu-1.

Спочатку здійснювали імуноферментний аналіз. Для експерименту в 96-лункові планшети (Immulon II, Thermo Fisher) вносили розчин 1613F12 в 1× ФСБ з концентрацією 5 мкг/мл та інкубували протягом ночі при 4 °C. Після етапу блокування в покриті планшети вносили білок rhAxl-Fc (R and D Systems, ref: 154-AL) в діапазоні концентрацій від 5 мкг/мл до 0,02 мкг/мл та інкубували протягом 1 год. при 37 °C. Для детекції додавали біотинізоване антитіло, спрямоване проти Axl (приготовлене в лабораторії), в концентрації 0,85 мкг/мл на 1 год. при 37 °C. Це антитіло до Axl розпізнає інші антигенні детермінанти. Потім в лунки додавали розчин пероксидази хрому, кон'югованої з авідіном, в розведенні 1/2000 в буфері для розведення. Потім додавали розчин субстрату ТМВ на 5 хв. Після додавання розчину для зупинення пероксидази, вимірювали оптичну густину при 405 нм за допомогою планшетного спектрофотометра.

На Фіг. 12 показано, що як мишаче, так і гуманізоване антитіла 1613F12 однаково зв'язуються з білком rhAxl-Fc.

Для FACS-аналізу клітини SN12C культивували в середовищі RPMI 1640 з додаванням 2 мМ L-глутаміну та 10 % сироватки. Клітини трипсинізували та доводили концентрацію клітин до 1×10^6 клітин/мл в буфері FACS. Клітинну суспензію в об'ємі 100 мкл інкубували зі зростаючими концентраціями ізотипового контролю або антитіл, спрямованих проти Axl, протягом 20 хв. при 4 °C. Потім клітини відмивали три рази буфером FACS та інкубували протягом 20 хв. або з вторинним антитілом, що розпізнає IgG миши, міченим Alexa488, або з вторинним антитілом, що розпізнає IgG людини, міченим Alexa488, при 4 °C в темряві. Клітини відмивали три рази буфером FACS та ресуспендували в 100 мкл буферу FACS перед додаванням пропідію йодиду.

Клітини інкубували зі зростаючими концентраціями ізотипового контролю або антитіл до Axl. m1613F12 відповідає мишачому 1613F12, c1613F12 відповідає химерному 1613F12, а hz1613F12 відповідає гуманізованому антитілу. Значення EC_{50} визначали з використанням програми Prism.

Як показано на Фіг. 13, зв'язування гуманізованої форми 1613F12 з клітинами SN12C характеризувалося значеннями EC_{50} , еквівалентними для химерної та мишачої форм 1613F12. Ці результати вказували, що hz1613F12 за здатністю розпізнавати та зв'язувати антиген Axl є порівнянним з мишачим 1613F12.

Експерименти з оцінки прямого цитотоксичного ефекту *in vitro* були описані раніше в Прикладі 12. В даному Прикладі готували чотири імунокон'югати із сапорином: m9G4-сапорин, ch9G4-сапорин, 1613F12-сапорин та hz1613F12-сапорин, та досліджували на двох клітинних моделях (пухлинні клітини нирки людини SN12C та клітини карциноми легені людини Calu-1).

На Фіг. 14 показано, що ізотипові контролю для антитіл m9G4-сапорин та ch9G4-сапорин були неактивними, а гуманізоване антитіло 1613F12-сапорин, спрямоване проти Axl, викликало схожий цитотоксичний ефект по відношенню до клітин SN12C, що й імунокон'югат мишачого антитіла 1613F12 із сапорином.

На Фіг. 15 показано, що імунокон'югат гуманізованого антитіла 1613F12 з сапорином

викликає схожий цитотоксичний ефект по відношенню до клітин Calu-1, що й імунокон'югат мишачого антитіла 1613F12 із сапорином. Навпаки, ізотипові контролю m9G4-сапорин та ch9G4-сапорин виявляли слабку активність (~10 % макс. цитотоксичного ефекту) при концентраціях антитіла вище 10^{-9} М.

5 Приклад 14. Кінетика зв'язування 1613F12 з позаклітинним доменом людського Axl

Потім визначали афінність 1613F12 за допомогою інструмента Biacore. Для визначення кінетики зв'язування 1613F12 з позаклітинним доменом людського Axl використовували Biacore X.

10 Інструмент, принцип роботи якого оснований на оптичному феномені поверхневого плазмонного резонанса (SPR), який випускається компанією Biacore Systems, дозволяє детектувати та оцінювати взаємодії білок-білок в реальному часі, без використання міток.

Стисло, для проведення експериментів як біосенсор використовували чип CM5. В протокових комірках 1 та 2 чипа CM5 іммобілізували IgG кроля (FC 1 та FC2) до рівня 9300-10000 одиниць RU (від англ. response units, одиниць відповіді), приєднуючи антитіла через аміногрупи.

15 Зв'язування оцінювали в декількох циклах. В кожному циклі вимірювання проводили при швидкості потоку 30 мкл/хв в буфері HBS-EP. Потім на поверхні чипа іммобілізували досліджуване антитіло, спрямоване проти Axl, протягом 1 хв. тільки в протоковій комірці FC2 до досягнення середнього рівня іммобілізації 1613F12, що становить 311,8 RU (SD=5,1 RU). Ін'єкції аналіта (антиген Axl ECD) починали з концентрації 200 нМ та виконували двократні послідовні розведення для визначення приблизних значень k_a та k_d в реальному часі.

20 Наприкінці кожного циклу поверхні регенерували, пропускаючи 10 мМ розчин гідрохлориду гліцину з рН 1,5 для видалення комплексів антитіло-антиген, а також захоплювального антитіла. Спостережуваний сигнал відповідає різниці між сигналами, одержаними в комірках FC1 та FC2 (FC2-FC1). Константи швидкості асоціації (k_a) та дисоціації (k_d) розраховували з використанням моделі зв'язування один-до-одного Ленгмюра. Рівноважну константу дисоціації (KD) визначали як співвідношення k_a/k_d . Експериментальні значення аналізували в програмі Biaevaluation версії 3.0. Відповідність моделі експериментальним даним оцінювали за допомогою критерію χ^2 .

30 Результати представлені нижче в Таблиці 8.

Таблица 8

Антитіло	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	χ^2
1613F12	$1,06 \times 10^5$	$2,42 \times 10^{-4}$	$2,29 \times 10^{-9}$	0,71 (0,6 %)

35 Для одержання позаклітинного домену (ECD) людського Axl спочатку клонували кДНК людини, що кодує розчинний людський рецептор AXL, в експресуючий вектор pCER4 методом ПЛР. Очищений продукт потім піддавали розщепленню рестрикційними ферментами HindIII та BamHI та лігували в експресуючий вектор pCER4, який розрізали тими самими ферментами. Зрештою, одержання рекомбінантної плазміді pCER[AXL]His6 підтверджували за допомогою секвенування ДНК.

40 Потім клітини HEK293E, адаптовані для росту в суспензії, культивували в середовищі Ex-cell 293 (SAFC Biosciences) з додаванням 4 мМ глютаміну. Усі трансфекції здійснювали з використанням лінійного поліетиленіміну (PEI) 25 кДа. Трансфековані клітини підтримували при 37 °С в шейкер-інкубаторі з вмістом 5 % CO₂ в атмосфері при перемішуванні зі швидкістю 120 об/хв протягом 6 днів. Клітини збирали шляхом центрифугування і супернатант, який містить рекомбінантний білок з гістидиновою міткою, підготовлювали для очистки на колонці з агарозою, модифікованою нікель-нітрилотриацетатом (Ni-NTA-агарозою).

45

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> П'ЄР ФАБР МЕДИКАМЕНТ

<120> АНТИГЕН-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНИЙ БІЛОК ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ ЯК ПРОДУКТУ ДЛЯ АДРЕСНОЇ ДОСТАВКИ ПРИ ЛІКУВАННІ РАКУ

<130> 361629D30354

<140> PCT/EP2012/071833

<141> 2012/11/05

<150> EP 11306416.6

<151> 2011-11-03

<160> 99

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг CDR-L1 антитіла 1613F12 (нумерація IMGT)

<400> 1

Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
1 5

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг CDR-L2 антитіла 1613F12 (нумерація IMGT)

<400> 2

Ser Gly Ser
1

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг CDR-L3 антитіла 1613F12 (нумерація IMGT)

<400> 3

Gln Gln His His Glu Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> штучна

<220>
 <223> Важкий ланцюг CDR-H1 антитіла 1613F12 (нумерація IMGT)

<400> 4

Gly Phe Asn Ile Arg Asp Thr Tyr
 1 5

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> штучна

<220>
 <223> Важкий ланцюг CDR-H2 антитіла 1613F12 (нумерація IMGT)

<400> 5

Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> штучна

<220>
 <223> Важкий ланцюг CDR-H3 антитіла 1613F12 (нумерація IMGT)

<400> 6

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> штучна

<220>
 <223> Варіабельний домен легкого ланцюга Mu

<400> 7

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

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln His His Glu Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Glu Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 8
<211> 124
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Mu

<400> 8

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

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

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

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Gly Pro Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Легкий ланцюг CDR-L1 антитіла 1613F12 (нумерація Кабат)

<400> 9

Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Легкий ланцюг CDR-L2 антитіла 1613F12 (нумерація Кабат)

<400> 10

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Легкий ланцюг CDR-L3 антитіла 1613F12 (нумерація Кабат)

<400> 11

Gln Gln His His Glu Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Важкий ланцюг CDR-H1 антитіла 1613F12 (нумерація Кабат)

<400> 12

Arg Asp Thr Tyr Ile His
1 5

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> штучна

<220>
 <223> Важкий ланцюг CDR-H2 антитіла 1613F12 (нумерація Кабат)

<400> 13

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

Gly

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> штучна

<220>
 <223> Важкий ланцюг CDR-H3 антитіла 1613F12 (нумерація Кабат)

<400> 14

Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> штучна

<220>
 <223> Легкий ланцюг CDR-L1 антитіла 1613F12 (нумерація IMGT)

<400> 15
 aagagcatta gcaaatat
 18

<210> 16
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> штучна

<220>
 <223> Легкий ланцюг CDR-L2 антитіла 1613F12 (нумерація IMGT)

<400> 16
 tctggatcc
 9

<210> 17
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> штучна

<220>
 <223> Легкий ланцюг CDR-L3 антитіла 1613F12 (нумерація IMGT)

<400> 17
 саасаgсatс atgaataccс gctcacg
 27

<210> 18
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> штучна

<220>
 <223> Важкий ланцюг CDR-H1 антитіла 1613F12 (нумерація IMGT)

<400> 18
 ggcttcaаса ttagagacac ctat
 24

<210> 19
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> штучна

<220>
 <223> Важкий ланцюг CDR-H2 антитіла 1613F12 (нумерація IMGT)

<400> 19
 cttgatcctg cgaatggтса tact
 24

<210> 20
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> штучна

<220>
 <223> Важкий ланцюг CDR-H3 антитіла 1613F12 (нумерація IMGT)

<400> 20
 gctagagggg cctattacta cggtagtagt ggtctcttct actttgacta c
 51

<210> 21
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> штучна

<220>
 <223> Варіабельний домен легкого ланцюга Mu

<400> 21
 gatgtccaga taacccagtc tccatcttat ctgtctacat ctctggaga aaccattact
 60
 attaattgca gggcaagtaa gagcattagc aaatatttag cctggatatca agaaaaacct
 120
 gggaaaacta ataagcttct tatctactct ggatccactt tgcaatctgg agttccatca
 180
 aggttcagtg gcagtggatc tggtagagat ttactctca ccatcagtag cctggagcct
 240
 gaagattttg caatgtattt ctgtcaacag catcatgaat acccgctcac gttcgggtgt
 300
 gggaccgagc tggagctgaa a
 321

<210> 22
 <211> 372
 <212> ДНК
 <213> штучна
 <220>
 <223> Варіабельний домен важкого ланцюга Mu

<400> 22
 gaggttcacc tgcagcagtc tggggcagag ctgtgaagc caggggcctc agtcaagttg
 60
 tctgcacag ctcttggtt caacattaga gacacctata tccattgggt gaaacagagg
 120
 cctgaacagg gcttgagtg gattggaagg ctgtatctg cgaatgggtca tactaaatat
 180
 ggcccgaact tccagggcag ggccactatg acatcagaca catcctccaa cagggcctac
 240
 ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tagagggggc
 300
 tattactacg gtagtagtgg tctcttctac ttgactact ggggccaagg caccactctc
 360
 tcagtctcct ca
 372

<210> 23
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> штучна
 <220>
 <223> Легкий ланцюг CDR-L1 антитіла 1613F12 (нумерація Кабат)
 <400> 23

agggcaagta agagcattag caaatattta gcc
33

<210> 24
<211> 21
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Легкий ланцюг CDR-L2 антитіла 1613F12 (нумерація Кабат)

<400> 24
tctggatcca ctttgcaatc t
21

<210> 25
<211> 27
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Легкий ланцюг CDR-L3 антитіла 1613F12 (нумерація Кабат)

<400> 25
caacagcatc atgaataccc gctcacg
27

<210> 26
<211> 18
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Важкий ланцюг CDR-H1 антитіла 1613F12 (нумерація Кабат)

<400> 26
agagacacst atatccat
18

<210> 27
<211> 51
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Важкий ланцюг CDR-H2 антитіла 1613F12 (нумерація Кабат)

<400> 27
aggcttgatc ctgcgaatgg tcatactaaa tatggcccgga acttccaggg c
51

<210> 28
<211> 45
<212> ДНК
<213> штучна

<220>

<223> Важкий ланцюг CDR-H3 антитіла 1613F12 (нумерація Кабат)

<400> 28

ggggcctatt actacggtag tagtgggtctc ttctactttg actac
45

<210> 29

<211> 894

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Білок Axl (з пептидним сигналом)

<400> 29

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
50 55 60

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
65 70 75 80

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
85 90 95

Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
130 135 140

Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys
145 150 155 160

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp
165 170 175

Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu
180 185 190

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

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
210 215 220

Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
225 230 235 240

Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
245 250 255

His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asn Asp Gly Met Gly Ile Gln
260 265 270

Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser
275 280 285

Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro
290 295 300

Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp
305 310 315 320

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
325 330 335

Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
340 345 350

Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
355 360 365

Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
370 375 380

Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
385 390 395 400

Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
 405 410 415

Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
 420 425 430

Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
 435 440 445

Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val
 450 455 460

Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg
 465 470 475 480

Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val
 485 490 495

Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr
 500 505 510

Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp
 515 520 525

Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu
 530 535 540

Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser
 545 550 555 560

Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg
 565 570 575

Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe
 580 585 590

Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser
 595 600 605

Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys
 610 615 620

His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln
 625 630 635 640

Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile
645 650 655

Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp
660 665 670

Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val
675 680 685

Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg
690 695 700

Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser
705 710 715 720

Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
725 730 735

Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly
740 745 750

Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu
755 760 765

Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg
770 775 780

Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
785 790 795 800

Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
805 810 815

Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
820 825 830

Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
835 840 845

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
865 870 875 880

Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
885 890

<210> 30
<211> 869
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Білок Axl (без пептидного сигналу)

<400> 30

Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro
1 5 10 15

Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln
20 25 30 .

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

Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly
50 55 60

Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr
65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu
85 90 95

Gly His Gln Thr Phe Val Ser Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly
100 105 110

Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn
115 120 125

Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val
130 135 140

Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly
145 150 155 160

His Gly Pro Gln Arg Ser Leu His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser
165 170 175

Ser Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg
180 185 190

Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu
195 200 205

Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu
210 215 220

Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser
225 230 235 240

Asn Asp Gly Met Gly Ile Gln Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu
245 250 255

Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly
260 265 270

Ser Leu His Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser
275 280 285

Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro
290 295 300

Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn
305 310 315 320

Gly Ser Gln Ala Phe Val His Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln
325 330 335

Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro
340 345 350

Glu Val Leu Met Asp Ile Gly Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu
355 360 365

Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr
370 375 380

Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala
385 390 395 400

Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro
405 410 415

Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala
420 425 430

Val Val Ala Ala Ala Cys Val Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His
435 440 445

Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val
450 455 460

Glu Arg Gly Glu Leu Val Val Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser
465 470 475 480

Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu
485 490 495

Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala
500 505 510

Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly
515 520 525

Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met
530 535 540

Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu
545 550 555 560

Ala Val Cys Met Lys Glu Phe Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile
565 570 575

Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val
580 585 590

Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu
595 600 605

Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu
610 615 620

Val Lys Phe Met Ala Asp Ile Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr
625 630 635 640

Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn
645 650 655

Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile
 660 665 670
 Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val
 675 680 685
 Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys
 690 695 700
 Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg
 705 710 715 720
 Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr
 725 730 735
 Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly
 740 745 750
 Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg
 755 760 765
 Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala
 770 775 780
 Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp
 785 790 795 800
 Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp
 805 810 815
 Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala
 820 825 830
 Ala Glu Val His Pro Ala Gly Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr
 835 840 845
 Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly
 850 855 860
 Gln Glu Asp Gly Ala
 865

<210> 31
 <211> 451
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Позаклітинний домен білка Axl (з пептидним сигналом)

<400> 31

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
50 55 60

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
65 70 75 80

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
85 90 95

Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
130 135 140

Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys
145 150 155 160

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp
165 170 175

Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu
180 185 190

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

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
 210 215 220
 Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
 225 230 235 240
 Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
 245 250 255
 His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asn Asp Gly Met Gly Ile Gln
 260 265 270
 Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser
 275 280 285
 Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro
 290 295 300
 Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp
 305 310 315 320
 Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
 325 330 335
 Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
 340 345 350
 Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
 355 360 365
 Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
 370 375 380
 Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
 385 390 395 400
 Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
 405 410 415
 Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
 420 425 430
 Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
 435 440 445

Pro Trp Trp
450

<210> 32
<211> 426
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Позаклітинний домен білка Axl (без пептидного сигналу)

<400> 32

Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro
1 5 10 15

Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln
20 25 30

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

Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly
50 55 60

Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr
65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu
85 90 95

Gly His Gln Thr Phe Val Ser Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly
100 105 110

Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn
115 120 125

Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val
130 135 140

Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly
145 150 155 160

His Gly Pro Gln Arg Ser Leu His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser
165 170 175

Ser Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg
180 185 190

Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu
195 200 205

Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu
210 215 220

Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser
225 230 235 240

Asn Asp Gly Met Gly Ile Gln Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu
245 250 255

Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly
260 265 270

Ser Leu His Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser
275 280 285

Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro
290 295 300

Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn
305 310 315 320

Gly Ser Gln Ala Phe Val His Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln
325 330 335

Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro
340 345 350

Glu Val Leu Met Asp Ile Gly Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu
355 360 365

Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr
370 375 380

Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala
385 390 395 400

Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro
405 410 415

Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp
420 425

<210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Тетрапептид

<400> 33

Gly Phe Leu Gly
1

<210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Тетрапептид

<400> 34

Ala Leu Ala Leu
1

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Пентапептид

<400> 35

Pro Val Gly Val Val
1 5

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен легкого ланцюга H₂

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> X може заміщати I або V

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> X може заміщати M або I

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> X може заміщати S або Y

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> X може заміщати S або A

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> X може заміщати R або T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> X може заміщати V або I

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> X може заміщати T або N

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> X може заміщати Q або E

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> X може заміщати V або T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (44)..(44)
 <223> X може заміщати P або N

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (87)..(87)
 <223> X може заміщати Y або F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (100)..(100)
 <223> X може заміщати G або A

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (103)..(103)
 <223> X може заміщати K або E

<220>

<221> misc_feature

<222> (104)..(104)

<223> X може заміщати V або L

<400> 36

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

Asp Xaa Xaa Thr Ile Xaa Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Xaa Cys Gln Gln His His Glu Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys
100 105

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен легкого ланцюга Hz

<400> 37

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 Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 38
<211> 107
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Вариабельный домен легкого ланцюга H2

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

<210> 39
<211> 107
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Вариабельный домен легкого ланцюга H2

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен легкого ланцюга Hz

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен легкого ланцюга H₂

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен легкого ланцюга H₂

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен легкого ланцюга H₂

<400> 43

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln His His Glu Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 44
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен легкого ланцюга H2

<400> 44

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln His His Glu Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 45
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен легкого ланцюга H2

<400> 45

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln His His Glu Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен легкого ланцюга Hz

<400> 46

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln His His Glu Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен легкого ланцюга Hz

<400> 47

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

Asp Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln His His Glu Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 48

<211> 124

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Важкий ланцюг Hz варіабельний домен

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> X може заміщати Q або E

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> X може заміщати Q або H

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> X може заміщати V або Q

<220>

<221> misc_feature


```

<222> (11)..(11)
<223> X може заміщати V або L

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> X може заміщати K або V

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> X може заміщати V або L

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> X може заміщати K або T

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> X може заміщати M або I

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(38)
<223> X може заміщати R або K

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)..(48)
<223> X може заміщати M або I

<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(50)
<223> X може заміщати W або R

<220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(59)
<223> X може заміщати N або K

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> X може заміщати A або G

<220>
<221> misc_feature
<222> (72)..(72)
<223> X може заміщати R або S

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(76)
<223> X може заміщати I або S

<220>
<221> misc_feature

```

<222> (77)..(77)

<223> X може заміщати S або N

<220>

<221> misc_feature

<222> (81)..(81)

<223> X може заміщати M або L

<220>

<221> misc_feature

<222> (82)..(82)

<223> X може заміщати E або Q

<400> 48

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

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

Tyr Xaa His Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Xaa
35 40 45

Gly Xaa Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Xaa Tyr Xaa Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Xaa Asp Thr Ser Xaa Xaa Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Xaa Xaa Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 49

<211> 124

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 49

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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 50
<211> 124
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 50

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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 51
<211> 124
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 51

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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 52
<211> 124
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 52

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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 53

<211> 124

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 53

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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 54
<211> 124
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 54

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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 55

<211> 124
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 55

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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 56
<211> 124
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 56

Gln Val His 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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 57
<211> 124
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 57

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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 58
<211> 124
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 58

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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 59
<211> 124
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 59

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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 60
<211> 124
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

85

90

95

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 61

<211> 124

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 61

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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 62

<211> 124

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 62

Gln Val His 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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 63

<211> 124

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 63

Gln Val His 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 Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 64

<211> 124

<212> PRT

<213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 64

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

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

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

Gly Trp Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 65

<211> 124
 <212> PRT
 <213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 65

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

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

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

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
 100 105 110

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

<210> 66
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 66

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

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

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

35 40 45

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 67
<211> 124
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 67

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

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

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

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 68
<211> 124
<212> PRT
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 68

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

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

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

Gly Arg Leu Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Gly Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 69
<211> 321
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен легкого ланцюга H₂

<400> 69
gatattcaaaa tgacacagtc tccaagctcc ctttctgcat cagtgggcga tagagtaacc
60

atcacttgcc gcgccagcaa aagcatctcc aaatacctcg cttggtacca gcagaagcca
120

ggcaaggtcc ctaaactgct catttattcc ggcagtaccc tgcagtctgg ggtgccttct
180

cggttcagtg gaagtggctc cggtaccgac ttaccctga ctataagctc actccagccc
240

gaggacgtcg ctacatatta ctgtcagcag caccatgaat atcctctgac attcgggtgga
300

ggaaccaagg tggagatcaa g
321

<210> 70
<211> 321
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен легкого ланцюга H₂

<400> 70
gacgttcaaa tgacacagtc ccctagttcc ctctctgctt ccgtgggcca taggggtgaca
60

attacttgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg cttggtacca gcagaaacca
120

ggcaaagtgc ccaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct
180

cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttactctga ctatcagctc tctgcagcca
240

gaggatgtcg ccacctacta ttgccagcag caccatgagt atcccctcac ctttggaggt
300

ggcaccsaaag tggaatcaa g
321

<210> 71
<211> 321
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен легкого ланцюга H₂

<400> 71
gacatssaaa tcacacagtc ccctagttcc ctctctgctt ccgtgggcca taggggtgaca
60

attacttgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg cttggtacca gcagaaacca
120

ggcaaagtgc ccaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct
180

cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttactctga ctatcagctc tctgcagcca
240

gaggatgtcg ccacctacta ttgccagcag caccatgagt atcccctcac ctttgagggt
300

ggcaccaaaag tggaaatcaa g
321

<210> 72
<211> 321
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен легкого ланцюга H₂

<400> 72
gacgtgcaaa tcacacagtc ccctagttcc ctctctgctt ccgtgggcga tagggtgaca
60

attacttgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg cttggtacca gcagaaacca
120

ggcaaagtgc ccaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct
180

cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttactctga ctatcagctc tctgcagcca
240

gaggatgtcg ccacctacta ttgccagcag caccatgagt atcccctcac ctttgagggt
300

ggcaccaaaag tggaaatcaa g
321

<210> 73
<211> 321
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен легкого ланцюга H₂

<400> 73
gacgtgcaaa tcacacagtc ccctagttcc ctctctgctt ccgtgggcga tagggtgaca
60

attacttgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg cttggtacca gcagaaacca
120

ggcaaaacc ccaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct
180

cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttcactctga ctatcagctc tctgcagcca
240

gaggatgtcg ccacctaata ttgccagcag caccatgagt atccccctcac ctttggaggt
300

ggcaccaaaag tggaaatcaa g
321

<210> 74
<211> 321
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен легкого ланцюга Hz

<400> 74
gacgtgcaaa tcacacagtc ccctagttcc ctctctgctt ccgtgggcga tagggtgaca
60

attacttgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg cttggtacca gcagaaacca
120

ggcaaagtga acaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct
180

cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttcactctga ctatcagctc tctgcagcca
240

gaggatgtcg ccacctaata ttgccagcag caccatgagt atccccctcac ctttggaggt
300

ggcaccaaaag tggaaatcaa g
321

<210> 75
<211> 321
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен легкого ланцюга Hz

<400> 75
gatgtgcaaa ttacacagtc tccaagctcc ctttctgcat cagtgggcga tagagtaacc
60

atcaactgcc gcgccagcaa aagcatctcc aaatacctcg cttggtacca gcagaagcca
120

ggcaaggctc ctaaaactgct catttattcc ggcagtaccc tgcagtctgg ggtgccttct
180

cggttcagtg gaagtggctc cggtagcgac ttaccctga ctataagctc actccagccc
240

gaggacgtcg ctacatatTT ttgtcagcag caccatgaat atcctctgac attcgggtgga
300

ggaaccaagg tggagatcaa g
321

<210> 76
<211> 321
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен легкого ланцюга Hz

<400> 76
gacgtgcaaa tcacacagtc ccctagttcc ctctctgctt ccgtgggcga tagggtgaca
60

attaactgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg ctgggtacca gcagaaacca
120

ggcaaaaccc ccaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct
180

cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttcactctga ctatcagctc tctgcagcca
240

gaggatgtcg ccacctactt ctgccagcag caccatgagt accccctcac ctttggaggt
300

ggcassaaag tggaaatcaa g
321

<210> 77
<211> 321
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен легкого ланцюга Hz

<400> 77
gacgtgcaaa tcacacagtc ccctagttcc ctctctgctt ccgtgggcga tagggtgaca
60

attaactgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg ctgggtacca gcagaaacca
120

ggcaaaagtga acaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct
180

cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttcactctga ctatcagctc tctgcagcca
240

gaggatgtcg ccacctactt ctgccagcag caccatgagt accccctcac ctttggaggt
300

ggcaccsaaag tggaaatcaa g
321

<210> 78
<211> 321
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен легкого ланцюга H₂

<400> 78
gacgtgcaaa tcacacagtc ccctagttcc ctctctgctt ccgtgggcga tagggtgaca
60

attaactgca gagccagtaa gtcaatttca aagtatcttg cttggtacca ggagaaacca
120

ggcaaaacca acaagctgct tatctacagt ggtagcacac ttcaatctgg agtcccttct
180

cgattcagcg gaagcggctc cgggaccgac ttcactctga ctatcagctc tctgcagcca
240

gaggatgtcg ccacctactt ctgccagcag caccatgagt accccctcac ctttggaggt
300

ggcaccsaaag tggaaatcaa g
321

<210> 79
<211> 321
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен легкого ланцюга H₂

<400> 79
gacgtccaga tcacacagtc tccttcctat ctggccgcct ctgtgggcga taccattacc
60

ataaactgca gggcttcaaa gagcatcagc aagtacctgg catggtatca ggagaagccc
120

gggaaaacca ataagctcct gatctactcc ggctctactt tgcagtccgg agtgcccage
180

cggttttcag gcagtggtag tggaactgac ttactctga ccattagctc tctgcaaccc
240

gaagacgtag ctacatactt ctgtcagcag caccatgaat atccactgac cttcgggtgcc
300

gggacagagc tgagatcaa a
321

<210> 80
 <211> 372
 <212> ДНК
 <213> штучна

<220>
 <223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 80
 cagggtgcagc tgggtgcagag tgggtgctgag gtgaaaaagc ccggagcctc tgtcaaagtc
 60
 tcttgtaagg catccggggt taacatccgg gacacataca tgcactgggt taggcaggct
 120
 ccaggccagg gtctggaatg gatgggatgg cttgaccctg ctaacggcca cactaattac
 180
 gcccaaaagt ttcaggggcg cgtaaccatg accagagata ctagcatatc cactgcatac
 240
 atggagctga gccgactccg tagcgacgat accgccgtgt attattgcgc aaggggagcc
 300
 tattactacg gcagtagcgg actcttctac ttcgactatt gggggcaagg caccctggtc
 360
 acagtttcat ca
 372

<210> 81
 <211> 372
 <212> ДНК
 <213> штучна

<220>
 <223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 81
 caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagggtg
 60
 tcctgcaaag ccagcggggt caacatacgg gatacctaca ttcactgggt gaggcaagcc
 120
 cctggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaattac
 180
 gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaatctc cactgcatac
 240
 atggagcttt ctcgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
 300
 tactattatg gatcttccgg cctgttctac tttgactact gggggcaggg aaccttggtc
 360
 acagtgaagt ca
 372

<210> 82
 <211> 372
 <212> ДНК
 <213> штучна

<220>
 <223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 82
 cagggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagggtg
 60
 tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gatacctaca tgcactgggt gaggcaagcc
 120
 cctgggtcaag gactggaatg gatgggcagg ctggaccag caaacggcca cacaaaatac
 180
 gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaatctc cactgcatac
 240
 atggagcttt ctgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
 300
 tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc
 360
 acagtgagct ca
 372

<210> 83
 <211> 372
 <212> ДНК
 <213> штучна

<220>
 <223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 83
 cagggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagggtg
 60
 tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gatacctaca tgcactgggt gaggcaagcc
 120
 cctgggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaattac
 180
 gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaagctc cactgcatac
 240
 atggagcttt ctgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
 300
 tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc
 360

acagtgaact ca
372

<210> 84
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 84
caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaaggta
60

tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gatacctaca tgcactgggt gaggcaagcc
120

cctggtaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaattac
180

gtcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaatcaa cactgcatac
240

atggagcttt ctgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
300

tactattatg gatcttcgg cctgtttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc
360

acagtgaact ca
372

<210> 85
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 85
caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaaggta
60

tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gatacctaca tgcactgggt gaggcaagcc
120

cctggtaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaattac
180

gtcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaagcaa cactgcatac
240

atggagcttt ctgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
300

tactattatg gatcttccgg cctgttctac tttgactact gggggcaggg aaccttggtc
360

acagtgaagt ca
372

<210> 86
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 86
caggtgcagc tgggtgcagag tgggtgctgag gtgaaaaagc ccggagcctc tgtcaaagtc
60

tcttgtaagg catccgggtt taacatccgg gacacataca tacactgggt taggcaggct
120

ccaggccagg gtctggaatg gatgggatgg ctgaccctg ctaacggcca cactaattac
180

gccccaaagt ttcagggggc cgtaaccatg accagagata ctagctcaa tactgcatac
240

atggagctga gccgactccg tagcgacgat accgccgtgt attattgcgc aaggggagcc
300

tattactacg gcagtagcgg actcttctac ttcgactatt gggggcaagg caccctggtc
360

acagtttcat ca
372

<210> 87
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 87
caggttcacc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagggtg
60

tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttcactgggt gaggcaagcc
120

cctggtaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaattac
180

gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaagcaa cactgcatac
240

atggagcttt ctcgcttgag gagtcatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
300

tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc
360

acagtgaagt ca
372

<210> 88
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 88
caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagggtg
60

tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttactgggtt gaggcaagcc
120

cctgggtcaag gactggaatg gatgggcagg ctggacccag caaacggcca cacaaattac
180

gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaagcaa cactgcatac
240

atggagcttt ctcgcttgag gagtcatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
300

tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc
360

acagtgaagt ca
372

<210> 89
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 89
caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagggtg
60

tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttactgggtt gaggcaagcc
120

cctgggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggacccag caaacggcca cacaaagtac
180

gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaagcaa cactgcatac
240

atggagcttt ctcgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
300

tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc
360

acagtgagct ca
372

<210> 90
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 90
caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagggtg
60

tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gatacctaca ttactgggtt gaggcaagcc
120

cctggtcaag gactggaatg gatgggcagg ctggaccag caaacggcca cacaaagtac
180

gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg acccgggaca cctcaagcaa cactgcatac
240

atggagcttt ctcgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
300

tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc
360

acagtgagct ca
372

<210> 91
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 91
caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagggtg
60

tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gatacctaca ttactgggtt gaggcaagcc
120

cctgggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaattac
180

gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg accagcgaca cctcaagcaa cactgcatac
240

atggagcttt ctgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
300

tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc
360

acagtgaagct ca
372

<210> 92
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 92
caggttcagc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagggtg
60

tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttactgggt gaggaagcc
120

cctgggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaagtac
180

gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg accagcgaca cctcaagcaa cactgcatac
240

atggagcttt ctgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
300

tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc
360

acagtgaagct ca
372

<210> 93
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 93
caggtgcac tcgttcagag tgggtgctgag gtgaaaaagc ccggagcctc tgtcaaagtc
60

tcttgtaagg catccgggtt taacatccgg gacacataca tacactgggt taggcaggct
120

ccaggccagg gtctggaatg gatgggatgg ctgaccctg ctaacggcca cactaagtac
180

gccccaaagt ttcaggggcg cgtaaccatg acctctgata ctagctccaa tactgcatac
240

atggagctga gccgactccg tagcgacgat accgccgtgt attattgcgc aaggggagcc
300

tattactacg gcagtagcgg actcttctac ttcgactatt gggggcaagg caccctggtc
360

acagtttcat ca
372

<210> 94
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 94
caggttcacc tcgttcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagggtg
60

tcctgcaaag ccagcgggtt caacatacgg gataacctaca ttactgggt gaggcaagcc
120

cctgggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaagtac
180

gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg accagcgaca cctcaagcaa cactgcatac
240

ctggagcttt ctgcttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
300

tactattatg gatcttccgg cctgttctac tttgactact gggggcaggg aaccttggtc
360

acagtgagct ca
372

<210> 95
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 95

cagggttcagc tccagcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagctg
60

tcctgcaccg ccagcggggt caacatacgg gatacctaca ttcactgggt gaggcaagcc
120

cctgggtcaag gactggaatg gatgggctgg ctggaccag caaacggcca cacaaagtac
180

gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg accagcgaca cctcaagcaa cactgcatac
240

atggagcttt ctgccttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
300

tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc
360

acagtgagct ca
372

<210> 96
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 96
cagggttcagc tccagcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagctg
60

tcctgcaccg ccagcggggt caacatacgg gatacctaca ttcactgggt gaggcaagcc
120

cctgggtcaag gactggaatg gatgggcagg ctggaccag caaacggcca cacaaagtac
180

gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg accagcgaca cctcaagcaa cactgcatac
240

atggagcttt ctgccttgag gagtgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
300

tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc
360

acagtgagct ca
372

<210> 97
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 97
caggttcacc tccagcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagctg
60
tcttgcaccg ccagcgggtt caacatacgg gatacctaca ttactgggtt gaggcaagcc
120
cctggtcaag gactggaatg gatgggcagg ctggaccag caaacggcca cacaaagtac
180
gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg accagcgaca cctcaagcaa cactgcatac
240
atggagcttt ctgcttgag gactgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
300
tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc
360
acagtgaagt ca
372

<210> 98
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>
<223> Варіабельний домен важкого ланцюга Hz

<400> 98
caggttcagc tccagcagag tggcgccgag gtgaagaagc ccggtgctag tgtcaagctg
60
tcttgcaccg ccagcgggtt caacatacgg gatacctaca ttactgggtt gaggcaagcc
120
cctggtcaag gactggaatg gatcggcagg ctggaccag caaacggcca cacaaagtac
180
gctcagaaat tccaggggag agtcaccatg accagcgaca cctcaagcaa cactgcatac
240
ctggagcttt ctgcttgag gactgatgac acagctgtgt attattgtgc cagaggagca
300
tactattatg gatcttccgg cctgttctac ttgactact gggggcaggg aaccttggtc
360
acagtgaagt ca
372

<210> 99
<211> 372
<212> ДНК
<213> штучна

<220>

<223> Варіабельний домен важкого ланцюга H₂

<400> 99

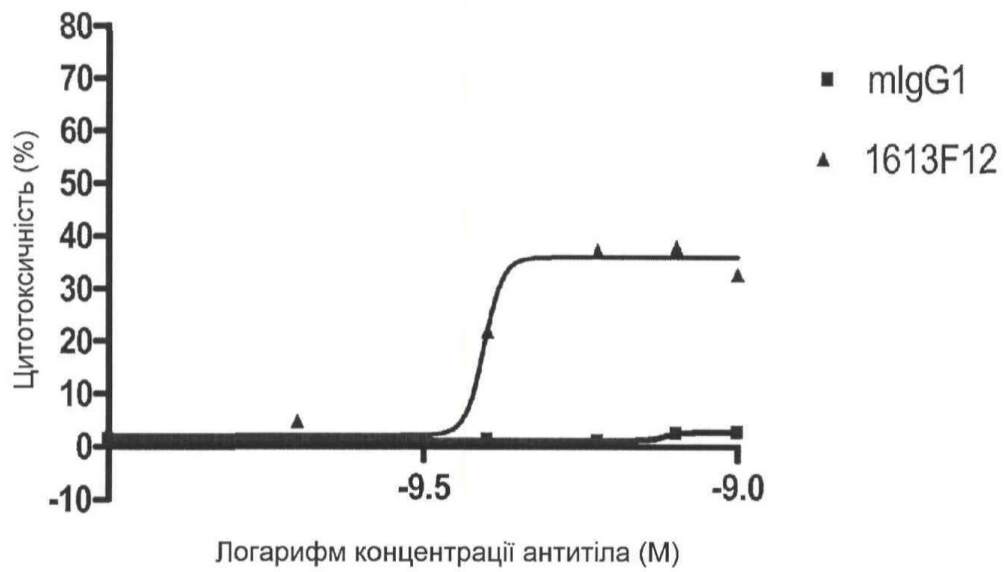
gaagttcact tgcagcagtc aggcgccgag ctgtgaaac ctggagccag cgtcaaactg
60tcctgtaccg ctagtggatt caatattcgg gacacctata tccactgggt aaagcaagca
120ccagggcagg gattggagtg gatcggaacg ctggatcccg ccaacggtca tactaagtac
180ggtcagaagt tccaagggag ggtgacaatg acctctgata ccagctccaa caccgcatat
240ctgcagctga gccgtcttag atctgacgac acagctgtct actattgcgc taggggcgcc
300tactactacg ggtccagtgg tctgttttac ttcgattatt ggggccaggg cactctcgtg
360acagtgtcaa gt
372

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, яке:
 - i) специфічно зв'язується з людським білком Axl, та
 - ii) зазнає інтерналізації після зв'язування з зазначеним людським білком Axl, де зазначене антитіло включає три CDR легкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NO: 1, 2 та 3; та три CDR важкого ланцюга, що включає послідовності SEQ ID NO: 4, 5 та 6.
- 10 2. Антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, за п. 1, яке **відрізняється** тим, що людський білок Axl має послідовність SEQ ID NO: 29 або 30.
3. Антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, за п. 1, яке **відрізняється** тим, що специфічно зв'язується з епітопом, розташованим в позаклітинному домені людського білка Axl.
4. Антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, за п. 3, яке **відрізняється** тим, що позаклітинний домен людського білка Axl має послідовність SEQ ID NO: 31 або 32.
- 15 5. Антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, за п. 1, яке **відрізняється** тим, що він викликає зниження середньої інтенсивності флуоресценції - MFI, що становить щонайменше 200.
6. Антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, за п. 1, яке **відрізняється** тим, що воно є
- 20 моноклональним антитілом.
7. Антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, за п. 1, яке **відрізняється** тим, що воно містить варіабельний домен легкого ланцюга, вибраний з групи, що складається з:
 - i) варіабельного домену легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 7,
 - ii) варіабельного домену легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 36; і
 - 25 iii) варіабельного домену легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 37-47.
8. Антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, яке **відрізняється** тим, що воно містить варіабельний домен важкого ланцюга, вибраний з групи, що складається з:
 - i) варіабельного домену важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 8;
 - ii) варіабельного домену важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 48; та
 - 30 iii) варіабельного домену важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 49-68.
9. Антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, за п. 1, яке **відрізняється** тим, що воно містить:
 - i) варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 7, 36 або 37-47; і
 - ii) варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 8, 48 або 49-68.
- 35 10. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що воно є моноклональним антитілом 1613F12, одержаним з гібридами I-4505, депонованої в Національній колекції культур мікроорганізмів в інституті Пастера, Франція, або його антигензв'язувальним фрагментом.

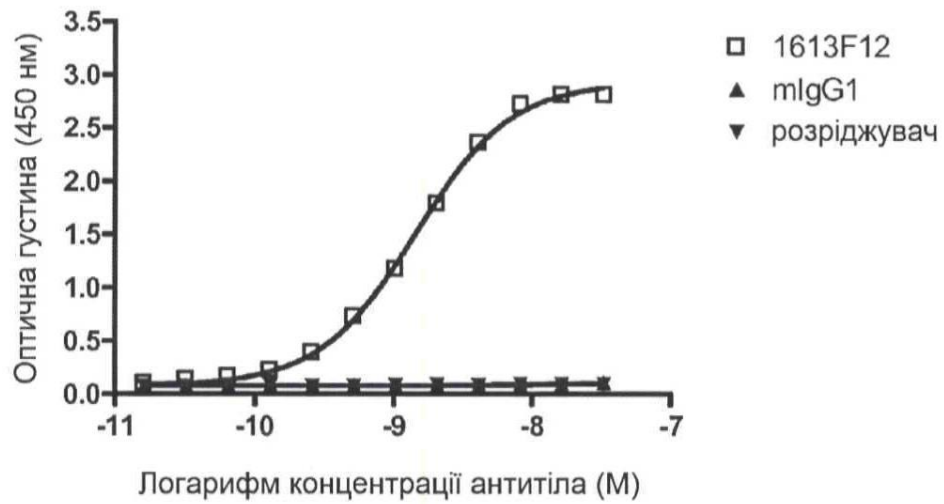
11. Антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, за п. 1, для застосування як продукту для адресної доставки цитотоксичного агента в сайт-мішень хазяїна, де зазначений сайт-мішень хазяїна є епітопом, розташованим в позаклітинному домені білка Axl.
12. Антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, для застосування за п. 11, яке **відрізняється** тим, що позаклітинний домен білка Axl являє собою позаклітинний домен людського білка Axl.
13. Антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, для застосування за п. 11, яке **відрізняється** тим, що позаклітинний домен білка Axl має послідовність SEQ ID NO: 31 або 32.
14. Імунокон'югат для лікування раку, який характеризується надекспресією білка Axl, при цьому зазначений імунокон'югат, що містить антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, за п. 1, кон'югований з цитотоксичним агентом.
15. Імунокон'югат за п. 14, де зазначений цитотоксичний агент являє собою лікарський засіб, радіоізотоп або токсин.
16. Імунокон'югат за п. 15, де зазначений лікарський засіб вибраний з групи алкілувальних агентів, таких як азотистий іприт - мехлоретамін, алкілсульфонати, нітрозосечовину, оксазофорини, азиридици або іміноетилени, антиметаболіти, протипухлинні антибіотики, інгібітори мітозу, інгібітори функціонування хроматину, антиангіогенні агенти, антиестрогени, антиандрогени, хелатуючі агенти, стимулятори абсорбції заліза, інгібітори циклооксигенази, інгібітори фосфодіестерази, інгібітори ДНК, інгібітори синтезу ДНК, стимулятори апоптозу, інгібітори синтезу тимідилату, інгібітори Т-клітин, агоністи інтерферону, інгібітори рибонуклеозидтрифосфатредуктази, інгібітори ароматази, антагоністи естрогенових рецепторів, інгібітори тирозинкінази, інгібітори клітинного циклу, таксани, інгібітори тубуліну, інгібітори ангіогенезу, стимулятори макрофагів, антагоністи нейрокінінових рецепторів, агоністи канабіноїдних рецепторів, агоністи допамінових рецепторів, агоністи гранулоцитарного колонієстимулювального фактора, агоністи рецепторів еритропоєтину, агоністи рецепторів соматостатину, агоністи ЛГРГ, кальцієві сенсibiliзатори, що підвищують чутливість до іонів кальцію, антагоністи рецепторів фактора росту судинного ендотелію, антагоністи інтерлейкінових рецепторів, інгібітори остеокластів, стимулятори утворення вільних радикалів, антагоністи рецепторів ендотеліну, алкалоїд барвінку, антигормони або імуномодулятори.
17. Імунокон'югат за п. 15, який **відрізняється** тим, що зазначений радіоізотоп вибраний з групи, що включає At^{211} , C^{13} , N^{15} , O^{17} , P^{19} , I^{123} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Tc^{99m} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} , і радіоактивні ізомери Lu, гадолінію, марганцю або заліза.
18. Імунокон'югат за п. 15, який **відрізняється** тим, що зазначений токсин вибраний з групи, що включає А-ланцюг дифтерійного токсину, незв'язувальні активні фрагменти дифтерійного токсину, А-ланцюг екзотоксину, одержаного з *Pseudomonas aeruginosa*, А-ланцюг рицину, А-ланцюг абрину, А-ланцюг модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантини, білки *Phytolacca americana*, такі як PAPI, PAPI та PAP-S, інгібітор *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор *Sapaonaria officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин та трихотецени, доластатини, ауристатини, трихотецен та CC1065 та їх похідні.
19. Імунокон'югат за п. 14, який **відрізняється** тим, що зазначений імунокон'югат додатково містить лінкер.
20. Імунокон'югат за п. 19, який **відрізняється** тим, що зазначений лінкер являє собою розщеплюваний лінкер або нерозщеплюваний лінкер.
21. Імунокон'югат за п. 19, який **відрізняється** тим, що зазначений розщеплюваний лінкер являє собою чутливий до кислот лінкер, чутливий до пептидів лінкер, фотолабільний лінкер, диметилловий лінкер або дисульфідвмісний лінкер.
22. Застосування імунокон'югата за п. 14 для виготовлення лікарського засобу для лікування раку.
23. Фармацевтична композиція для лікування раку, яка характеризується надекспресією білка Axl, при цьому зазначена фармацевтична композиція містить кон'югат за п. 14 та щонайменше ексципієнт та/або фармацевтично прийнятний носій.
24. Мишача гібридома I-4505, депонована в Національній колекції культур мікроорганізмів в інституті Пастера, Франція, для одержання антитіла за п. 1.

Дослідження цитотоксичної дії 1613F12 на клітини SN12C

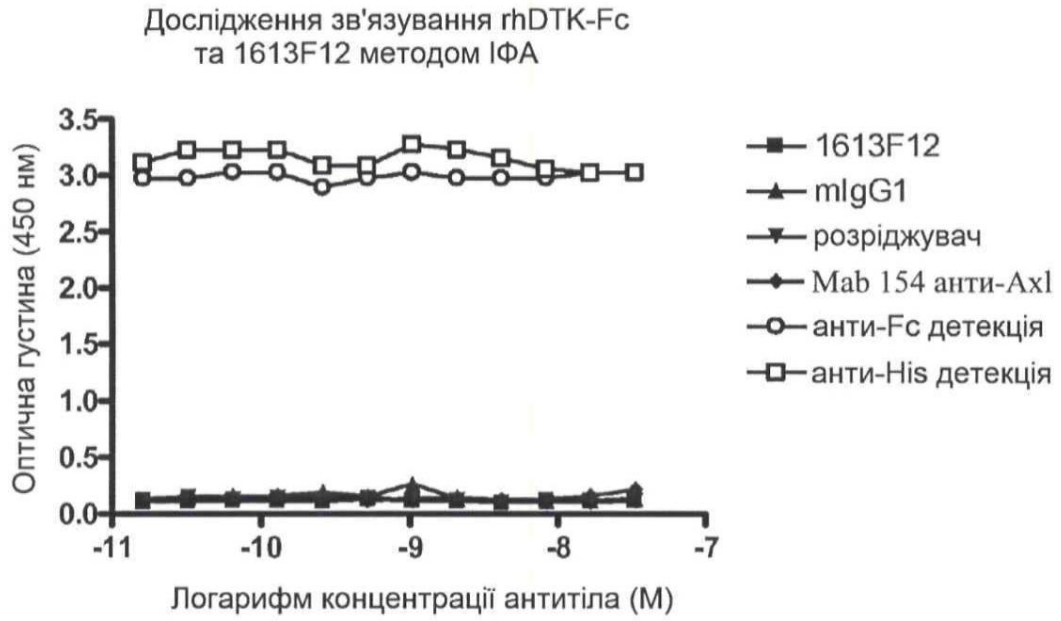


ФІГ. 1

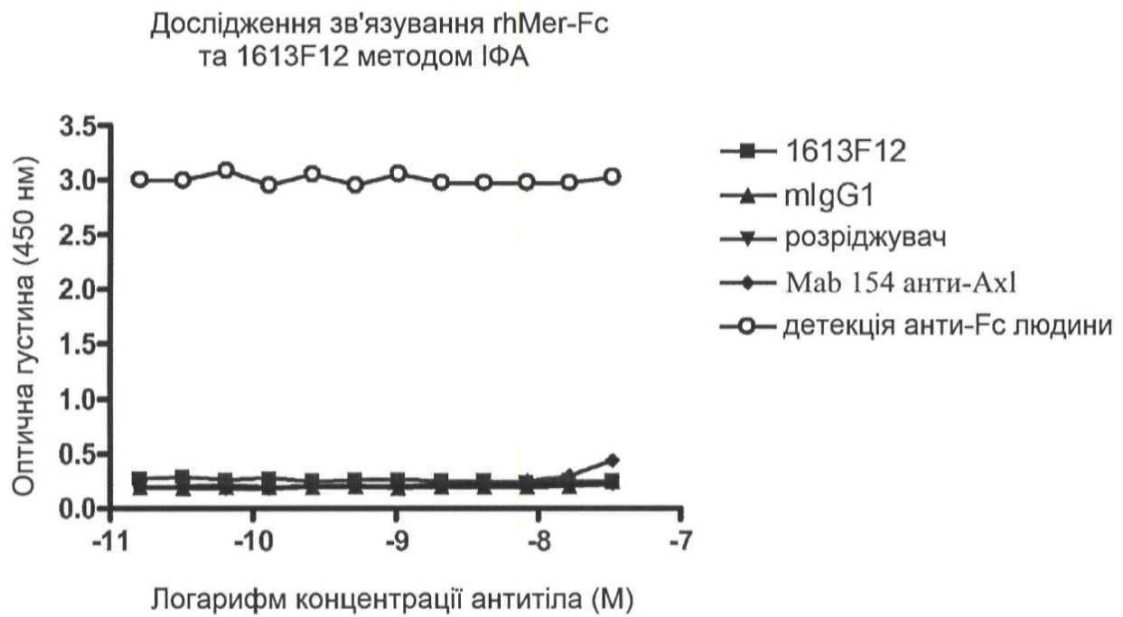
Дослідження зв'язування rhAxl-Fc та 1613F12 методом ІФА



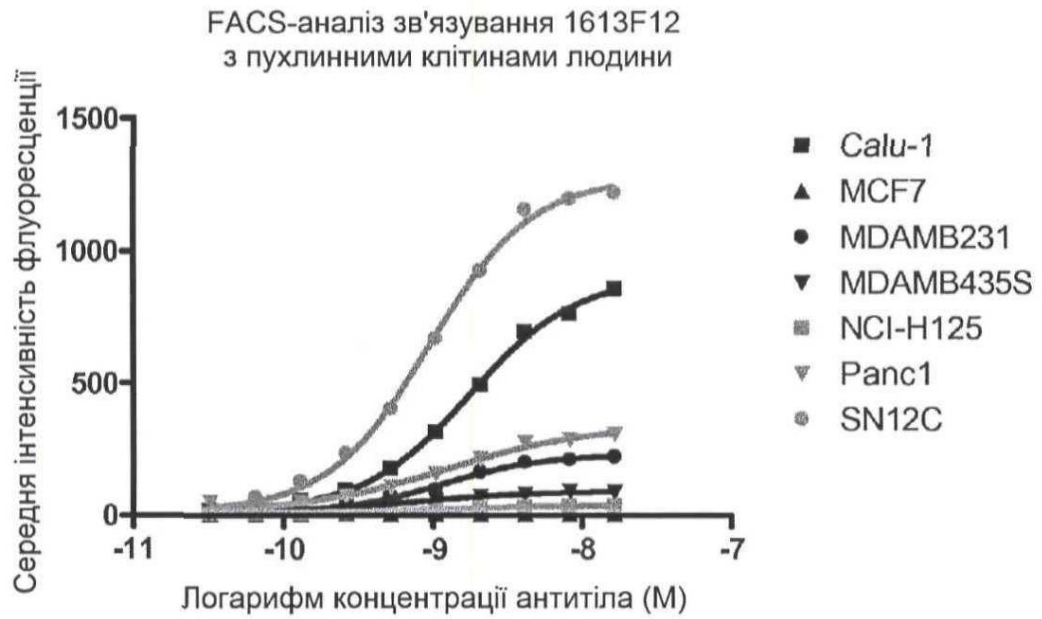
ФІГ. 2А



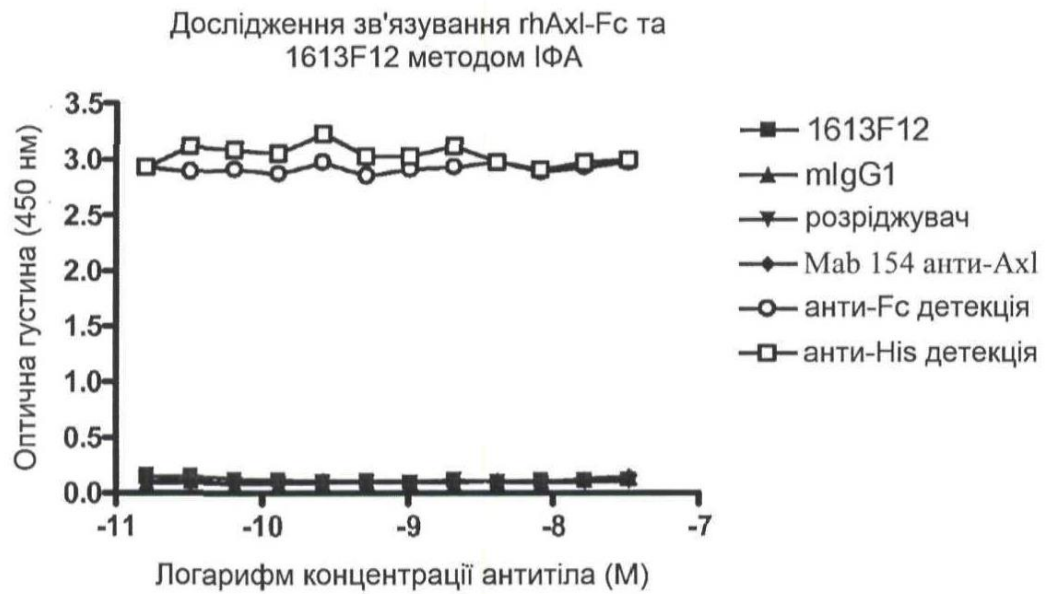
ФІГ. 2Б



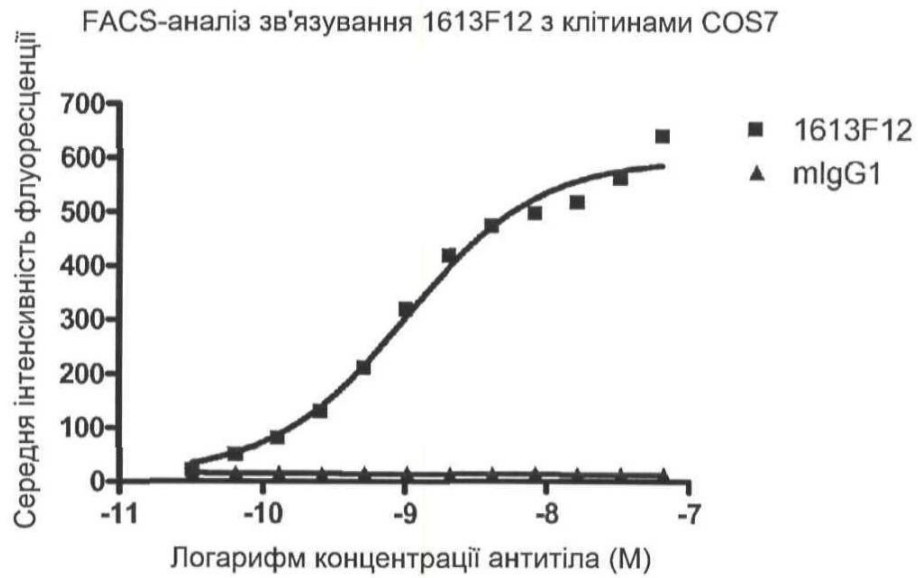
ФІГ. 2В



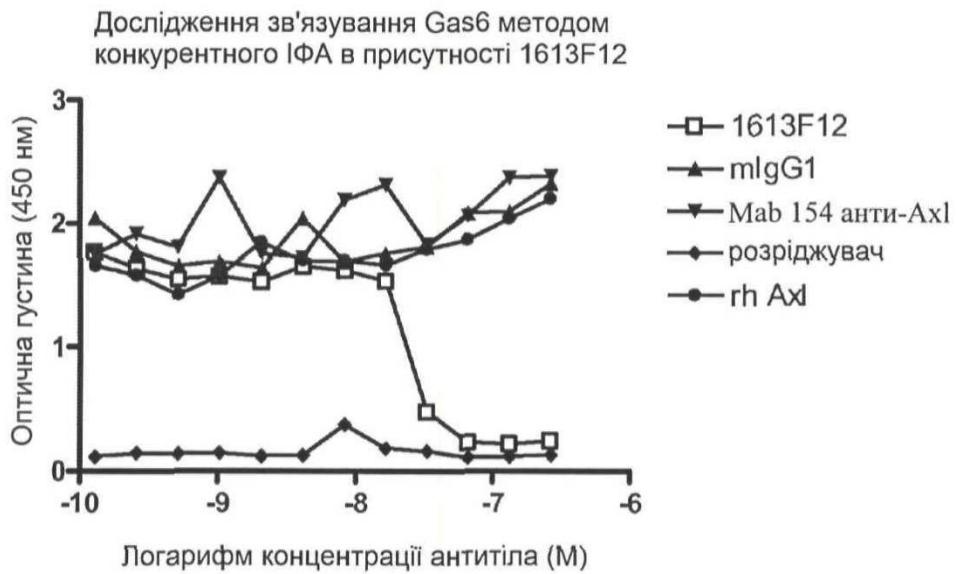
ФІГ. 3



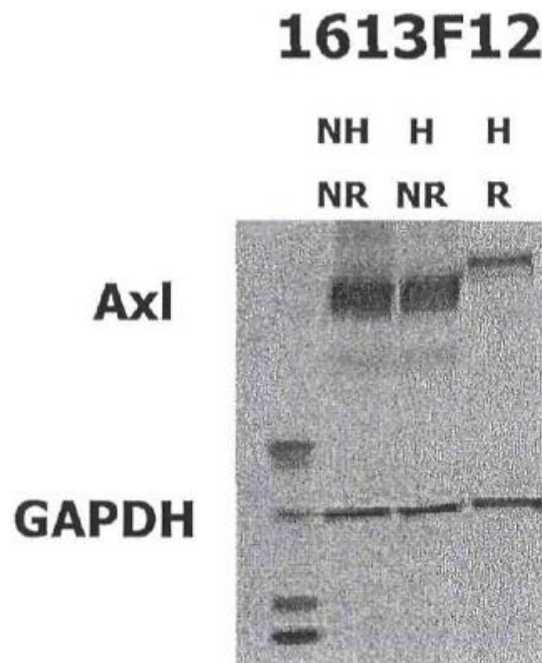
ФІГ. 4



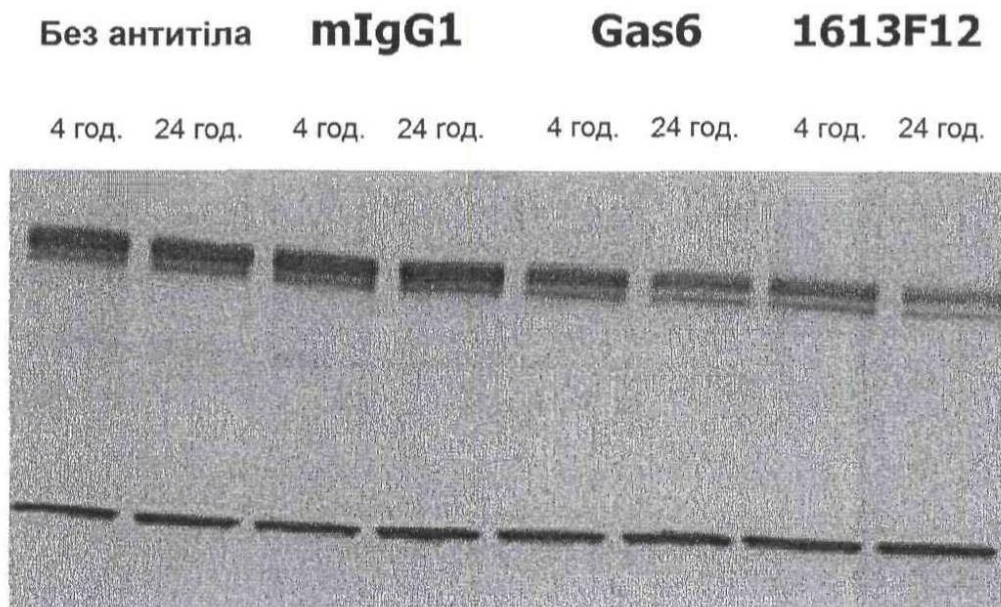
ФІГ. 5



ФІГ. 6

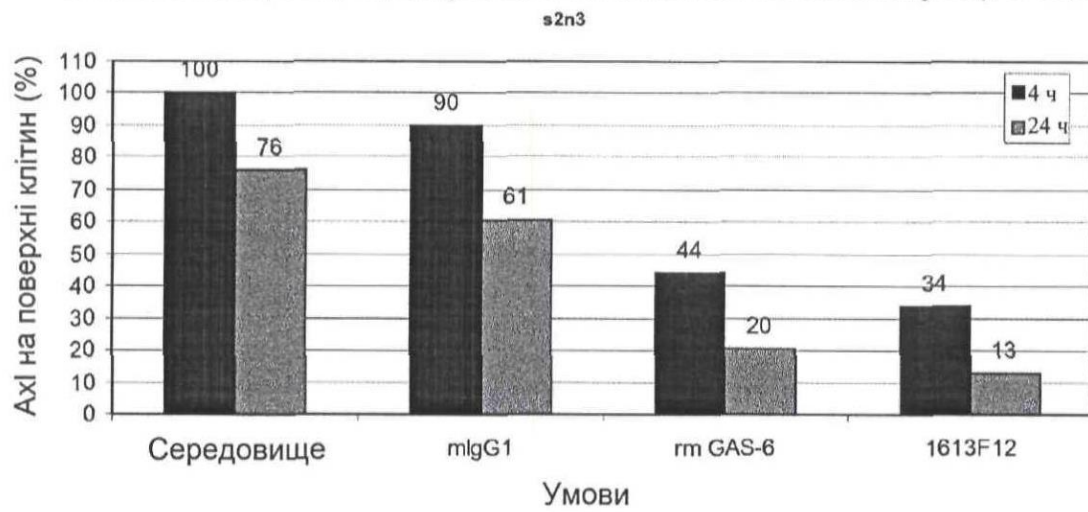


ФІГ. 7



ФІГ. 8А

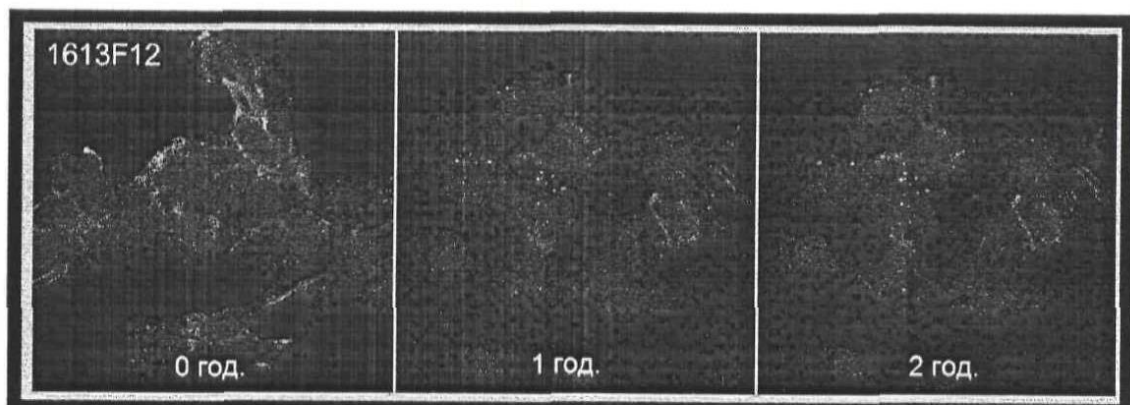
Зниження експресії рецептора AxI на клітинах SN12C після інкубації з 1613f12



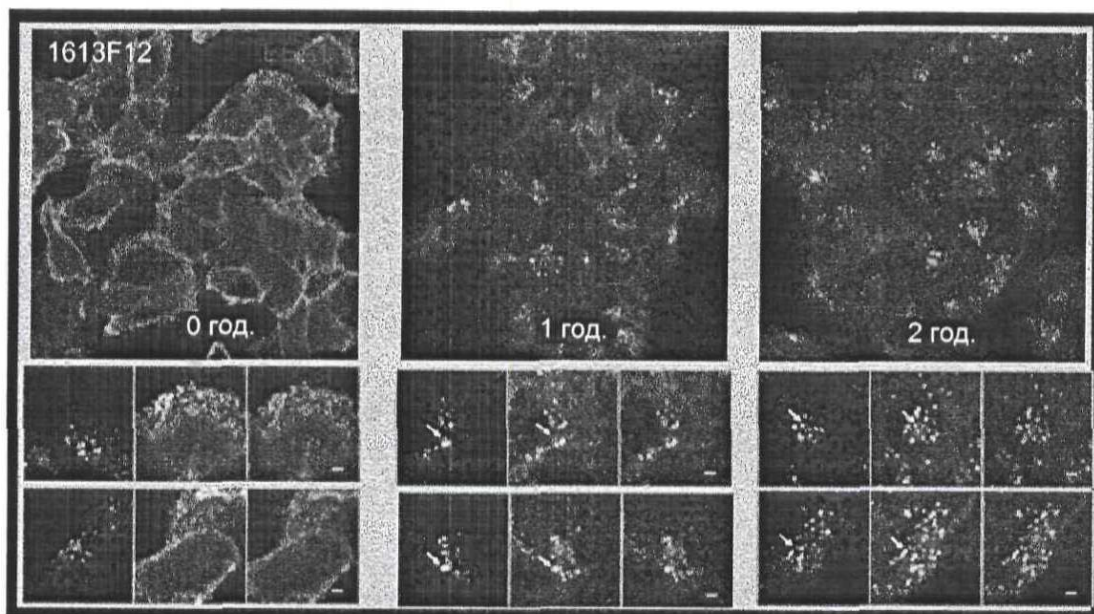
ФІГ. 8Б



ФІГ. 9А

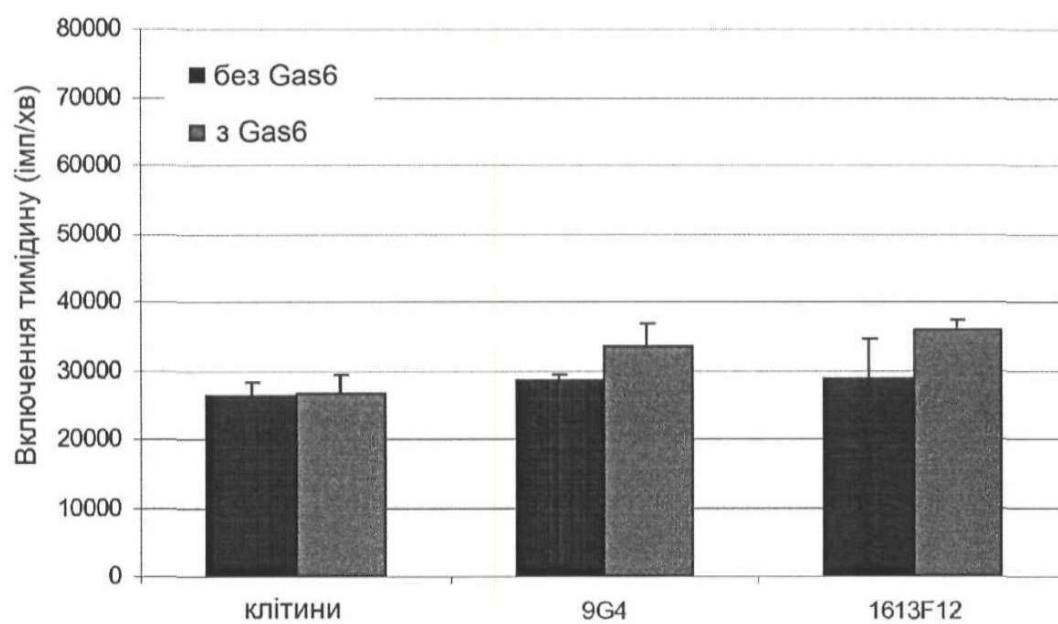


ФІГ. 9Б

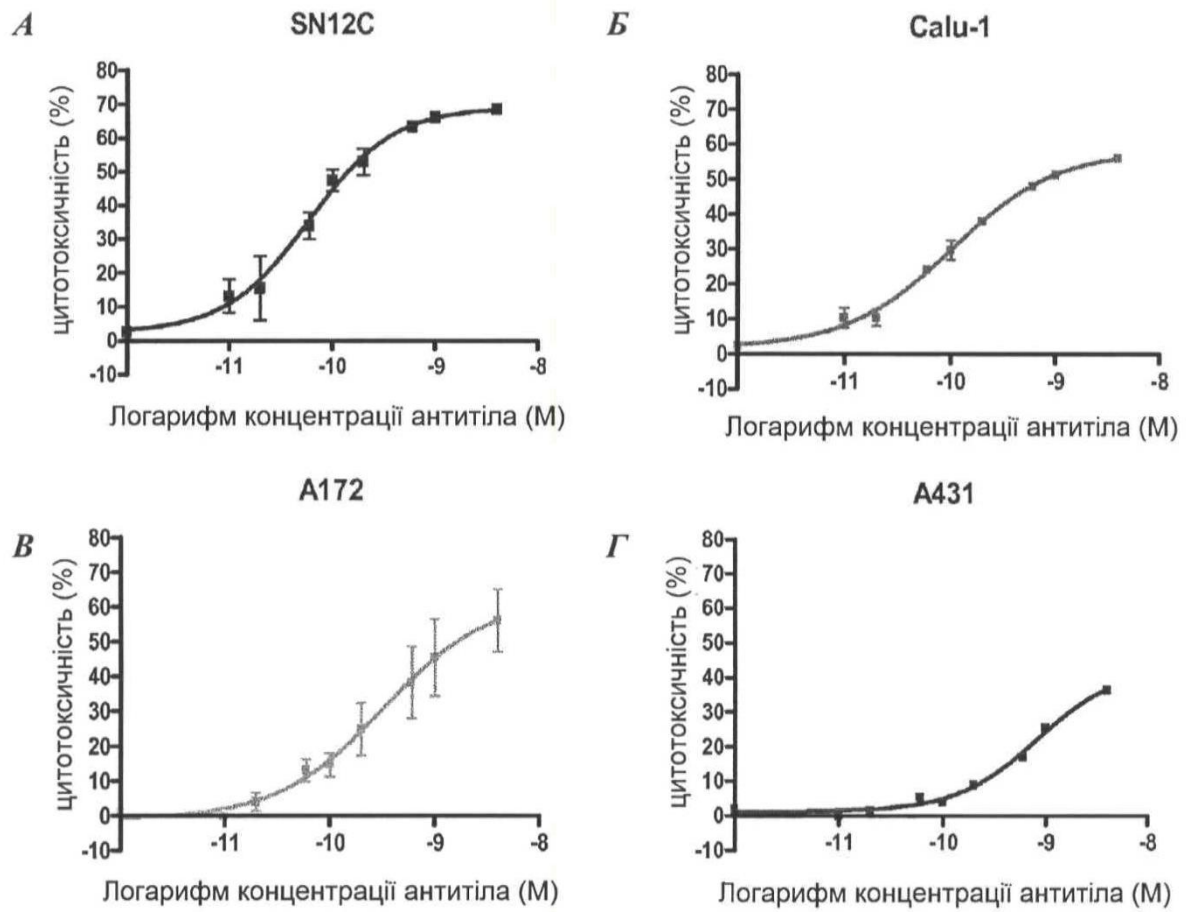


ФІГ. 9В

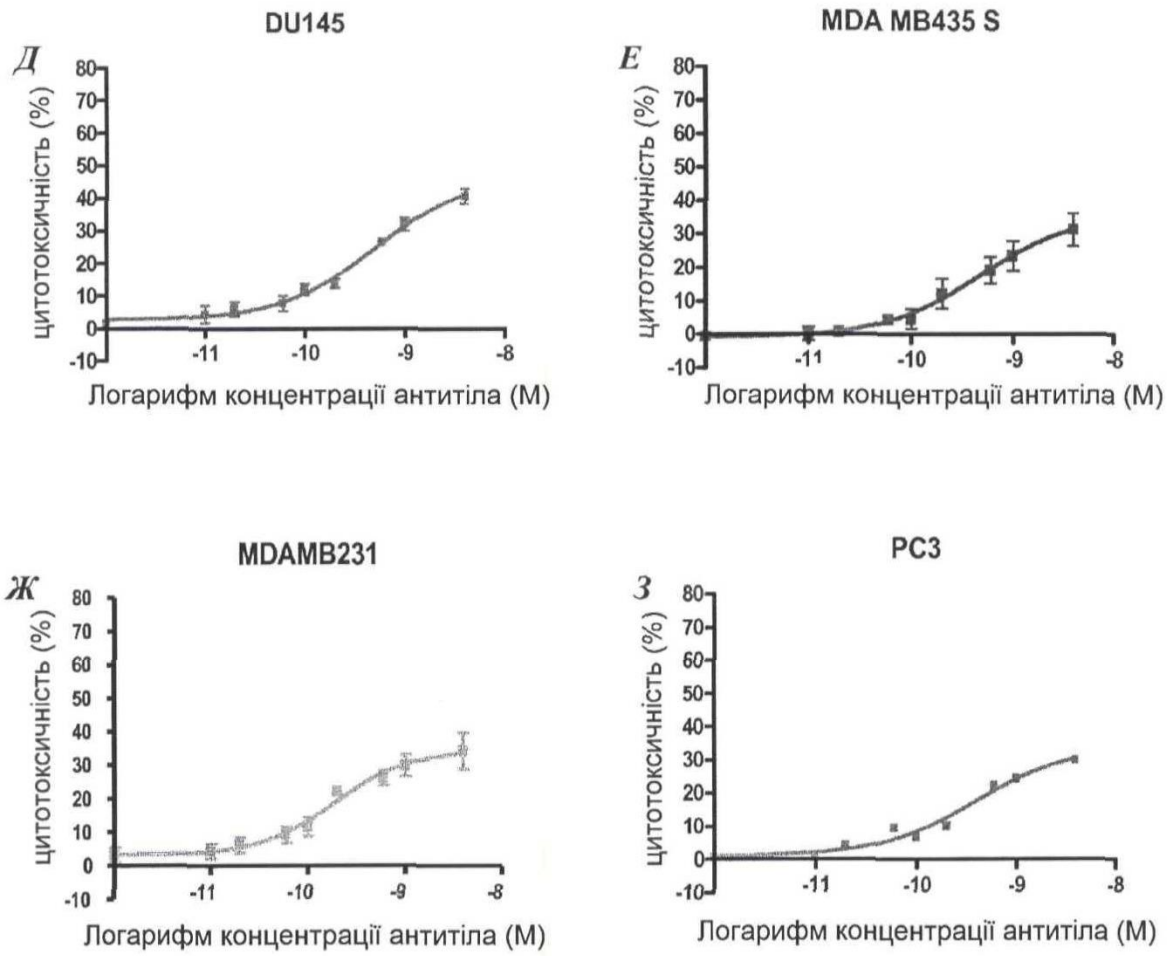
Дослідження проліферації клітин SN12С в присутності 1613F12



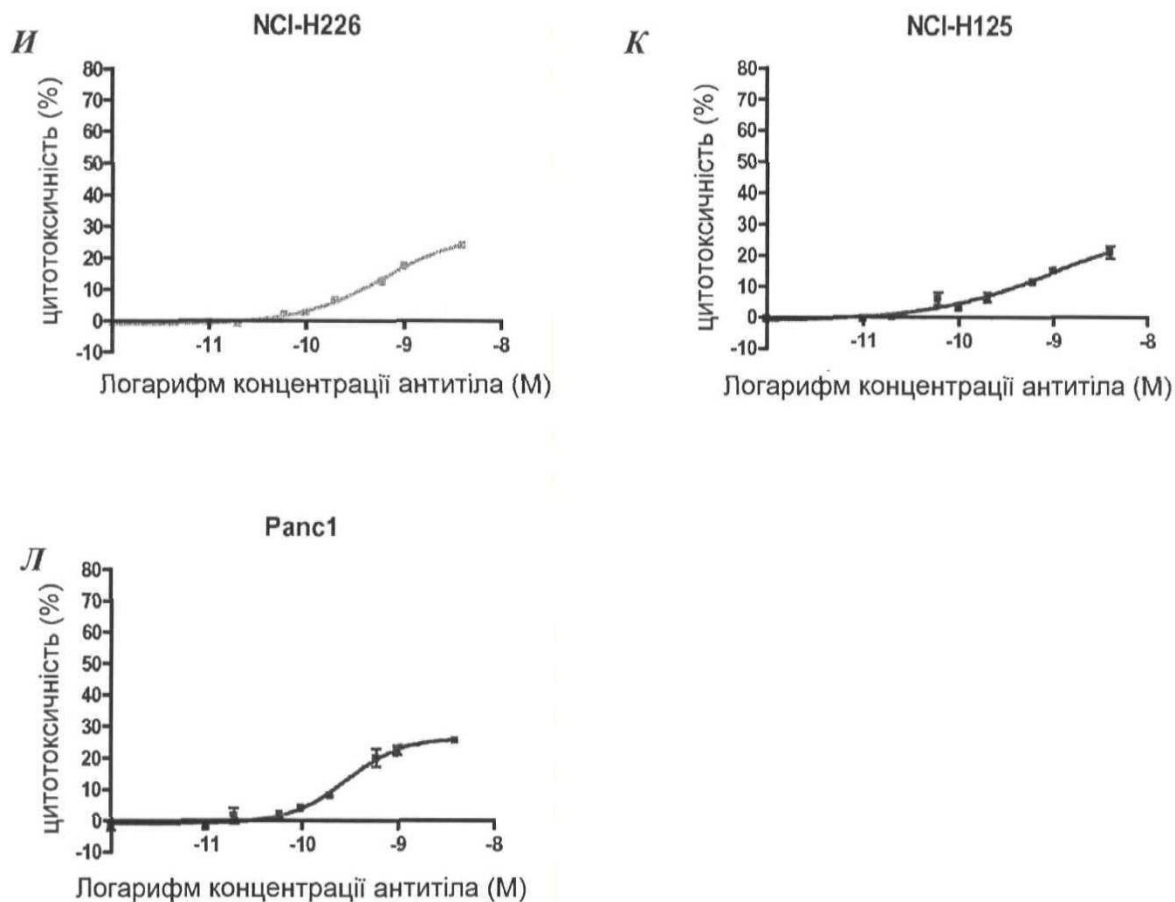
ФІГ. 10



ФІГ. 11

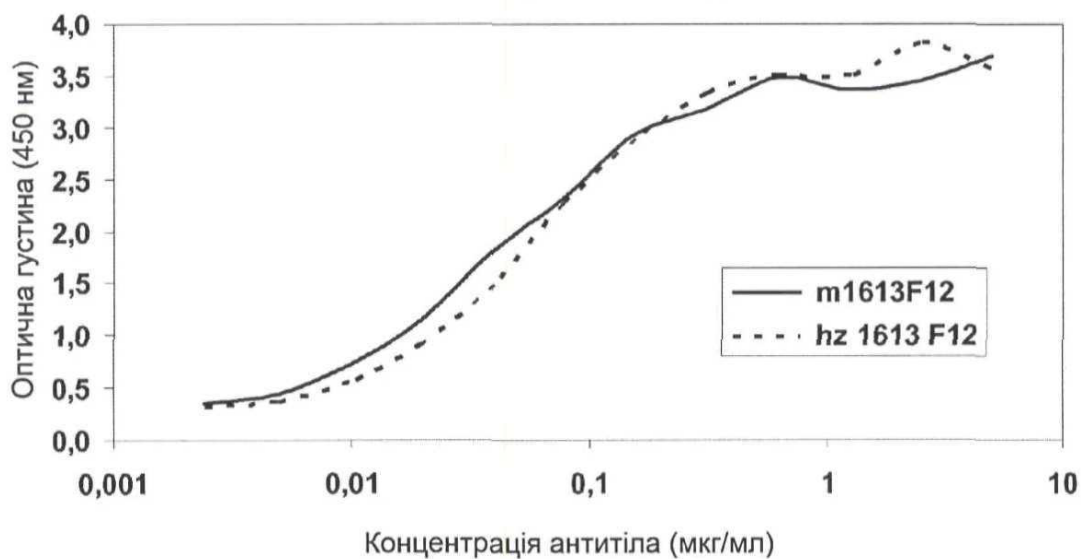


ФІГ. 11

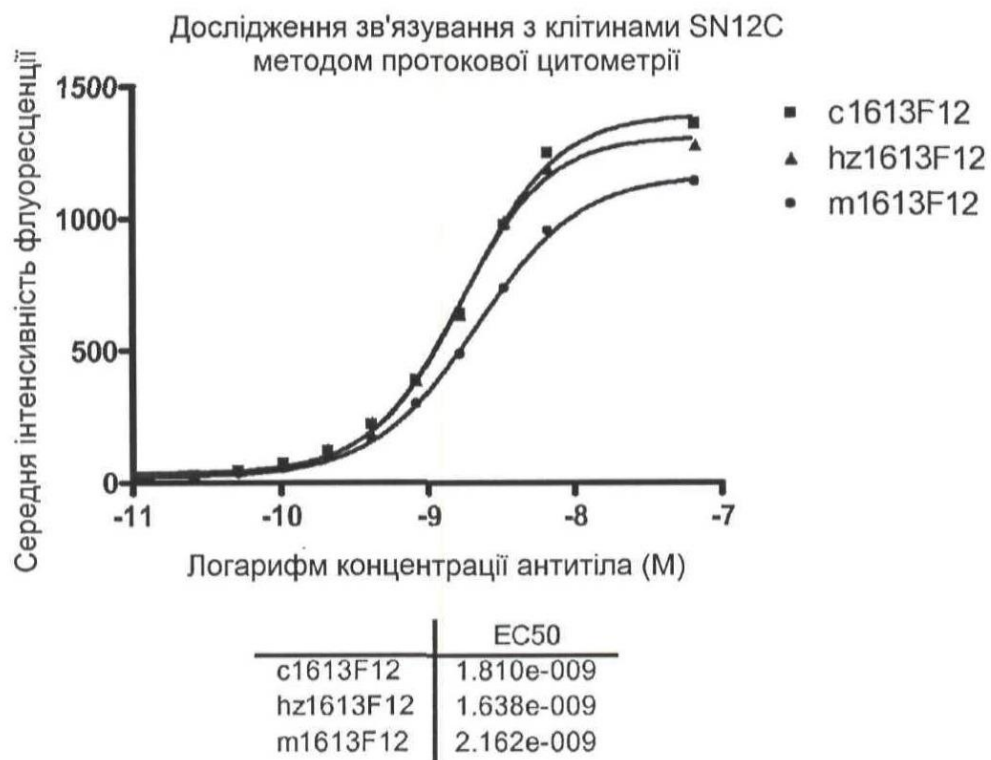


ФІГ. 11

Вакцинація гуманізованого антитіла 1613F12,
спрямованого проти Axl, методом ІФА

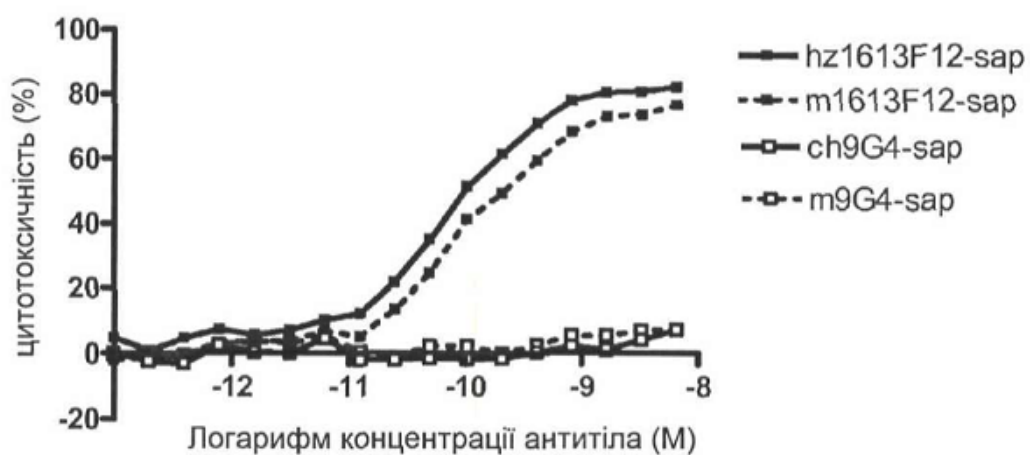


ФІГ. 12



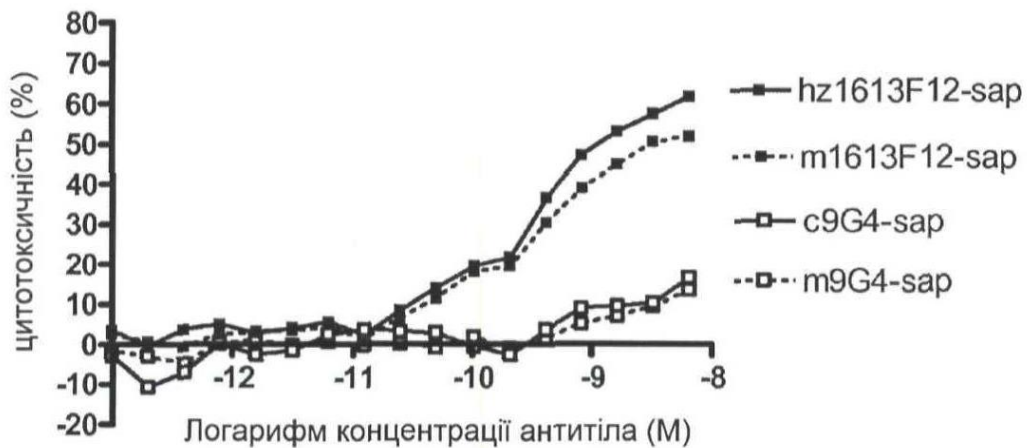
ФІГ. 13

Цитотоксична дія імунокон'югатів m1613F12-сапорин, hz1613F12-сапорин, m9G4-сапорин та ch9G4-сапорин in vitro на клітини SN12C



ФІГ. 14

Цитотоксична дія імунокон'югатів m1613F12-сапорин, hz1613F12-сапорин, m9G4-сапорин, ch9G4-сапорин in vitro на клітини Calu-1



ФІГ. 15