

Даний винахід стосується до інгібіторів TG2 і до способів одержання й застосування таких інгібіторів.

Трансглютаміназа типу 2 (TG2; від англ. "Transglutaminase type 2", також відома як тканинна Трансглютаміназа, ttg) становить частину більш великого 9-членного сімейства трансглютаміназ, що включає Фактор XIIIa, що є критичним для згортання крові, а також трансглютаміназу кератиноцитів (TG1) і епідермальну трансглютаміназу (TG3), які залучені в остаточне диференціювання кератиноцита. Крім того, існують інші члени сімейства TG, такі як TG типів 4-7 визначальна роль яких дотепер не ідентифікована.

TG2 функціонує, насамперед, як фермент, що утворює поперечні зшивки білків за допомогою каталізу утворення ϵ (γ -глутаміл) лізин-ізо-діпептидних зв'язків. Підвищена експресія TG2 веде до абераційного поперечного зшивання білків, які асоційовані з декількома патологіями, що включають різні типи рубцювання тканини, утворення нейрофібрилярних клубків при декількох розладах головного мозку й резистентності до хіміотерапії при деяких видах раку. TG2 також здатна до деамідування білків. TG2 деамідує гліадин, і комплекс TG2/гліадин є первинним аутоантигеном при целиакиї. Крім того, TG2 має ГТФ-зв'язувальну функцію й може діяти як ГТФаза, хоча це не пов'язане з її патологічною роллю.

Підвищена активність TG2, насамперед, пов'язана з аномальним загоєнням рани [1], що приводить до фіброзу печінки [2], легенів [3], серця [4] і нирки [5], а також до атеросклерозу [6]. Процес рубцювання й фіброз пов'язаний з підвищеним синтезом і, що найбільше важливо, з підвищеним експортом TG2 в інтерстиціальний простір. Перебуваючи поза клітиною, TG2 здатна викликати поперечні зшивки білків позаклітинного матриксу (ВКМ), такі як фібронектин і колаген [7], шляхом включення ϵ (γ -глутаміл) лізин-ізо-діпептидної зв'язки [8]. Дослідження показали, що це може прискорити депонування доступних компонентів ВКМ, у той же час, надаючи стійкість до протеолітичного кліренсу системою матриксних металопротеїназ (MMP; від англ. "matrix metalloproteinase") [9,10]. Усе це, разом узятє, викликає нагромадження білків ВКМ і, отже, рубцевої тканини [9]. Крім того, TG2 відіграє підсилюючу роль в активації латентного трансформуючого фактора росту (TGF- β 1; від англ. "Transforming Growth Factor") у процесі рубцювання [11], а також сполучена з біохімічними шляхами активації інтерлейкіну-6 [12] і фактора некрозу пухлини α [13].

Інгібування TG2 *in vitro* знижує рівні позаклітинного матриксу [14], тоді як клітини, виділені із трансгенних нокаут-мишей по TG2, мають більш низькі рівні зрілого ВКМ [9]. Застосування *in vivo* універсальних інгібіторів TG у моделях хронічного захворювання нирок зменшує розвиток гломерулосклероза й тубулоінтерстиціального фіброзу, оберігаючи функцію нирок [15, 16]. Подібні корисні ефекти спостерігають у нокаут-мишей по TG2, підданих односторонній обструкції сечоводів [17].

Існує кілька нейродегенеративних захворювань, що характеризуються присутністю в дегенеративній області головного мозку білкових агрегатів, в утворенні яких бере участь TG2. Найкраще охарактеризована хорея Гентингтона. Білок Гентингтона (htt; від англ. "Huntington protein") містить експансію поліглутамінових повторів у його N-кінцевому домені. Білок htt дикого типу містить менш ніж 35 послідовних глутамінів, тоді як htt, пов'язаний із захворюванням, у характерному випадку має більш 40 послідовних глутамінів, що робить його чудовим субстратом для TG2. Внаслідок цього в стріатумі й корі головного мозку пацієнтів із хворобою Гентингтона утворюються нерозчинні агрегати. Частота агрегатів добре узгоджується з важкістю захворювання.

Хвороба Альцгеймера характеризується присутністю позаклітинних сенильних бляшок, що складаються з агрегованого амілоїдного β -білка й внутрішньоклітинних нейрофібрилярних клубків, що складаються із високо фосфорильованої форми білка tau. Ці бляшки містять більші кількості ϵ (γ -глутаміл)лізин-ізо-діпептидних зв'язків.

Нарешті, відмітною ознакою хвороби Паркінсона є присутність у цитоплазмі уражених нейронів агрегатів альфа-синуклеїна, називаних тільцями Леві, які, знову ж, містять ϵ (γ -глутаміл)-лізин-ізо-діпептидні зв'язки. Усі згадані вище білки є гарними субстратами для TG2 *in vitro*. Крім того, уражена область головного мозку містить більш високі рівні білка TG2, ніж неуразнені області головного мозку в тих же пацієнтів. Кореляція між субстратною специфічністю TG2 для агрегованих білків, пов'язаних із захворюванням, і підвищеними рівнями експресії TG2 дозволяє припустити роль ферментативно активної TG2 при кожному захворюванні.

Показане, що інгібітори TG проявляють терапевтичні ефекти в численних біологічних моделях нейродегенеративних захворювань. У моделі хвороби Паркінсона на культурі клітин за одночасної трансфекції клітин COS-7 альфа-синуклеїном і TG2 утворюються ковалентні агрегати альфа-синуклеїна, що нагадують тільця Леві при хворобі Паркінсона, і утворення цих агрегатів залежить від ферментативно активної TG2, оскільки мутант C277S, що інактивує TG2, нездатний індукувати утворення агрегатів. Обробка цих котрансфікованих клітин цистаміном значно зменшувала кількість агрегатів альфа-синуклеїна, а також відсоток клітин, що містять ці агрегати. Є два інших повідомлення, у яких білки нормальної довжини й білки з експансією поліглутамінових повторів, репрезентативні для захворювань, що характеризуються експансією CAG, таких як хвороба Гентингтона, трансфіковані в клітинні лінії, і показане, що вони утворюють агрегати. Обробка цих

клітинних ліній конкурентним інгібітором TG монодансилкадаверіном приводила до зменшення ядерної фрагментації, тоді як обробка цистаміном приводила як до зменшення ядерної фрагментації, так і до зменшення утворення білкових агрегатів. Прикладом універсального інгібітору TG є 1,3-диметил-2-[(оксо-пропіл)тіо]імідазолію хлорид, наявний у продажу від фірми Zedira GmbH, на який посилюються в деяких публікаціях як на NTU283 або r283.

Цистамін має корисний терапевтичний ефект *in vivo* при дозуванні в моделях хвороби Гентингтона на мишах. У мишей Huntington R6/2, дозованих цистаміном, показана поліпшена рухова функція, менш важка втрата маси й підвищена виживаність у порівнянні з неопрацьованими контролями. Важливо, що активність TG2 *ex vivo* у гомогенатах головного мозку була більш низькою після дозування цистаміном щонайменше через 60 хв. після ін'єкції. У різних моделях хвороби Гентингтона на мишах лінії YAC128 цистамін був здатний знижувати рівень стріарної атрофії, але нездатний поліпшувати масу тіла тварини або рухову функцію, що вказує на корисний ефект цистаміна на клітинному й тканинному рівні, але не при симптомах захворювання.

Імовірно, найбільш переконливе свідчення, що корисний терапевтичний ефект цистаміна на мишах Huntington не залежить від інгібування TG2, дає схрещування мишей R6/2 Huntington з нокаут-мишами по TG2 з одержанням лінії, схильної до нейродегенерації під час відсутності TG2. При обробці мишей R6/2 TG2^{-/-} цистаміном поліпшена рухова функція й збільшена тривалість життя статистично не відрізнялися від спостережуваних у мишей R6/2 TG2^{+/+}, оброблених цистаміном. Крім того, миші R6/1 і R6/2 TG2^{-/-} мали підвищені рівні нейрональних білкових агрегатів у порівнянні з мишами R6/1 і R6/2 TG2^{+/+}, що дозволяє припустити механізм агрегації білка, незалежний від трансамідуючої активності TG2 у цих моделях. Проте, примітно, що миші R6/2 TG2^{-/-} проявляли затримку появи порушення рухової функції й поліпшену виживаність у порівнянні з мишами R6/2 TG2^{+/+}, що має на увазі роль TG2 у патогенезі нейродегенерації в моделі R6/2.

TG2 також у значній мірі залучена в целіакію, що вражає одну з 100 людей у Західній Європі. Целіакія-спру (глютеніна ентеропатія) являє собою опосередкований Т-клітинами запальний розлад тонкого кишечника, викликаний класом білків, названих проламінами, виявленими в пшениці, ячмені й житі. Високий зміст проліна й глутаміну цих білків робить їх стійкими до природних протеаз і пептидаз шлунка, підшлункової залози й кишечника в процесі травлення. Отримані в результаті пептидні фрагменти залишаються погано перевареними в тонкому кишечнику й одержують доступ до власної пластинки підслизової оболонки кишечника, де після модифікації ферментом TG2 вони можуть стимулювати опосередковану Т-клітинами імунну відповідь, що приводить до запалення й деструкції кишкової структури. Кишкова TG2 деамідує певні залишки глутаміну в проламінових пептидах до залишків глутамата. В індивідуумів HLA-DQ2/8 ці модифіковані пептиди презентуються відповідним аутореактивним Т-клітинам молекулами головного комплексу гістосумісності (ГКГ) класу II. Хоча проламіни мають високий вміст глутаміну (близько 30-35%), тільки деякі із цих залишків глутаміну є мішенями TG2 людини.

Відмінна кореляція між субстратною специфічністю TG2, зв'язуючою спорідненістю DQ2 і стимулюючим потенціалом у відношенні Т-клітин проламінів, оброблених TG2, у високому ступені дозволяє припустити, що деамідування пептидів опосередковане TG2 і відіграє значну роль при визначенні важкості захворювання. Крім того, у пацієнтів із глютеніною хворобою утворюється відповідь аутоантитіл на комплекси TG2-гліадин. Ці антитіла проти TG2 виявлені як у тонкому кишечнику, де показана їхня спільна локалізація з позаклітинною TG2, так і в крові, де їх використовують як діагностичний маркер захворювання.

Незважаючи на відсутність моделей целіакії на тваринах, експерименти *ex vivo* показують, що інгібування TG2 має потенційну користь для пацієнтів із целіакією-спру. Культивування біопсій тонкого кишечника пацієнта із целіакією із глютеніном, або обробленим TG2 (деамідованим), або не обробленим TG2 (не деамідованим), привело в результаті до утворення ліній Т-клітин пацієнта, що Бажано розпізнають деамідовані пептиди глютену ймовірніше, чим недеамідовані пептиди глютену. Також, шляхом блокування активності ендогенної TG2 у біопсіях целіакії цистаміном, більш ніж половина отриманих у результаті ліній Т-клітин мала знижені проліферативні відповіді в порівнянні з контролями, не обробленими цистаміном. Лінії клітин не давали гарну відповідь на недеамідовані продукти розщеплення. Ці результати мають на увазі, що, оскільки популяції Т-клітин, що реагують на глютен, у біопсіях кишечника пацієнтів із целіакією мають природну схильність у напрямку розпізнавання деамідованих пептидів глютену в порівнянні з недеамідованими пептидами, ендогенна активність TG2 у цих біопсіях може приводити в результаті до деамідування пептидів глютену *in situ*, і що обробка біопсій пацієнтів із глютеніною хворобою інгібіторами TG2 може знизити проліферативну відповідь глютен-реактивних Т-клітин.

В іншому дослідженні показано, що універсальний інгібітор TG 2-[(2-оксопропіл)тіо]імідазолію був здатний запобігати *in situ* утворенню поперечних зшивок пептидів глютену з ендогенними білками в тонких зрізах тканини, узятій як від пацієнтів із целіакією-спру, так і від контрольних пацієнтів. Важливіше, що автори показали, що інкубація інтактних біопсій тонкого кишечника пацієнтів із целіакією з 2-[(2-оксопропіл)тіо]імідазолієм запобігала активації Т-клітин, індуковану недеамідованою

формою імунодомінантного пептиду глютену. На противагу цьому, інгібування TG було неефективне при контролі активації Т-клітин, коли ці біопсії інкубували з деамідованим варіантом того ж пептиду. Ці результати дозволяють припустити, що інгібування ендогенної TG2 у біопсіях пацієнтів із целиацією може запобігати деамідуванню глютенових пептидів і, отже, знижувати активацію Т-клітин.

Кілька спостережень підтверджує гіпотезу про те, що TG2 відіграє роль у розвитку деяких типів раку. Численні дослідження показали, що білок TG2 перетерплює підвищувальну регуляцію в раковій тканині щодо здорової тканини при таких раках, як гліобластоми, злоякісні меланоми й протокові аденокарциноми підшлункової залози, називаючи лише кілька. Продемонстрована позитивна кореляція між хіміотерапевтичною резистентністю й метастатичним потенціалом певних раків і рівнями експресії TG2, причому, показане, що в певних типах клітин TG2 проявляє антиапоптичні ефекти на клітинах, тоді як знижуюча регуляція за допомогою малої інтерферуючої РНК (міРНК) рівнів експресії білка TG2 або обробка інгібіторами TG2 сенсibiliзує ці клітини до апоптозу. З другого боку, також є повідомлення про понижувальну регуляцію експресії TG2 при певних типах раку [18]. Недавно показане, що TG2 є партнером зв'язування для білка GPR56, що перетерплює понижувальну регуляцію у високо метастатичних ракових клітинах, що дозволяє припустити, що TG2 може діяти як білок, що є пухлинним супресором, за допомогою її взаємодії з GPR56 [18].

Сучасні інгібітори трансклятамінази діляться на 3 основних класи: 1) конкурентні амініні інгібітори (наприклад, цистамін і спермін), що конкурують із природними амініними субстратами; 2) оборотні аллостеричні інгібітори, такі як ГТФ і знову відкритий клас сполук, що мають тієно[2,3-*d*]піримідин-4-он-ацилгідразидний кістяк; і 3) необоротні інгібітори, що включають похідні 2-[(2-оксопропіл)тіо]імідазолію (ацетилюють активний сайт цистеїну), 3-галогено-4-, 5-дігідроізоксазоли (утворюють стабільний імінотіоефір в активному сайті) і аналоги карбобензилоксі-*L*-глутамінілгліцину з поруч вбудованих реакційних угруповань.

Більшість із них використане в описаних вище експериментальних системах, і показані корисні результати. Проте, жоден із цих інгібіторів не проявляє специфічності до ізоформи TG, оскільки всі вони націлені на консервативну каталітичну тріаду усередині каталітичної центральної ділянки сімейства трансклятаміназ. Отже, усі вони мають потенційний недолік спільного інгібування Фактора XIIIa, TG1 і TG3, яке запобігає їхньому застосуванню при захворюваннях людини внаслідок побічних ефектів, які можна чекати.

В WO 2006/100679 розкрито специфічне антитіло проти TG2, отримане за допомогою рекомбінантної технології зі зразків, зібраних від трьох дорослих пацієнтів із целиацією, що мають високі титри антитіла проти TG2.

З урахуванням асоціації TG2 із численними хворобливими станами й переконливих даних, отриманих для неспецифічних інгібіторів, існує необхідність у високоселективних і вискоефективних інгібіторах TG2, що володіють мінімальними нецільовими ефектами.

Перерахування або обговорення явно раніше опублікованого документу в даному описі необов'язково слід розглядати як визнання того, що цей документ становить частину рівня техніки або являє собою загальнодоступні відомості.

У першому аспекті даного винаходу запропоноване антитіло або його антигенсполучний фрагмент, що селективно пов'язується з епітопом усередині центральної ділянки трансклятамінази типу 2 (TG2).

У певних втіленнях винаходу розглянуте, що антитіло або його антигенсполучний фрагмент селективно зв'язується з епітопом усередині центральної ділянки TG2 людини, TG2 пацюка й/або TG2 миші. В Бажано кращому втіленні винаходу TG2 являє собою TG2 людини.

Повнорозмірні амінокислотні послідовності TG2 людини, пацюка й миші можна знайти під номерами доступу в Genbank NM_004613, NM_019386.2 і NM_009373.3. Кодуюча ділянка цих послідовностей наведена нижче:

Нуклеотидна послідовність TG2 людини:

```
atggccgaggagctggtcttagagaggtgtgatctggagctggagaccaatggccgagaccaccacacggccgacctgtgccgggagaagct
ggtggtgcgacggggccagcccttctggtgaccttgagggccgcaactacgaggccagtgtagacagctctaccttcagtgctgacccg
ccagcccttagccaggagggccgggaccaagggccgtttccactaagagatgctgtggaggagggtagctggacagccaccgtggtggaccagca
agactgcaccctctcgctgcagctcaccaccccgccaacgcccccatcgccgtgtatcgctcagcctggaggcctccactggctaccaggatcca
gctttgtgctgggccaacttcattttgctcttcaacgcctggtgccagcggtatgctgtgtacctggactcgaagaggagcggcaggagtagtgcctcacc
agcagggtttatctaccagggtcgcggccaagttcatcaagaacataccttggaaatttgggcagtttgaagatgggatcctagacatctgcctgatccttct
agatgtcaaccccaagttcctgaagaacgcccggcgtgactgtcccgccgacagccccgtctacgtgggcccgggtggtgagtggtgacatggtcact
gcaacgatgaccaggggtgtgctgtgctgggacgtgggacaacaactacggggacggcggtcagccccatgctctggatcggcagcgtggacatcctgc
ggcgtggaagaaccacggcgtgccaagcgcgtcaagtagtgccagtgctgggtctgcggcgtggcctgacagtgctgaggtgctgggcatccct
accgcgtcgtgaccaactacaactcggcccatgaccagaacagcaaccttctcatcgactactccgcaatgagtttggggagatccagggtgacaa
gagcgagatgatctggaactccactgctgggtggagtcgtggatgaccaggccggacctgcagccggggtacgagggtggcaggccctggacc
aacgccccaggagaagagcgaaggagcgtactgctgtggccaggttccagttcgtgcatcaaggaggggcagcctgagcaccagtagcagtgctgc
cctttgtcttgcggagggtcaatgccgagctggttagctggatccagcaggacgatgggtctgtgcacaaatccatcaaccgttccctgatcgttgggctga
agatcagcactaagagcgtgggcccagacgagcgggaggatatacccccacacatacaataccagagggtcctcagaggagaggaggcctt
cacaaggcggaaccacctgaacaaactggccgagaaggaggagacagggatggccatcggtatccgtgtggccagagcatgaacatgggcag
```

tgactttgacgtctttgcccacatcaccaacaacaccgctgaggagtagctctgccgctcctgctctgtgcccgcaccgtcagctacaatgggatcttggg
gcccagagtgtggcaccaagtagctgtcaacctcaacctggagccttctctgagaagagcggtcctcttgcacacctatgagaaataccgtgactgcctt
acggagtgccaacctcatcaaggtgcgggccctcctgctggagccagttatcaacagctacgtgctggtgagaggacacctctacctggagaatccaga
aatcaagatccggatccttggggagcccaagcagaacagcaagctggtggtgaggtgtccctgcagaacccgctccctgtggccctggaaggctgc
accttactgtggagggggcgccgctgactgaggagcagaagacggtggagatcccagaccccggtggaggcaggggaggaagtaaggtgagaat
ggacctgtgccgctccacatggcgctccacaagctggtggtgaacttcgagagcgacaagctgaaggctgtgaagggttccggaatgtcatcattgg
ccccgcctaa

Амінокислотна послідовність TG2 людини:

MAEELVLERCDLELETNGRDHHTADLCREKLVVRRGQPFWLTLHFEGRNYEASVDSLTF
VVTGPAPSQEAGTKARFPLRDAVEEGDWTATVVDQQDCTLSLQLTPANAPIGLYRLSLE
ASTGYQGSSFLGHFILLFNAWCPADAVYLDSEERQEYVLTQQGFIYQGS AKFIKNIPW
NFGQFEDGILDICLILLDVNPKFLKNAGRDCSRRSSPVYVGRVVS GMVNCNDDQGVLLGR
WDNNYGDGVSPMSWIGSVDILRRWKNHGCRVKYGCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTN
YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGIEQGDKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQALDPT
PQEKSEGTYCCGPVPVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNADVVDWIQQDDGSVHKSINRSL
IVGLKISTKSVGRDEREDITHYKYPEGSSEEREAFTRANHLNKLAEKEETGMAMRIRVG
QSMNMGSDFDVFAHITNNTAEYVCRLLLCARTVSYNGILGPECGTKYLLNLNLEPFSEK
SVPLCILYEKYRDCLTESNLIKVRALLVEPVINSYLLAERDLYLENPEIKIRILGEPKQK
RKLVAEVS LQNPLPVALEGCTFTVEGAGLTEEKQTV EIPDPVEAGEEVKVRMDLLPLHMG
LHKL VVNFESDKLKAVKGFNRNIIIPA*

Нуклеотидна послідовність TG2 пацюка:

atggccgaggagctgaacctggagaggtgcgattggagatacaggccaatggcgtgatcacacacggccgacctgtgccaagagaaact
ggtgctgcggcgaggccagcgcttccggctgactgtacttcgagggccgtggtatgaggccagcgtggacagacttacattgtgacctgacccg
cccagatcccagtgagagggcagggaccaaggcccgcttctactgtctgacgatgtggaggaggatcctggtcagcctctgtgctggaccaacag
gacaatgtcctctcgtgcagctctgcaccccagccaatgtcctgttgccagtagccgctcagcctggagacttactggctaccaaggctccagcttc
atgctgggtcacttcatcctgtcttcaatgctggtgcccagcggatgacgtgtacctagattcagaggcggagcgccgggaatacgtcctcacacagc
agggcttcatctaccagggctctgtcaagttcatcaagagtgtccttgaacttgggcagtttgaggatgggacctggtgctgctgactgtgttggat
gtgaacccaagtctctgaaggaccgtagccgggactgtcacgacgcagcagcagctccatctatgtggccgctggtgagcggcatggtcaactgcaa
tgatgaccaggggtgtccttgggtgcgtgggacaacaattatggggacggtatcagtccttggcctggttggcagcgtggacattctgcggcgctgg
aaggaacacggctgtcagcaagtgaagtatggccagtgtcgtggtgttgcggcggtagcctgtcacagtgtcgtgctgcttggcatcctaccagagt
gtgaccaactacaactccgcccacgaccagaacagcaacctgtcctcagtagtacttccgaaacgagtagcgggagctggagagcaacaagagcga
gatgatctggaatttccactgtcgggtggagtctggatgaccaggccagacctaagccaggctatgaggggtggcaggccattgacccacacccg
aggagaagagcgaaggaacatactgtgtgcccagctcagtgccggccatcaaggagggtgacctgagcaccgaagtatgatgcgtccttctgttgg
ccgaggtcaacgctgatgtggtggactggatccggcagtcagatgggtctgtgctcaaatccatcaacaattccctggtcgtggggcagaagatcagca
ctaagagcgtgggcccgtgatgaccgggaggacatcacctatacctacaagtagccagagggtcccccagaggagagggaagtcttaccagagcc
aaccacctgaacaaactggcagagaaagaggagacaggggtggccatgccgagtgggggatggtatgagcttgggcaatgactttgacgtg
tttggccacatcggaacgacacctcgagagccgtgagtgccgctcctgctctgtgcccgcactgtcagctacaacggcggtgctggggcccgagtgt
ggcactgaggacatcaacctgacctggatccctactctgagaacagcatcccccttcgacacctacgagaagtacagcggttgcctgaccgagtca
aacctcatcaaggtgcggggtctcctgtcgagccagccgtaacagctacctgtggtgagagagatctctacctggagaatcctgaaatcaagatc
cgatcctgggggagcccaagcagaaccgcaactggtggtgaggtgtccctgaagaaccacttctgattccctgtatgactgtgtcttactgtgga
gggggctggcctgaccaaggaacagaagtctgtggaggtctcagaccctgtgccagcaggagatgcggtcaaggtgcgggtgacctgtcccgactg
atattggcctccacaagtgtggtggaactccagtgtgacaagctgaagtcggtcaagggttaccggaatatcatcatcgcccgccgctaag

Амінокислотна послідовність TG2 пацюка:

MAEELNLERCDLEIQANGRDHHTADLCQEKLVLRRGQRFRLTYFEGRGY EASVDRLTFG
AVTGPD PSEEAGTKARFSLSDVEEGSW SASVLDQQDNVLSLQLCTPANAPV GQYRLSLE
TSTGYQGSSFMLGHFILLFNAWCPADDVYLDSEAE RREYVLTQQGFIYQGS VKFIKSVPW
NFGQFEDGILDACLMLLDVNPKFLKDRSRDCSRRSSPIYVGRVVS GMVNCNDDQGVLLGR
WDNNYGDGISPMAWIGSVDILRRWKEHGCQVVKYGCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTN
YNSAHDQNSNLLIEYFRNEYGELESNKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQAIDPT
PQEKSEGTYCCGPVSVRAIKEGDLSTKYDASFVFAEVNADVVDWIRQSDGSVLKSINNSL
VVGKISTKSVGRDDREDITYTYKYPEGSPEEREVFTRANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG
DGMSLGNDKDFVFAHIGNDTSERECRLLLCARTVSYNGVLGPECGTEDINLTDPYSENS
IPLRILYEKYSGLTESNLIKVRGLLVEPAANSYLLAERDLYLENPEIKIRILGEPKQNR
KLVAEVS LKNPLSDSLYDCVFTVEGAGLTK EQKSVEVSDPV PAGDAVKVRVDLFTDIGL
HKL VVNFQCDKLKSVKGYRNIIIGA*X

Нуклеотидна послідовність TG2 миші:

atggcagaggagctgctcctggagaggtgtgattggagattcaggccaatggcgtgaccaccacacggccgacctatgccaagagaaactg
gtgctgcgtcgtggtcagcgcttccggctgactctgtacttcgagggccgtggtacgaggccagcgtggacagcctcagcttcggtgctgtgaccggcc
cagatcccagtgagagggcagggaccaaggcccgcttctactgtctgacaatgtggaggaggatcttggcagcctcagtgctggaccaacagga
caatgtcctctcgtacagctctgcaccccagccaatgtcctattggcctgtaccgtctcagcctagaggcttctactggctaccagggctccagcttgtg
ctgggccacttcatcctgctctacaatgctggtgccagccgatgatgtgtacctagactcagaggaggagcgacgggaatagtccttacgcaacag
ggcttcatctaccaaggctctgtcaagttcatcaagagtgtccttgaacttgggcagttcagggatggaatcctggatacctgctgcttggatat

gaacccaagttcctgaagaaccgtagtcgggactgctcacgcccagcagctcccatctatgtggccgctggtgagcgccatggtcaactgcaatg
atgaccaggggtgtgcttctggccgctgggacaacaactatgggatggtatcagctcccatggcctggattggcagtggtgacattctcgggcgtggaa
ggaacacggctgtcagcaagtgaagtacgggcagtgctgggtgttgcagcgggtggcctgcacagtgctgcgggtcctcgcatccctaccagagtgtg
gaccaactacaactccgcccacgaccagaacagcaacctgctcatcagacttccgaaatgagttcggggagctggagagcaacaagagcgaga
tgatctggaactccactgtggttgagtgctgtagtaccagggcagacctacagccgggctatgaggggtggcaggccattgacccacaccacag
gagaagagcgaagggacatactgtgtggccagctcagtgccagccatcaaggagggagacctgagtagcaagtagtgacccctcgtgtttgc
cgaggtcaacgctgatgtggtggactggatccggcaggaagatgggtctgtgctcaaatccatcaaccgttccttggtcgtgggacagaagatcagcac
taagagtgtggccgctgatgaccgggagacatcacctacataagtagccagaggggtcaccgagggagagaggaagtcttcaccaaggcca
accacctgaacaaactggcagagaaagaggagacaggggtggccatgcgcatccgagtgggggacagtagtgagcaggggaacgacttcgacgt
gtttgccacatcggaacgacacctcgagactcgagagtgtcgtctcctgctgtgcccgcactgtcagctacaacggggtgctggggcccgagtgt
ggcactgaggacatcaacctgacctggatccctactctgagaacagcatccacttcgaatcctctacgagaagtacagcgggtgcctgacagagtc
aaacctcatcaaggtgcggggccttctcatgaaccagctccaacagctacctgtggtgagagagatctctacctggagaatccgaaatcaagat
ccgggtcctgggagaacccaagcaaaaccgaaaactggtggctgaggtgtccctgaagaacccacttccgatccctgtatgactgcattctactgtg
gagggggtggtcctgaccaaggagcagaagtctgtggaagtctcagaccgggtgccagcgggcgatttggtcaaggcacgggtgcacctgtcccca
ctgatattggctccacaagctggtggtgaactccagtgtagaagctgaagtcggtgaaggggtaccggaatgttatcatcgcccgccgcta

Амінокислотна послідовність TG2 миші:

MAEELLERCDLEIQANGRDHHTADLCQEKLVLRRGQRFRLTYFEGRGY
EASVDSLTFGAVTGPDPEEAGTKARFSLSDNVEEGSWASVLDDQDNVL
SLQLCTPANAPIGLYRLSLEASTGYQGSSFVLGHFILLYNAWCPADDVYL
DSEERREYVLTQQGFIYQGSVKFIKSVPNWFGQFEDGILDTCLMLLDMN
PKFLKNRSRDCSRSSPIYVGRVVSAMVNCNDDQGVLLGRWDNNYGDGIS
PMAWIGSVDILRRWKEHGCQQVKYGGCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTN
YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGELESNKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPG
YEGWQAIDPTPQEKSEGTCCGPVSVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNAD
VVDWIRQEDGSVLKSINRSLVVGQKISTKSVGRDDREDITHYKYPEGSP
EEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVGDSMSMGNDFDVFAHIGNDTS
ETRECRLLLCARTVSYNGVLGPECGTEDINLTDPYSENSIPLRILYEKY
SGCLTESNLIKVRGLLIEPAANSYLLAERDLYLENPEIKIRVLGEPKQNR
KLVAEVSLLKNPLSDPLYDCIFTVEGAGLTKEQKSVEVSDPVPAGDLVKAR
VDLFPTDIGLHKLNVNFQCDKLKSVKGYRNVIIIPA

Автори даного винаходу одержали антитіла до TG2 шляхом імунізації мишей рекомбінантним білком, що включає амінокислоти 143-473 центральної ділянки TG2 людини. Гбридому піддавали скрінінгу на специфічність до TG2 і її інгібування будь-якими підходящими клонованими кандидатами. IgG був очищений з них для обчислення ефективності, і епітоп-мішені картирували шляхом скрінінга бібліотеки TG2 людини за допомогою фагового дисплея.

Даний підхід до одержання антитіл проти TG2 шляхом використання рекомбінантного центрального білка TG2 не був застосований раніше й неочікувано привів до виділення й характеристики антитіл TG2, що володіють високою селективністю до TG2 і показують сильні інгібіторні характеристики. Попередні спроби одержання антитіл до TG2 привели до виділення відносно неселективних антитіл, що перехресно реагують із іншими членами сімейства трансглутаминаз, і, отже, не є перспективними антитілами для клінічного застосування. Антитіла по даному винаходу, з іншого боку, є перспективними кандидатами для клінічних випробувань для захворювань, що загострюються в результаті активності TG2 або опосередкованих цієї активності.

Несподівано підхід по даному винаходу призвів до одержання значно більш ефективних антитіл, ніж отримані раніше. Не було ніякої гарантії, що можливо одержати антитіла, які є ефективними інгібіторами TG2 шляхом імунізації центральною ділянкою. Як зазначено вище, антитіла, що є ефективними інгібіторами, можуть не мати достатню специфічність до TG2, щоб ефективно застосовуватися в медицині. Неочікувано, що антитіла до дивергентних ділянок (зокрема, центральних ділянок, які дещо різняться між різними членами сімейства трансглутаминаз TG2) є ефективними й селективними інгібіторами TG2.

Не зв'язуючись якою-небудь теорією, автори винаходу вважають, що шляхом утворення антитіл до білка меншого розміру, що покриває тільки центральну ділянку, автори винаходу усувають не тільки бажані імунологічні епітопи, присутні на повнорозмірному білку, але також підсилюють націлювання на центральну ділянку. Очевидно, це збільшує різноманітність антитіл, доступних для відбору, і забезпечує більш широке покриття центральної ділянки.

Імунізація тільки центральною ділянкою TG2 видаляла більшу частину третинної структури ферменту (зокрема, два карбоксі-кінцевих домени типу бета-барель). Можливо, що деякі з епітопів, які, імовірно, менш доступні або імуногенні в межах повнорозмірної нативної молекули TG2, можуть являти собою більш привабливі епітопи із центральною ділянкою у форматі, розкритому в даному винаході. Антитіла, розкриті у даному винаході, розпізнавали лінійні епітопи (тобто пов'язані з TG2 на відновлюваному поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (ДСН-ПААГ)), тоді як 80% антитіл, які раніше виділили автори винаходу з використанням повнорозмірного TG2 у якості

імуногена, були конформаційно-залежними. Автори винаходу змогли показати, що рекомбінантний центральний домен зберігав ферментативну активність, і, таким чином, виділення інгібіторних антитіл було, імовірно, націлене на відкриття раніше менш переважних епітопів, локалізованих в активному центрі або поблизу його. Цікаво й неочікувано, що інгібіторні антитіла до TG2 утворювали шляхом імунізації центральною ділянкою, зважаючи на те, що рекомбінантний центральний білок міг не показати такі ж характеристики згортання, як повнорозмірний білок.

Каталітична центральна ділянка TG високо консервативна між членами сімейства TG і між видами. Це дозволяє припустити, що розробка не тільки специфічних низькомолекулярних інгібіторів, але також інгібіторів на основі антитіл, може бути технічно проблематична. Проте, у даному винаході запропоновані антитіла, що є значною мірою селективними. Те, що це можливо, може відображувати той факт, що в межах каталітичного домену TG2 є кілька ділянок, де існує деяка гетерогенність. У даних антитілах, отже, можна використовувати ці невеликі відмінності. Несподівана селективність даних антитіл може забезпечити розробку терапевтичних засобів, які можуть ефективно перешкоджати активності TG2 і, отже, забезпечувати потенційно ефективні терапевтичні методи лікування патологічних станів, що загострюються за рахунок активності TG2 або викликаних її активністю, де в цей час вибір терапії відсутній.

У якості порівняння, антитіла, розкриті в WO 2006/100679, які були отримані за допомогою рекомбінантної технології зі зразків від трьох дорослих пацієнтів із целіакією, що мають високі титри антитіл проти TG2, виявилися низькоефективними при тестуванні авторами даного винаходу (Приклад 2). Антитіла по даному винаходу були значно краще в порівнянні з антитілами по WO 2006/100679 стосовно селективності до TG2 і у відношенні інгібіторної активності. Наприклад, автори даного винаходу одержали Fab фрагмент антитіла по WO 2006/100679, застосовуваний в аналізах інгібування TG2 у такій же концентрації, як і антитіла по даному винаходу. Кількість Fab фрагментів у тестах перебувала у дворазовому молярному надлишку в порівнянні з антитілами по даному винаходу, але вони все-таки були нездатні викликати яке-небудь інгібування активності TG2. При тестуванні повнорозмірного антитіла по WO 2006/100679 на інгібування в стандартному аналізі включення путресцина, розробленому авторами винаходу, інгібування активності TG2 не було виявлено. Таким чином, способи по даному винаходу й антитіла, отримані цими способами, є вдосконаленими в порівнянні з розкритими раніше.

В «антитіло» автори винаходу включають по суті інтактні молекули антитіла, а також химерні антитіла, гуманізовані антитіла, людські антитіла (де щонайменше одна амінокислота мutowана відносно антитіл людини, що зустрічаються в природі), одностанцюжкові антитіла, біспецифічні антитіла, важкі ланцюги антитіл, легкі ланцюги антитіла, гомодімери й гетеродімери важких і/або легких ланцюгів антитіла, а також їх антигенсполучні фрагменти і їх похідні. У розуміння термінів «антитіло» і «його антигенсполучні фрагменти» автори винаходу також включають варіанти, злиття й похідні антитіл і їх антигенсполучних фрагментів.

Термін «антитіло» також включає всі класи антитіл, включаючи IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Таким чином, антитіло може являти собою молекулу IgG, таку як молекула IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. Краще антитіло за винаходом являє собою молекулу IgG або її антигенсполучний фрагмент або варіант, злиття або похідне. Бажано краще антитіло являє собою молекулу IgG2.

Антитіла, композиції, застосування й способи за винаходом включають варіанти, злиття й похідні певних антитіл і їх антигенсполучних фрагментів, а також злиття цих варіантів або похідних, за умови, що такі варіанти, злиття й похідні мали специфічність до TG2.

Оскільки антитіла і їх антигенсполучні фрагменти включають один або більш поліпептидних компонентів варіантів, злиття і похідних антитіла і його антигенсполучного фрагмента, як визначено в даному винаході, вони можуть бути отримані із застосуванням способів білкової інженерії й сайт-спрямованого мутагенезу, добре відомих у даній області техніки, використовуючи рекомбінантні поліпептиди (див., наприклад, кн. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edition, Sambrook & Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, включену в даний опис за допомогою посилання).

Таким чином, варіанти, злиття й похідні антитіла або його антигенсполучного фрагмента, як визначено в даному винаході, можуть бути отримані на основі поліпептидного компонента антитіла або його антигенсполучного фрагмента.

В «злиття» автори винаходу включають поліпептид, злитий з яким-небудь іншим поліпептидом. Наприклад, цей поліпептид може бути злитий з таким поліпептидом, як глутатіон-S-трансфераза (GST; від англ. "glutathione-s-transferase") або білок A, щоб полегшити очищення даного поліпептиду. Приклади таких злиттів добре відомі фахівцям у даній області техніки. Аналогічно, даний поліпептид може бути злитий з оліго-гістидиновою міткою, такою як His6, або з епітопом, розпізнаваним антитілом, таким як добре відомий епітоп Мус-tag. Злиття з будь-яким варіантом або похідним даного поліпептиду також включені в обсяг винаходу. Зрозуміло, що перевага віддається злиттям (або їх варіантам або похідним), що зберігають бажані властивості, такі як єднальна специфічність до TG2.

Злиття може включати додаткову ділянку або складатися із цієї ділянки, яка надає бажану ознаку даному поліпептидові; наприклад, ця ділянка може бути корисна при виявленні або виділенні

поліпептиду або може стимулювати захоплення поліпептиду клітиною. Ця ділянка може являти собою, наприклад, біотинове угруповання, радіоактивне угруповання, флуоресцентне угруповання, наприклад, низькомолекулярний флуорофор або флуорофор, що являє собою зелений флуоресцентний білок (GFP; від англ. "green fluorescent protein"), як добре відомо фахівцям у даній області техніки. Це угруповання може являти собою імуногенну мітку, наприклад, Мус-мітку (Мус-tag), як відомо фахівцям у даній області техніки, або може являти собою ліпофільну молекулу або поліпептидний домен, здатні стимулювати захоплення поліпептиду клітиною, як відомо фахівцям у даній області техніки.

«Варіанти» даного поліпептиду автори винаходу відносять до поліпептиду, в одному або більш положень якого перебувають інсерції, делеції й/або заміни амінокислот, або консервативні, або неконсервативні, за умови, що результатом таких змін є білок, основні властивості якого, наприклад - властивості, що зв'язують, термостабільність, активність у певному діапазоні рН (рН-стабільність) значно не змінені. «Значно» у даному контексті означає, що фахівець у даній області техніки вважав би, що властивості варіанта можуть все-таки відрізнятись, але неочевидно, від властивостей вихідного білка. Таким чином, автори винаходу включають варіанти поліпептиду, де такі зміни по суті не змінюють активність даного поліпептиду. Зокрема, автори винаходу включають варіанти поліпептиду, де такі зміни по суті не змінюють єднальну специфічність до TG2.

Під «консервативними замінами» мають на увазі комбінації, такі як Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg і PHe, Tyr.

Такі варіанти можуть бути отримані при використанні способів білкової інженерії й сайт-спрямованого мутагенезу.

Варіант поліпептиду може мати амінокислотну послідовність, що має щонайменше 75% ідентичності з однієї або більш амінокислотних послідовностей, наведених у даному винаході, наприклад, щонайменше 80%, щонайменше 90%, щонайменше 95%, щонайменше 96%, щонайменше 97%, щонайменше 98% або щонайменше 99% ідентичністю однієї або більш із амінокислотних послідовностей, зазначених у даному винаході.

Відсоток ідентичності послідовності між двома поліпептидами може бути визначений з використанням підходящих комп'ютерних програм, наприклад, програми GAP University of Wisconsin Genetic Computing Group, і зрозуміло, що відсоток ідентичності обчислюють відносно поліпептидів, послідовностей яких оптимально вирівняні.

Вирівнювання можна альтернативно здійснити, використовуючи програму Clustal W (як описано в статті Thompson et al., 1994, Nucl. Acid Res. 22:4673-4680, включеної в даний опис за допомогою посилання).

Використовувані параметри можуть бути наступними:

- Параметри швидкого попарного вирівнювання: розмір ділянки максимального збігу (K-tuple(word)): 1, розмір вікна: 5, штраф на геп: 3, число верхніх діагоналей: 5. Спосіб оцінки: відсоток х.

- Параметри множинного вирівнювання: штраф на відкриття гепа: 10, штраф на подовження гепа: 0,05.

- Матриця оцінки: BLOSUM.

Альтернативно для визначення локальних вирівнювань послідовності можна використовувати програму BESTFIT.

Антитіло, антигенсполучний фрагмент, варіант, злиття або похідна, використовувані в способах або застосуваннях за винаходом, можуть включати одну або більш модифікованих або дериватизованих амінокислот або складатися з однієї або більш модифікованих або дериватизованих амінокислот.

Хімічні похідні однієї або більш амінокислот можуть бути отримані шляхом взаємодії функціональної бічної групи. Такі дериватизовані молекули включають, наприклад, молекули, у яких вільні аміногрупи дериватизовані з утворенням гідрохлоридів аміну, пара-толуолсульфонільних груп, карбоксібенозоксігруп, трет-бутилоксікарбонільних груп, хлорацетильних груп або формільних груп. Вільні карбоксильні групи можуть бути дериватизовані з утворенням солей, метилових і етилових ефірів або інших типів складних ефірів і гідразидів. Вільні гідроксильні групи можуть бути дериватизовані з утворенням О-ацильних або О-алкільних похідних. У якості хімічних похідних також включені пептиди, що містять похідні природних амінокислот із двадцяти стандартних амінокислот. Наприклад: 4-гідроксіпролін може замінити пролін; 5-гідроксілізін може замінити лізін; 3-метилгістидин може замінити гістидин; гомосерин може замінити серин, і орнітин може замінити лізін. Похідні також включають пептиди, що містять одне або більше з додавань або делецій, якщо зберігається потрібна активність. Іншими включеними модифікаціями є амідування, аміно-кінцеве ацилювання (наприклад, ацетилювання або амідування тіогліколевої кислоти), кінцеве карбоксіамідування (наприклад, аміаком або метиламіном) і подібні кінцеві модифікації.

Крім того, фахівцям у даній області техніки зрозуміло, що можуть бути також корисні пептидоміметичні сполуки. Таким чином, в «поліпептид» автори винаходу включають пептидоміметичні сполуки, здатні зв'язуватися з епітопом усередині центральної ділянки TG2. Термін

«пептидоміметичний» стосується до сполуки, що імітує конформацію й бажані ознаки конкретного пептиду як терапевтичного агента.

Наприклад, даний поліпептид включає не тільки молекули, у яких амінокислотні залишки з'єднані пептидними зв'язками (-CO-NH-), але також молекули, у яких пептидний зв'язок є зверненим. Такі ретро-інверсо-пептидоміметики можуть бути отримані з використанням способів, відомих в даній області техніки, наприклад, таких, як розкрито в статті Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237, включений в даний винахід за допомогою посилання. Даний підхід включає одержання псевдопептидів, що містять зміни, у які залучений каркас, і не залучена орієнтація бічних ланцюгів. Ретро-інверсо-пептиди, що містять зв'язки NH-CO замість пептидних зв'язків CO-NH, значно більш стійкі до протеолізу. Альтернативно поліпептид може являти собою пептидоміметичні сполуки, де один або більш із амінокислотних залишків зв'язані зв'язком - γ -(CH₂NH)- замість традиційного амідного зв'язку.

У наступній альтернативі пептидний зв'язок може взагалі не вимагатися за умови використання підходящого лінкерного угруповання, що зберігає проміжок між атомами вуглецю амінокислотних залишків; може бути кращим, щоб це лінкерне угруповання мало по суті такий же розподіл заряду й по суті таку ж площинність, як пептидний зв'язок.

Зрозуміло, що даний поліпептид для зручності може бути блокований на його N- або C-кінці, щоб сприяти зниженню схильності до екзо-протеолітичного розщеплення.

Для модифікації пептидів ссавців використовують різноманітні некодовані або модифіковані амінокислоти, такі як D-амінокислоти й N-метиламінокислоти. Крім того, передбачувана біологічно активна конформація може бути стабілізована ковалентною модифікацією, такою як циклізація, або включенням лактаму або інших типів місткового зв'язку, наприклад, див. статті: Veber et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2636 і Thursell et al., 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 111:166, включені в даний опис за допомогою посилання.

Загальним предметом серед багатьох стратегій синтезу є введення якого-небудь циклічного угруповання в каркас на основі пептиду. Це циклічне угруповання обмежує конформаційний простір пептидної структури, і це часто приводить у результаті до підвищеної специфічності пептиду до конкретного біологічного рецептора. Додаткова перевага даної стратегії складається в тому, що введення циклічного угруповання в пептид може також привести в результаті до пептиду, що має знижену чутливість до клітинних пептидаз.

Таким чином, ілюстративні поліпептиди, корисні в способах і застосуваннях винаходу, включають амінокислоти з кінцевим цистеїном або складаються з них. Такий поліпептид може існувати в гетеродітній циклічній формі за рахунок утворення дисульфідної зв'язки меркаптидних груп у кінцевих амінокислотах, що представляють собою цистеїн, або в гомодітній формі за рахунок утворення амідної пептидної зв'язки між кінцевими амінокислотами. Як зазначено вище, циклізація низькомолекулярних пептидів за допомогою дисульфідних або амідних зв'язків між N- і C-кінцевими цистеїнами може дати можливість подолати проблеми специфічності й часу напіввиведення, іноді спостережувані для лінійних пептидів, за рахунок зменшення протеолізу, а також збільшення жорсткості структури, що може привести до утворення сполук більш високої специфічності. Поліпептиди, замкнені в цикл за рахунок дисульфідних зв'язків, мають вільні аміно- і карбокси-кінці, які все-таки можуть бути чутливі до протеолітичного розщеплення, тоді як пептиди, замкнені в цикл амідної зв'язки між N-кінцевим аміном і C-кінцевим карбоксилом, таким чином, більше не містять вільні аміно- або карбокси-кінці. Таким чином, пептиди можуть бути зв'язані або C-N зв'язком, або дисульфідним зв'язком.

Даний винахід жодним чином не обмежений способом циклізації пептидів, але включає пептиди, циклічна структура яких може бути досягнута за рахунок будь-якого підходящого способу синтезу. Так, гетеродітні зв'язки можуть включати, але не обмежені ними, утворення за допомогою дисульфідних, алкіленових або сульфідних місткових зв'язків. Способи синтезу циклічних гомодітних пептидів і циклічних гетеродітних пептидів, включаючи дисульфідні, сульфідні й алкіленові місткові зв'язки, розкриті в патенті US 5643872, включеному в даний винахід за допомогою посилання. Інші приклади способів циклізації обговорені й розкриті в патенті US 6008058, включеному в даний винахід за допомогою посилання.

Наступним підходом до синтезу циклічних стабілізованих пептидоміметичних сполук є метатезіс із замиканням циклу (RCM; від англ. "ring-closing metathesis"). Даний спосіб включає стадії синтезу пептидного попередника й приведення його в контакт із каталізатором RCM з утворенням конформаційно обмеженого пептиду. Підходящі пептидні попередники можуть містити дві або більш ненасичених C-C зв'язків. Цей спосіб може бути виконаний, використовуючи методи твердофазного пептидного синтезу. У даному втіленні винаходу попередник, пов'язаний із твердим носієм, приводять у контакт із каталізатором RCM, а потім продукт відщеплюють від твердого носія з утворенням конформаційно обмеженого пептиду.

Інший підхід, описаний у кн. D. H. Rich in Protease Inhibitors, Barrett and Selveson, eds., Elsevier (1986), включений в даний винахід за допомогою посилання, призначений для розробки пептидоміметиків за допомогою застосування концепції аналога перехідного стану в схемі інгібітору

ферменту. Наприклад, відомо, що вторинний спирт сталініту імітує тетраедричний перехідний стан амідної зв'язки субстрату пепсину, що розщеплюється.

На закінчення, кінцеві модифікації корисні, як добре відомо, для зниження чутливості до розщеплення протеїназами й, отже, для продовження періоду напіввиведення пептидів у розчинах, зокрема, у біологічних рідинах, де можуть бути присутнім протеази. Циклізація поліпептиду також є корисною модифікацією у зв'язку з утворенням стабільних структур у результаті циклізації, а також у світлі біологічних активностей, спостережуваних для циклічних пептидів.

Таким чином, в одному втіленні винаходу поліпептид є циклічним. Проте, в альтернативному втіленні винаходу поліпептид є лінійним.

Під виразом «селективно зв'язується з епітопом усередині центральної ділянки TG2» автори винаходу мають на увазі, що антитіло або його антигенсполучний фрагмент здатні селективно зв'язуватися з епітопом у центральній ділянці TG2. У вираз «здатний селективно зв'язуватися» автори винаходу включають такі єднальні угруповання, утворені від антитіла, які зв'язуються із центральною ділянкою TG2 щонайменше в 10 раз сильніше, чим з іншими білками; наприклад, щонайменше в 50 разів сильніше або щонайменше в 100 раз сильніше. Це єднальне угруповання може мати здатність до селективного зв'язування з епітопом у центральній ділянці TG2 у фізіологічних умовах, наприклад, *in vivo*.

Така єднальна специфічність може бути визначена способами, добре відомими в даній області техніки, такими як твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA), імуогістохімія, імуопреципітація, Вестерн-Блоттінг і проточна цитометрія, з використанням трансфікованих клітин, що експресують TG2 або центральну ділянку TG2 або його фрагмент. Підходящі способи для виміру відносних сил зв'язування включають імуологічні аналізи, наприклад, де угруповання, що зв'язує, являє собою антитіло (див. кн. Harlow & Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, включену в даний винахід за допомогою посилання). Альтернативне зв'язування можна оцінювати, використовуючи конкурентні аналізи або використовуючи аналіз Biacore® (Biacore International AB, Sweden).

Бажано, щоб антитіло або антигенсполучний фрагмент за винаходом зв'язувалися винятково з TG2.

Фахівцям у даній області техніки зрозуміло, що єднальну специфічність антитіла або його антигенсполучного фрагмента надає присутність ділянок визначення комплементарності (CDR; від англ. "complementarity determining regions") усередині варіабельних областей складених важких і легких ланцюгів. Як обговорюється нижче, в особливо кращому втіленні антитіл і їх антигенсполучних фрагментів, визначених у даному винаході специфічність, що зв'язує до TG2 надає присутність одного або більше ідентифікованих ділянок CDR. Наприклад, послідовності варіабельної області легкого ланцюга (VL; variable light chain) і варіабельної області важкого ланцюга (VH; variable heavy chain) антитіла AB-1, які можуть включати послідовності CDR або складатися з них, включають наступні послідовності: KASQDINSYLT, RTNRLFD, LQYDDFPYT, SSAMS, TISVGGGKTYYPDSVKG і LISLY. У наступному прикладі послідовності VL і VH антитіла BB-7, які можуть включати послідовності CDR або складатися з них, включають наступні послідовності: KASQDINSYLT, LTNRLMD, LQYVDFPYT, SSAMS, TISSGGRSTYYPDSVKG і LISPY. Послідовності VL і VH антитіла DC-1, які можуть включати послідовності CDR або складатися з них, включають наступні послідовності: KASQDINSYLT, LVNRLVD, LQYDDFPYT, THAMS, TISSGGRSTYYPDSVKG і LISTY. Бажано, щоб антитіла і їх антигенсполучні фрагменти, визначені в даному винаході, включали послідовності CDR або CDR і фланкуючі послідовності або складалися з них, як визначено в таблиці 24A. Найбільше Бажано, щоб антитіла і їх антигенсполучні фрагменти, визначені в даному винаході, включали послідовності CDR або CDR і фланкуючі послідовності ілюстративного антитіла AB-1, або BB-7, або DC-1 (як визначено, наприклад, у таблиці 24A), або складалися із цих послідовностей.

Бажано, щоб антитіло або його антигенсполучний фрагмент зберігали єднальну специфічність до TG2 вихідного антитіла. Під виразом «зберігають єднальну специфічність» автори винаходу мають на увазі, що антитіло або його антигенсполучний фрагмент здатні конкурувати за зв'язування TG2 з ілюстративними антитілами за винаходом, наприклад, AB-1, AG-1, AG-9, AH-1, AH-3, BB-7, DC-1, EH-6, JE-12, IA-12, DF-4, DH-2, DD-6 і/або DD-9 (див. супровідні Приклади). Наприклад, антитіло або його антигенсполучний фрагмент може зв'язуватися з тим же епітопом TG2, що й антитіло, що включає наступні послідовності: KASQDINSYLT, RTNRLFD, LQYDDFPYT, SSAMS, TISVGGGKTYYPDSVKG і LISLY.

Під «епітопом» у даному винаході слід розуміти сайт молекули, з яким зв'язується антитіло, тобто молекулярну ділянку антигену. Епітоп може являти собою лінійний епітоп, який визначається, наприклад, амінокислотною послідовністю, тобто первинною структурою, або тривимірний епітоп, обумовлений вторинною структурою, наприклад, згортанням пептидного ланцюга в бета-шар або альфа-спіраль, або третинною структурою, наприклад, шляхом, яким згорнуті або впорядковані спіралі або шари, з одержанням тривимірної структури антигену.

Способи визначення того, чи має антитіло, що тестується, здатністю до конкуренції за зв'язування

із другим антитілом, добре відомі в даній області техніки (такі як, наприклад, методи сендвіч-аналізу ELISA або сендвіч-аналізу ELISA з інвертованою послідовністю додавання реагентів) і описані, наприклад, у кн. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow & Lane (1988, CSHL, NY, ISBN 0-87969-314-2), включений в даний винахід за допомогою посилання.

Антитіло або його антигенсполучний фрагмент, що володіють єднальною специфічністю до епітопу в центральній ділянці TG2, можуть також зберігати одну або більше із тих же біологічних властивостей, що й вихідне антитіло (таке як ілюстративні антитіла, запропоновані в Прикладах).

Як пояснено вище, TG2 являє собою кальцій-залежний багатофункціональний білок, що каталізує утворення Nε-(γ-глутаміл)лізин-ізо-діпептидних зв'язків між залишками лізину й глутаміну. TG2 містить N-кінцевий домен типу бета-сендвіч, що містить сайти зв'язування (наприклад, фібрoneктин) і послідовності, що вимагаються для експорту ферменту. Цей домен зв'язується з каталітичним центральним доменом. До центру домени перебуває каталітична тріада, що складається з Cys 277, Asp 358 і His 355, і додатково кілька гаданих сайтів зв'язування кальцію. Цей домен зв'язується із третім доменом, доменом 1 типу бета-барель, де втримується ГТФ-єднальний сайт, що надає ферменту ГТФазну активність. Домен 1 типу бета-барель також містить сайт зв'язування інтегрину, використовуваний при клітинній адгезії. Домен 1 типу бета-барель паралельно із четвертим доменом TG2, доменом 2 типу бета-барель, залучений у конформаційну зміну TG2, що потрібна для його активації. При високому змісті кальцію й низькому змісті ГТФ в оточенні складчасті домени 1 і 2 відхиляються вниз від закритої й складчастої неактивної форми, що надає TG2 лінійну структуру, відкриваючи каталітичну центральну ділянку, що дає можливість активації (Pinkas et al (2007) *Plos Biol.* Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. 5(12): e327).

У вираз «центральна ділянка трансглютамінази типу 2 (TG2)» автори винаходу включають ділянку TG2, що містить описану вище каталітичну тріаду, крім домену типу бета-сендвіч і домени 1 і 2 типу бета-барель. Бажано центральна ділянка включає амінокислоти 143-473 TG2 людини або його фрагмента або складається з них.

Амінокислоти 143-473 TG2 людини становлять наступну послідовність:

```
CPDAVYLDSEERQEVVLTQQGFIYQGS AKFIKNIPWNFGQFEDGILDICLILLDVNPKFLKNAGRDCSR  
RSSPVYVGRVSGMVNCDNDQGVLLGRWDNNYGDGVSPMSWIGSVDILRRWKNHGCQRVKYGGCWVFA  
AVACTVLRCLGIPTRVVTNYSN AHDQNSNLLIEYFRNEFGSEIQGDKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYE  
GWQALDPTPQEKSEGTYYCCGPVPVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNADVVDWIQQDDGSVHKSINRSLIVG  
LKISTKSVGRDEREDITHYKYPEGSSSEEREAFTTRANHLNKLAEKEETGM
```

Таким чином, у втіленні винаходу центральна ділянка може складатися з амінокислот 143-473 TG2 людини. У даному втіленні винаходу епітоп антитіла за винаходом може, отже, являти собою будь-який епітоп у межах ділянки, визначеного амінокислотами 143-473 TG2 людини. Таким чином, епітоп може являти собою фрагмент даної послідовності або може складатися з різних амінокислотних залишків у межах даного фрагмента, які можуть не примикати одне до одного в первинній амінокислотній структурі, але локалізовані разом один з одним у вторинній, третинній або навіть четвертинній структурі білка, як повинне бути зрозуміло фахівцям у даній області техніки.

У втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може селективно зв'язуватися з усією ділянкою або із частиною ділянки, що містить амінокислоти 304-326 TG2 людини. Дана ділянка (амінокислоти 304-326 TG2 людини) позначена як група 1 на фіг. 5 і включає амінокислотну послідовність: AHDQNSNLLIEYFRNEFGSEIQGD.

У наступному втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може селективно зв'язуватися з усією ділянкою або із частиною ділянки, що містить амінокислоти 351-365 TG2 людини. Дана ділянка (амінокислоти 351-365 TG2 людини) позначена як група 2 на фіг. 5 і включає амінокислотну послідовність: YEGWQALDPTPQEKs.

У наступному втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може селективно зв'язуватися з усією ділянкою або із частиною ділянки, що містить амінокислоти 450-467 TG2 людини. Дана ділянка (амінокислоти 450-467 TG2 людини) позначена як група 3 на фіг. 5 і включає амінокислотну послідовність: SEEREAFTTRANHLNKLAE.

У кращому втіленні будь-якого аспекту винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент інгібує активність TG2, наприклад, активність TG2 людини.

У втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може включати одну або більш із наступних амінокислотних послідовностей:

```
KASQDINSYLT; i/або  
RTNRLFD; i/або  
LQYDDFPYT; i/або  
SSAMS; i/або  
TISVGGGKTYYPDSVKG; i/або  
LISLY.
```

Антитіло або його антигенсполучний фрагмент за винаходом може включати одну або більш із наступних амінокислотних послідовностей:

TCKASQDINSYLTWF; i/або
TLIYRTNRLFDGVP або TLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; i/або
YCLQYDDFPYTFG; i/або
FTLSSSAMSWSVR або CXAXXFTLSSSAMSWSVR; i/або
WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR
або WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRXXXXXL; i/або
YCAKLISLYWG, де X являє собою будь-яку амінокислоту.

Уважають, що послідовності безпосередньо попередніх втілень винаходу включають ділянки визначення комплементарності варіабельних областей легкого й важкого ланцюга ілюстративного антитіла AB-1 (див. Приклад 1) і деяких зазначених гуманізованих варіантів антитіла AB-1. У наступному втіленні винаходу антитіло може включати наступну амінокислотну послідовність:

KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXRTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT; або KASQDINSYLTXXX; або RTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXXF; або FXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT, де X являє собою будь-яку амінокислоту.

У наступному втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може включати амінокислотну послідовність:

TCKASQDINSYLTWF або TCKASQDINSYLTWY; i/або
LLIYRTNRLFDGVP або SLIYRTNRLFDGVP або LLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF або SLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; i/або
YCLQYDDFPYTFG; i/або
FTFSSSAMSWSVR або CXAXXFTFSSSAMSWSVR; i/або
WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR або WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRXXXXXL; i/або
YCAKLISLYWG, де X являє собою будь-яку амінокислоту.

Таким чином, у втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає наступні послідовності: KASQDINSYLT; i RTNRLFD; i LQYDDFPYT.

У наступному втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає наступні послідовності: SSAMS; i TISVGGGKTYYPDSVKG; i LISLY.

У втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність: DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGSPKTLIYRTNRLFDGVP SRFSGSGSGQDFF LTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK або DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGSPKTLIYRTNRLFDGVP SRFSGSGSGQDFF LTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK.

Ці варіабельні області легкого ланцюга відповідають областям, що перебувають в ілюстративному антитілі AB-1 (фіг. 7 і 18).

Альтернативне антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність:

EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGSPKTLIYRTNRLFDGVP SRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (AB-1_VK) або DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGSPKTLIYRTNRLFDGVP SRFSGSGSGQDFF LTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (AB-1_VK1).

В особливо кращому втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність:

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWYQKPKGKAPKLLIYRTNRLFDGVP SRFSGSGSGTDFFFTISLQPEDFGTYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (hAB-1_RKE); або DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKAPKSLIYRTNRLFDGVP SRFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGGGKVEIK (hAB-1_RKJ).

Ці послідовності являють собою гуманізовані варіанти послідовностей легкого ланцюга AB-1, наведених вище.

У втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність:

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS або EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGK.

Ці варіабельні області важкого ланцюга відповідають областям, що перебувають в ілюстративному антитілі AB-1 (фіг. 7 і 18).

Альтернативне антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність:

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGR
FTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (AB-1_VH).

В особливо кращому втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISVGGGKTYYPDSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (hAB-1_RHA).

Дана послідовність являє собою гуманізований варіант послідовності важкого ланцюга AB-1, наведеної вище.

Таким чином, розглянуте, що у втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати наступні ділянки:

i) щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність:

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGQ
DFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK

або DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGQ
DFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK, або

EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGQD
FFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (AB-1_VK), або

DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGQDFF
LTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (AB-1_VK1), або

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFF
TISLQPEDFGTYYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (hAB-1_RKE), або

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFF
LTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGGGKVEIK (hAB-1_RKJ); и

ii) щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність:

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGRF
TISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS або

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTIS
RDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS, або

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGR
FTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (AB-1_VH), або

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTI
SRDNKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (hAB-1_RHA).

У втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може включати одну з наступних амінокислотних послідовностей:

KASQDINSYLT; i/або

LTNRLMD; i/або

LQYVDFPYT; i/або

SSAMS; i/або

TISGGRSTYYPDSVKG; i/або

LISPY.

Уважають, що послідовності безпосередньо попередніх втілень винаходу включають ділянки визначення комплементарності варіабельних областей легкого й важкого ланцюга ілюстративного антитіла BB-7 (див. фіг. 19). У наступному втіленні антитіло може включати наступну амінокислотну послідовність:

KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXLTNRLMDXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXFXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
FPYT; або KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXFX; або

LTNRLMDXXXXXXXXXXXXXXXXXFX; або FXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXLTQYVDFPYT, де X являє собою будь-яку амінокислоту.

Таким чином, у втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає наступні послідовності: KASQDINSYLT; i LTNRLMD; i LQYVDFPYT.

У наступному втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає наступні послідовності: SSAMS; i TISGGRSTYYPDSVKG; i LISPY.

У втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність

AIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLMDGVPSRFSGSGSGQE
FLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGKLEIK.

Дана варіабельна область легкого ланцюга відповідає області, що перебуває в ілюстративному антитілі BB-7 (фіг. 19).

У втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність:
AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGIIFSSSAMSWSVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPD SVKGRFTVS
RDSAKNTLYLQMDSLRSEDIAIYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS.

Дана варіабельна область важкого ланцюга відповідає області, що перебуває в ілюстративному антитілі BB-7 (фіг. 19).

Таким чином, розглянуте, що у втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати наступні ділянки:

i) щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність

AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLMDGVPSRFSGSGSGQE
FLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGTTKLEIK; i

ii) щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність

AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGIIFSSSAMSWSVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPD SVKGRFT
VSRDSAKNTLYLQMDSLRSEDIAIYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS.

Далі розглянуте, що у втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати наступні ділянки:

i) щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLTNRLMDGVPSRFSGSGSGT
DFFLTISLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGGGTTKVEIK або
DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYLTNRLMDGVPSRFSGSGSGQEFL
LTISLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGGGTTKVEIK; i/або

ii) щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISSGGRSTYYPD SVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS або
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVATISSGGRSTYYPD SVKGRFTVS
RDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS.

Ці послідовності відповідають гуманізованим варіантам антитіла BB-7 (див. таблиці 23, 24 і 24A).

У втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може включати одну або більш із наступних амінокислотних послідовностей:

KASQDINSYLT; i/або

LVNRLVD; i/або

LQYDDFPYT i/або

THAMS; i/або

TISSGGRSTYYPD SVKG; i/або

LISTY.

Уважають, що послідовності безпосередньо попередніх втілень винаходу включають ділянки визначення комплементарності варіабельних областей легкого й важкого ланцюга ілюстративного антитіла DC-1 (див. фіг. 20). У наступному втіленні винаходу антитіло може включати наступну амінокислотну послідовність:

KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXLVNRLVDXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
LQYDDFPYT або KASQDINSYLTXXX
LVNRLVDXXXXXXXXXXXXXXXXXA; або AXXXXXXXXXXXXXXXXX
LQYDDFPYT, де X являє собою будь-яку амінокислоту.

Таким чином, у втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає наступні послідовності: KASQDINSYLT; i LVNRLVD; i LQYDDFPYT.

У наступному втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає наступні послідовності: THAMS; i TISSGGRSTYYPD SVKG; i LISTY.

У втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність:

DITMTQSPSSIIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDY
ALTISLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTTFGGGTTKLEIK.

Дана варіабельна область легкого ланцюга відповідає області, що перебуває в ілюстративному

антитілі DC-1 (фіг. 20).

У втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність:

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSTHAMSWSVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPD SVKGRF
TISRDNVKNLTLYLQLSSLRSED TAVYFCARLISTYWGQGTTLT VSS.

Дана варіабельна область важкого ланцюга відповідає області, що перебуває в ілюстративному антитілі DC-1 (фіг. 20).

Таким чином, розглянуте, що у втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати наступні ділянки:

i) щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність

DITMTQSPSSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDY
ALTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGG TKLEIK; i

ii) щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSTHAMSWSVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPD SVKGRF
TISRDNVKNLTLYLQLSSLRSED TAVYFCARLISTYWGQGTTLT VSS.

Далі розглянуте, що у втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати наступні ділянки:

i) щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGTD
FFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGGG TKVEIK або
DITMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKILIYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYAL
TISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGGG TKVEIK; i/або

ii) щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISSGGRSTYYPD SVKGR
FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISTYWGQGT LTVSS або
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMSWSVRQAPGKGLEWVATISSGGRSTYYPD SVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLISTYWGQGT LTVSS.

Ці послідовності відповідають гуманізованим варіантам DC-1, представленим у таблицях 23, 24 і 24A.

У втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може включати одну з наступних амінокислотних послідовностей:

KASQDINSYLT; i/або

XXNRLXD; i/або

LQYXDFPYT; i/або

XXAMS; i/або

TISXGGXSTYYPD SVKG; i/або

LISXY, де X являє собою будь-яку амінокислоту.

У втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може включати одну або більш із наступних амінокислотних послідовностей:

(K/Q/R)ASQ(D/G)I(N/S/R)(S/N)YL(T/N/A); i/або

(R/L/V/D/A)(T/V/A)(N/S)(R/N)L(F/M/V/E/Q)(D/T/S); i/або

(L/Q)Q(Y/H)(D/V/N)(D/T)(F/Y)P(Y/L/W)T; i/або

(S/T)(S/H/Y)AMS; i/або

(T/A)IS(V/S/G)(G/S)G(G/R)(K/S)TYY(P/A)DSVKG; i/або

(L/D)(I/G)(S/G)(L/P/T/V)Y.

У наступному втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність:

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSV DMYWYQQKPGSSPRLIYDTSNLASGV PVRFSGSGSGTS
YSLTISRMGAEDAATYYCQQWNSSPLTFGAGTKLELK.

Дана варіабельна область легкого ланцюга відповідає області, що перебуває в ілюстративному антитілі DD-9 (фіг. 25).

У втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність:

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSRI
TISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPFAFWGQGT LTVSA.

Дана варіабельна область важкого ланцюга відповідає області, що перебуває в ілюстративному антитілі DD-9 (фіг. 25).

Таким чином, розглянуте, що у втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати наступні ділянки:

i) щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSSVDYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTS YSLTISRMEAEADAATYYCQQWNSSPLTFGAGTKLELK; i

ii) щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRI TISKDSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPFAFWGQGLTVTVSA.

У наступному втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність:

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTS YSLTISRMEAEADAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK.

Дана варіабельна область легкого ланцюга відповідає області, що перебуває в ілюстративному антитілі DH-2 (фіг. 26).

У втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRL TISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYWGQGLTVTVSA.

Дана варіабельна область важкого ланцюга відповідає області, що перебуває в ілюстративному антитілі DH-2 (фіг. 26).

Таким чином, розглянуте, що у втіленні будь-якого аспекту даного винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати наступні ділянки:

i) щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTS YSLTISRMEAEADAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK; i

ii) щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRL TISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYWGQGLTVTVSA.

У втіленні будь-якого аспекту винаходу розглянуте, що антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати наступні ділянки:

i) щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, що відповідає кожній з послідовностей VK, наведених на кожній з фіг. 18-28; i/або

ii) щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, що відповідає кожній з послідовностей VH, наведених на кожній з фіг. 18-28, або її фрагмент, варіант або похідне.

Як зазначено вище, розглянуте, що антитіло або антигенсполучний фрагмент попередніх втілень винаходу може включати амінокислотну послідовність, що володіє щонайменше 75% ідентичністю однієї або більше із наведених вище амінокислотних послідовностей, наприклад, щонайменше 80%, щонайменше 90%, щонайменше 95%, щонайменше 96%, щонайменше 97%, щонайменше 98% або щонайменше 99% ідентичністю однієї або більш із амінокислотних послідовностей, зазначених вище. Також розглянуте, що антитіло або антигенсполучний фрагмент може містити аж до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більш інсерцій, делецій, консервативних замін i/або неконсервативних замін.

У другому аспекті у винаході запропоноване антитіло або його антигенсполучний фрагмент, що включають одну або більш із наступних амінокислотних послідовностей:

KASQDINSYLT; i/або

XXNRLXD; i/або

LQYXDFPYT; i/або

XXAMS; i/або

TISXGGXXTYYPDSVKG; i/або

LISXY, де X являє собою будь-яку амінокислоту.

У втіленні винаходу запропоноване антитіло або його антигенсполучний фрагмент, що включають одну або більш із наступних амінокислотних послідовностей:

(K/Q/R)ASQ(D/G)I(N/S/R)(S/N)YL(T/N/A); i/або

(R/L/V/D/A)(T/V/A)(N/S)(R/N)L(F/M/V/E/Q)(D/T/S); i/або

(L/Q)Q(Y/H)(D/V/N)(D/T)(F/Y)P(Y/L/W)T; i/або
(S/T)(S/H/Y)AMS; i/або
(T/A)IS(V/S/G)(G/S)G(G/R)(K/S)TTY(P/A)DSVKG; i/або
(L/D)(I/G)(S/G)(L/P/T/V)Y.

У втіленні винаходу запропоноване антитіло або його антигенсполучний фрагмент, що включають одну або більш із наступних амінокислотних послідовностей:

KASQDINSYLT; i/або
RTNRLFD; i/або
LQYDDFPYT; i/або
SSAMS; i/або
TISVGGGKTYYPDSVKG; i/або
LISLY.

У втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент другого аспекту може включати одну або більш із наступних амінокислотних послідовностей:

TCKASQDINSYLTWF; i/або
TLIYRTNRLFDGVP або TLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; i/або
YCLQYDDFPYTFG; i/або
FTLSSSAMS WVR або CXAXXFTLSSSAMS WVR; i/або
WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR або WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRNXNXXXL; i/або
YCAKLISLYWG, де X являє собою будь-яку амінокислоту.

Уважають, що послідовності попереднього втілення містять ділянки визначення комплементарності варіабельних областей легкого й важкого ланцюга ілюстративного антитіла AB-1.

У наступному втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може включати наступну амінокислотну послідовність:

KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXRTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXFXXXXXXXXXXXXXXXXXLYDDFPYT; або KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXFX; або RTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXXXF; або FXXXXXXXXXXXXXXXXXLYDDFPYT, де X являє собою будь-яку амінокислоту.

У наступному втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може включати наступну амінокислотну послідовність:

TCKASQDINSYLTWF або TCKASQDINSYLTWY; i/або
LLIYRTNRLFDGVP або SLIYRTNRLFDGVP або LLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF або SLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; i/або
YCLQYDDFPYTFG; i/або
FTFSSSAMS WVR або CXAXXFTFSSSAMS WVR; i/або
WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR або WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRNXNXXXL; i/або
YCAKLISLYWG, де X являє собою будь-яку амінокислоту.

Таким чином, у втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що містить наступні ділянки CDR: KASQDINSYLT; i RTNRLFD; i LQYDDFPYT.

У наступному втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що містить наступні ділянки CDR: SSAMS; i TISVGGGKTYYPDSVKG; i LISLY.

У наступному втіленні винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент другого аспекту може мати щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, що включає наступну амінокислотну послідовність:

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK або
DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK, або
EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (AB-1_VK), або
DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (AB-1_VK1), або
EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFF TISLQPEDFGTYICLQYDDFPYTFGGGKLEIK (hAB-1_RKE), або
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGSGTDFFF TISLQPEDFATYYICLQYDDFPYTFGGGKVEIK (hAB-1_RKJ).

У наступному втіленні другого аспекту винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може мати щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність:

EVQLEESGGGLVKGPGSLKLSAASGFTLSSSAMS WVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGRF

TISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS або
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTIS
 RDNAKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS, або
 EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPDSVKGR
 FTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (AB-1_VH), або
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTI
 SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (hAB-1_RHA).

У винаході також запропоноване антитіло або його антигенсполучний фрагмент, що має щонайменше одну варіабельну область легкого ланцюга, як втілено в другому аспекті винаходу, щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга, як втілено в другому аспекті винаходу.

Щоб уникнути сумнівів, антитіло або його антигенсполучний фрагмент другого аспекту винаходу може включати будь-яку амінокислотну послідовність, запропоновану відносно першого аспекту винаходу. Таким чином, антитіло або його антигенсполучний фрагмент другого аспекту винаходу може включати будь-яку область VK і/або VK, як проілюстровано на кожній з фіг. 18-28 або в таблицях 14-24 і 24A, або будь-який його варіант, фрагмент або похідне.

Крім того, антитіло або його антигенсполучний фрагмент будь-якого аспекту винаходу може являти собою або включати будь-яке гуманізоване або химерне антитіло, розкрите в даному винаході, зокрема, антитіло або його антигенсполучний фрагмент може включати кожну з послідовностей, наведених у таблицях 14-24 і 24A, або складатися з них.

Розглянуто, що антитіло або антигенсполучний фрагмент другого аспекту й стосовних до нього втілень винаходу може включати амінокислотну послідовність, що володіє щонайменше 75% ідентичністю однієї або більш із амінокислотних послідовностей, наведених вище, наприклад, щонайменше 80%, щонайменше 90%, щонайменше 95%, щонайменше 96%, щонайменше 97%, щонайменше 98% або щонайменше 99% ідентичністю однієї чи більш із амінокислотних послідовностей, зазначених вище. Також розглянуто, що антитіло або антигенсполучний фрагмент може містити аж до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більш інсерцій, делецій, консервативних замінів і/або неконсервативних замінів.

У кращому втіленні будь-якого аспекту винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може включати інтактне антитіло або складатися з нього. Альтернативне антитіло або його антигенсполучний фрагмент може складатися по суті з інтактного антитіла. Під «складатися по суті з» автори винаходу мають на увазі, що антитіло або його антигенсполучний фрагмент складається з ділянки інтактного антитіла, достатнього для прояву єдиної специфічності до TG2.

Антитіло або антигенсполучний фрагмент за винаходом може являти собою неприродне антитіло. Звичайно, де антитіло являє собою природне антитіло, воно запропоноване в ізольованій формі (тобто відмінної від тієї форми, у якій його виявляють у природі).

У втіленні будь-якого аспекту винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент може включати антигенсполучний фрагмент, обраний із групи, що складається з наступних фрагментів: Fv фрагмента; Fab фрагмента; і Fab-подібного фрагмента, або складатися із цього фрагмента. У наступному втіленні винаходу Fv фрагмент може являти собою одноланцюжковий Fv фрагмент або Fv фрагмент, зв'язаний дисульфідним зв'язком. У наступному втіленні Fab-подібний фрагмент може являти собою Fab' фрагмент або F(ab)₂ фрагмент.

Про той факт, що варіабельний важкий (VH) і варіабельний легкий (VL) домени антитіла залучені в розпізнавання антигену, вперше довідалися завдяки раннім експериментам по розщепленню протеазами. Додаткове підтвердження було знайдено в результаті «гуманізації» антитіл гризунів. Варіабельні домени, що мають походження від гризунів, можуть бути злиті з константними доменами людського походження, так що отримане в результаті антитіло зберігає антигенну специфічність батьківського антитіла гризунів (Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855).

Антигенну специфічність надають варіабельні домени, і вона не залежить від константних доменів, як відомо з експериментів, у які залучена бактеріальна експресія фрагментів антитіл, які всі містять варіабельні домени. Ці молекули включають Fab-подібні молекули (Better et al (1988) Science 240, 1041); Fv молекули (Skerra et al (1988) Science 240, 1038); одноланцюжкові Fv (Scfv) молекули, де домени-партнери VH і VL зв'язані за допомогою гнучкого олігопептида (Bird et al (1988) Science 242, 423; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879) і одnodоменні антитіла (dAb), що включають ізольовані V домени або що складаються із них (Ward et al (1989) Nature 341, 544). Загальний огляд методів, залучений у синтез фрагментів антитіл, що зберігають сайти специфічного зв'язування, наведений в Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299.

Таким чином, у термін «антигенсполучний фрагмент» автори винаходу включають функціональний фрагмент антитіла, здатний до зв'язування з TG2.

Ілюстративні антигенсполучні фрагменти можуть бути обрані із групи, що складається з Fv фрагментів (наприклад, одноланцюжкових Fv і дисульфід-зв'язаних Fv) і Fab-подібних фрагментів (наприклад, Fab фрагментів, Fab' фрагментів і F(ab)₂ фрагментів).

В одному втіленні винаходу антигенсполучний фрагмент являє собою scfv.

Переваги більш імовірного застосування фрагментів антитіл, чим повнорозмірних антитіл, мають багато аспектів. Менший розмір фрагментів може приводити до поліпшених фармакологічних властивостей, таким як краща проникність для солідної тканини. Крім того, антигенсполучні фрагменти, такі як Fab, Fv, Scfv і dAb фрагменти антитіл, можуть експресуватись й секретуватись з *E. coli*, що, таким чином, дає можливість простого одержання більших кількостей цих фрагментів.

В обсяг винаходу також включені модифіковані варіанти антитіл і їх антигенсполучних фрагментів, наприклад, модифіковані шляхом ковалентного приєднання поліетиленгліколя або іншого підходящого полімеру.

Особливо Бажано, щоб антитіло або його антигенсполучний фрагмент являв собою рекомбінантну молекулу.

Способи одержання антитіл і фрагментів антитіл добре відомі в даній області техніки. Наприклад, антитіла можуть бути отримані кожним з декількох способів, у яких використовують індукцію продукування молекул антитіла *in vivo*, скрінінг бібліотек імуноглобулінів (Orlandi. et al, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833-3837; Winter et al., 1991, Nature 349:293-299) або утворення молекул моноклонального антитіла лініями клітин у культурі. Ці способи включають, але не обмежені ними, гібридомний метод, метод з використанням гібридом В-клітин людини й метод гібридом з використанням вірусу Епштейна-Барре (EBV; від англ. "Epstein-Barr virus") (Kohler et al., 1975, Nature 256:4950497; Kozbor et al., 1985, J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; Cole et al., 1984, Mol. Cell. Biol. 62:109-120).

Для зручності у винаході запропоноване антитіло або його антигенсполучний фрагмент, де антитіло являє собою рекомбінантне антитіло (тобто таке, де воно отримане рекомбінантними способами).

В особливо кращому втіленні будь-якого аспекту винаходу антитіло може являти собою моноклональне антитіло.

Підходящі моноклональні антитіла до обраних антигенів можуть бути отримані відомими методами, наприклад, методами, описаними в кн. "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) і в кн. "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982), включених у даний винахід за допомогою посилання. Ілюстративні моноклональні антитіла за винаходом й підходящі способи їх одержання наведені нижче в розділі Прикладів.

Фрагменти антитіла можуть бути також отримані з використанням способів, добре відомих у даній області техніки (див., наприклад, кн. Harlow & Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, включену в даний винахід за допомогою посилання). Наприклад, фрагменти антитіла по даному винаходу можуть бути отримані шляхом протеолітичного гідролізу антитіла або шляхом експресії в *E. coli* або в клітинах ссавців (наприклад, у культурі клітин яєчника китайського хом'ячка або в інших системах експресії білка) ДНК, що кодує фрагмент. Альтернативно фрагменти антитіла можуть бути отримані шляхом розщеплення повнорозмірного антитіла пепсином або папаїном традиційними способами.

У втіленні будь-якого аспекту винаходу антитіло або його антигенсполучний фрагмент можуть являти собою антитіло людини або гуманізоване антитіло.

Фахівцям у даній області техніки зрозуміло, що для терапії або діагностики в людини можна застосовувати гуманізовані антитіла. Гуманізовані форми антитіл, що відрізняються від антитіл людини (наприклад, мишачих), являють собою химерні антитіла або фрагменти антитіл, що мають мінімальні ділянки, які походять від антитіл, що відрізняються від антитіл людини, сконструйовані методами генної інженерії. Гуманізовані антитіла включають антитіла, у яких ділянки, що визначають комплементарність, антитіла людини (антитіла-реципієнта), заміщені залишками з ділянки, що визначає комплементарність, виду, що відрізняється від людини (антитіла-донора), такого як миша, пацюк або кролик, що володіє бажаною функціональністю. У деяких випадках залишки каркасної ділянки Fv антитіла людини заміщені відповідними залишками, що відрізняються від людини. Гуманізовані антитіла можуть також містити залишки, що не перебувають ні в антитілі-реципієнті, ні в імпортованій послідовності ділянки, що визначає комплементарність, або каркасної ділянки. Як правило, гуманізоване антитіло включає по суті все із щонайменше одного, і в характерному випадку двох, варіабельних доменів, у яких усі або по суті всі ділянки, що визначають комплементарність, відповідають ділянкам антитіла, що відрізняється від антитіла людини, і всі або по суті всі з каркасних ділянок, що відповідають релевантній консенсус-послідовності людини. Оптимально гуманізовані антитіла також включають щонайменше ділянку константної області антитіла, таку як ділянка Fc, що у характерному випадку має походження від антитіла людини (див., наприклад, статті Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-329; Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, включені в даний винахід за допомогою посилання).

Способи гуманізації антитіл, що відрізняються від антитіл людини, добре відомі в даній області техніки. Як правило, гуманізоване антитіло має один або більш амінокислотних залишків, уведених у нього із джерела, що відрізняється від людини. Ці амінокислотні залишки, що відрізняються від

послідовності людини, часто називані імпортованими залишками, у характерному випадку взяті з імпортованого варіабельного домену. Гуманізація може бути виконана по суті, як описано (див., наприклад, наступні документи: Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Reichmann et al., 1988, Nature 332:323-327; Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-1536; US 4816567, включені в даний винахід за допомогою посилання), шляхом заміни ділянок, що визначають комплементарність людини відповідними ділянками, що визначають комплементарність гризуна. Відповідно, такі гуманізовані антитіла являють собою химерні антитіла, де по суті менш ніж інтактний варіабельний домен людини замінений відповідною послідовністю від виду, що відрізняється від людини. На практиці гуманізовані антитіла в характерному випадку можуть являти собою антитіла людини, у яких деякі залишки ділянки, що визначає комплементарність, і можливо деякі залишки каркасної ділянки замінені залишками з аналогічних сайтів антитіл гризуна.

Антитіла людини можуть бути також ідентифіковані з використанням різних методів, відомих у даній області техніки, що включають бібліотеки фагового дисплея (див, наприклад документи, що впливають: Hoogenboom & Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Cole et al., 1985, In: Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77; Boerner et al., 1991, J. Immunol. 147:86-95, Soderlind et al., 2000, Nat Biotechnol 18:852-6 і WO 98/32845, включені в даний винахід за допомогою посилання).

Термін «амінокислота», як використано у даному винаході, включає двадцять стандартних, генетично кодованих амінокислот і їх відповідні стереоізомери в 'D' формі (у порівнянні із природної 'L' формою), омега-амінокислоти, інші природні амінокислоти, нестандартні амінокислоти (наприклад, α , α -двозаміщені амінокислоти, N-алкіламінокислоти і т.д.) і хімічно дериватизовані амінокислоти.

Коли амінокислота позначена конкретно, як, наприклад, «аланін» або «Ala» або «A», цей термін стосується як до L-аланіну, так і до D-аланіну, якщо винятково не зазначене інше. Інші нестандартні амінокислоти можуть також являти собою підходящі компоненти для поліпептидів по даному винаходу, якщо бажана функціональна властивість зберігається поліпептидом. Для представлених пептидів кожний кодований амінокислотний залишок, де це доцільно, представлений у вигляді однопіктового позначення, відповідного до тривіальної назви стандартної амінокислоти.

В одному втіленні винаходу поліпептиди, як визначено в даному винаході, включають L-амінокислоти або складаються з них.

Як тільки отримані підходящі антитіла, їх можна тестувати на активність, таку як єднальна специфічність або біологічна активність антитіла, наприклад, за допомогою ELISA, імуногістохімії, проточної цитометрії, імунопреципітації, Вестерн-Блоттинга і т.д. Біологічну активність можна тестувати в різних аналізах з реєстрованими величинами для даної конкретної ознаки.

У наступному аспекті в даному винаході запропонований поліпептид, що кодує антитіло або його антигенсполучний фрагмент згідно із другим аспектом винаходу й втіленням винаходу, що відносяться до другого його аспекту.

Відповідно, у втіленні у винаході запропонований ізолюваний поліпептид, що включає наступні нуклеотидні послідовності або що складається з них:

i) GACATCCAGATGACACAGACTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTATCACT TGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAG ACCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGTTTGATGGGGTCCCATCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGG CAAGATTTTTTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATATGAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGA TGACTTTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAACTGGAAATAAAA; i/aбо

ii) GAAGTACAGCTGGAGGAGTCAGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCAGTCTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCCGACAGTCCGGACAGGAGG CTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGTTGGTGGTGGTAAACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCCG STTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGA CACGGCCATGTATTACTGTGCAAACTAATCAGTCTCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTC CTC A.

У наступному втіленні у винаході запропонований ізолюваний поліпептид, що включає кожну з нуклеотидних послідовностей, представлених на кожній з фіг. 18-28, або що складається з них.

Таким чином, у втіленні у винаході запропонований ізолюваний поліпептид, що включає наступні нуклеотидні послідовності або, що складається з них:

i) GCCATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTATCACT TGCAAGGCGAGTCAGGACATAAATAGTTATTTAACCTGGTTCCAACAGAAACCAGGAAAGTCTCCTAAG ACCCTGATCTATCTTACAAATAGATTGATGGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGG CAAGAATTTTTACTCACCATCAGCGGCCTGGAACATGAAGATATGGGCATTTATTATTGTCTCCAGTATG TTGACTTTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA; i/aбо

ii) GCAGTGCAACTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGAATCATTTTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCCGACAGTCCGGAAAAGAGAC TGGAGTGGGTCGCAACTATTAGTAGTGGTGGTGGTCCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCCGAT TCACCGTCTCCAGAGACAGTGCCAAGAACACCCTATACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGTCTGAGGAC

ACGGCCATTTATTACTGTGCAAACTAATCAGTCCCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCC TCA.

У наступному втіленні у винаході запропонований ізольований полінуклеотид, що включає наступні нуклеотидні послідовності або, що складається з них:

i) GACATCAGGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATATATGCATCTCTGGGAGAGAGAGTCACTATCACT TGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAG ATCCTGATCTATCTTGTAATAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGG CAAGATTATGCTCTCACCATCAGCAGTCTGGAATATGAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAATATGA TGACTTTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA; i/або

ii) GAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTACCCATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGG CTGGAGTGGGTGCGAACCATTAGTAGTGGTGGTTCGTTCCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTTCG ATTCATCTCTCCAGAGACAATGTCAAGAACCCCTATATCTGCAACTGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGA CACGGCCGTGTATTTCTGTGCAAGACTAATCAGTACCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTC CTCA.

Бажано, щоб антитіло або його антигенсполучний фрагмент за винаходом інгібував активність TG2. Отже, бажано, щоб антитіло за винаходом інгібувало ферментативну активність TG2, і, таким чином, запобігало поперечному зшиванню залишків лізину й глутаміну з утворенням Nε-(γ-глутаміл)лізин-ізо-дипептидних зв'язків. Бажано, щоб ферментативна активність TG2 була припинена повністю, але розглянуте, що це інгібування може являти собою часткове інгібування в тих випадках, де це часткове інгібування достатнє для забезпечення корисного терапевтичного або нетерапевтичного результату. Фахівець у даній області техніки зможе визначити, чи є ступінь інгібування ефективною для досягнення бажаного результату.

Бажано, щоб антитіло або його антигенсполучний фрагмент мали специфічність у відношенні інгібування TG2. Таким чином, бажано, щоб антитіло або його антигенсполучний фрагмент не інгібували активність TG1, TG3, TG13 i/або TG7. Розглянуте, що антитіло, яке ефективно інгібує активність TG2, але є досить селективним, щоб значуще не інгібувати активність TG1, TG3, TG13 i/або TG7, може бути особливо корисним у медицині. Таким чином, бажано, щоб антитіло винятково інгібувало активність TG2.

У наступному аспекті у винаході запропоноване антитіло або його антигенсполучний фрагмент, зв'язування якого з TG2 (наприклад, з TG2 людини) інгібоване або знижене, коли антитіло відповідно будь-якому попередньому аспекту зв'язується з TG2 (наприклад, з TG2 людини).

Таким чином, винахід включає будь-яке антитіло, що селективно зв'язується з епітопом усередині ділянки TG2 таким чином, що воно може конкурувати за зв'язування й переривати зв'язування будь-якого антитіла попередніх аспектів.

У наступному аспекті в даному винаході запропонована сполука, що включає антитіло або його антигенсполучний фрагмент відповідно будь-якому попередньому аспекту й додаткове угруповання.

У втіленні винаходу додаткове угруповання може являти собою безпосередньо або опосередковано цитотоксичне угруповання.

У вираз «безпосередньо цитотоксична» автори винаходу включають таке значення, що дане угруповання являє собою угруповання, що володіє власною цитотоксичністю. У вираз «опосередковано цитотоксична» автори винаходу включають таке значення, що дане угруповання являє собою угруповання, яке, хоча не має власної цитотоксичності, може індукувати цитотоксичність, наприклад, за допомогою її дії на іншу молекулу або за допомогою додаткової дії на це угруповання.

Цитотоксичне угруповання може бути обране, але не обмежене нею, із групи, що включає безпосередньо цитотоксичний хіміотерапевтичний агент, безпосередньо цитотоксичний поліпептид, угруповання, здатне перетворювати відносно нетоксичні проліки в цитотоксичний лікарський засіб, радіосенсибілізатор, безпосередньо цитотоксичну нуклеїнову кислоту, молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує безпосередньо або опосередковано цитотоксичний поліпептид, молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує терапевтичний поліпептид, або радіоактивний атом. Розглянуте, що радіоактивний атом може являти собою кожний з наступних атомів: фосфору-32, йоду-125, йоду-131, індію-111, ренію-186, ренію-188 або іттрію-90.

Цитотоксичні хіміотерапевтичні агенти, такі як протиракові агенти, включають наступні агенти: алкілуючі агенти, що включають хлорметіни, такі як меклоретамін (HN₂), циклофосфамід, іфосфамід, мелфалан (L-сарколізін) і хлорамбуцил; етиленіміни й метилмеламіни, такі як гексаметилмеламін, тіотепа; алкілсульфонати, такі як бусульфан; нітрозосечовини, такі як кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), семустин (метил-CCNU) і стрептозоцин (стрептозоцин); і тріазени, такі як дакарбазин (DTIC; диметилтріазеноїмідазол-карбоксамід); антиметаболіти, що включають аналоги фолієвої кислоти, такі як метотрексат (аметоптерин); аналоги піримідина, такі як фторурацил (5-фторурацил; 5-FU), флоксурідин (фтордезоксіурідин; Fudr) і цитарабін (цитозинарабінозид); і аналоги пурину й споріднені інгібітори, такі як меркаптопурин (6-меркаптопурин; 6-MP), тіогуанин (6-тіогуанин; TG) і пентостатин (2'-дезоксікоформіцин). Натуральні продукти включають вінка-алкалоїди, такі як вінбластин (VLB) і

вінкристин; епіподофілотоксини, такі як етопозид і тенипозид; антибіотики, такі як дактиномицин (актиномицин D), даунорубіцин (дауномицин; рубідоміцин), доксорубіцин, блеомицин, плікаміцин (мітраміцин) і мітоміцин (мітоміцин C); ферменти, такі як L-аспарагіназа; і модифікатори біологічної відповіді, такі як інтерферон-альфеноми. Додаткові агенти включають координаційні комплекси платини, такі як цисплатин (цис-DDP) і карбоплатин; антрацендіон, такий як мітоксантрон і антрациклін; заміщену сечовину, таку як гідроксисечовина; похідне метилгідрозина, таке як прокарбазин (N-метилгідрозин, MHN); і адренкортикальний супресант, такий як мітотан (o,p'-DDD) і аміноглутетимід; таксол і його аналоги/похідні; і агоністи/антагоністи гормону, такі як флутамід і тамоксифен.

Різні агенти із числа цих агентів раніше приєднували до антитіл і інших агентів доставки в сайт-мішень, і тому сполуки за винаходом, що включають ці агенти, можуть бути легко отримані фахівцями в даній області техніки. Наприклад, для кон'югації ряду агентів, що включають доксорубіцин, з антитілами можна використовувати карбодіімідну кон'югацію (Bauminger & Wilchek (1980) *Methods Enzymol.* 70, 151-159; включена в даний винахід за допомогою посилання).

Цитотоксичні пептидні або поліпептидні угруповання включають будь-яке угруповання, що приводить до клітинної загибелі. Цитотоксичні пептидні й поліпептидні угруповання добре відомі в даній області техніки й включають, наприклад, рицин, абрин, екзотоксин *Pseudomonas*, тканинний фактор і таке інше. Способи їх зшивання з угрупованнями, що націлюють, такими як антитіла, також відомі в даній області техніки. Застосування рицину в якості цитотоксичного агента розкрито в статті Burrows & Thorpe (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8996-9000, включений в даний винахід за допомогою посилання, а застосування тканинного фактора, що призводить до локалізованого згортання крові й інфаркту пухлини, розкрито в статтях Ran et al (1998) *Cancer Res.* 58, 4646-4653 і Huang et al (1997) *Science* 275, 547-550. У статті Tsai et al (1995) *Dis. Colon Rectum* 38, 1067-1074, включеної в даний винахід за допомогою посилання, розкритий ланцюг абрина А, кон'югування з моноклональним антитілом. Інші білки, що інактивують рибосоми, розкриті в якості цитотоксичних агентів у документі WO 96/06641. Екзотоксин *Pseudomonas* можна також застосовувати в якості цитотоксичного пептидного угруповання (див., наприклад, статтю Aiello et al (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10457-10461; включеного в даний винахід за допомогою посилання).

Деякі цитокіни, такі як фактор некрозу пухлини α (TNF α ; від англ. "tumor necrosis factor") та інтерлейкін (ІЛ)-2, можуть бути також корисними в якості цитотоксичних агентів.

Деякі радіоактивні атоми можуть також бути цитотоксичними при доставці в достатніх дозах. Таким чином, цитотоксичне угруповання може включати радіоактивний атом, який при його застосуванні доставляє у сайт-мішень кількість радіоактивності, достатню для цитотоксичності. Підходящі радіоактивні атоми включають фосфор-32, йод-125, йод-131, індій-111, реній-186, реній-188 або іттрій-90, або будь-який інший ізотоп, що випускає досить енергії, щоб руйнувати прилеглі клітини, органели або нуклеїнову кислоту. Бажано ізотопи й щільність радіоактивних атомів у з'єднанні за винаходом вибираються такими, щоб у сайт-мішень була доставлена доза, що складає більше 4000 кГр (Бажано щонайменше 6000, 8000 або 10000 кГр), і переважно в клітини сайту-мішені і їх органели, зокрема, у ядро. Радіоактивний атом може бути приєднаний до антитіла відомими шляхами. Наприклад, етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) або інший хелатуючий агент може бути приєднаний до антитіла й використаний для приєднання ^{111}In або ^{90}Y . Залишки тирозину можуть бути міченими ^{125}I або ^{131}I .

Цитотоксичне угруповання може являти собою підходящий опосередковано цитотоксичний поліпептид. В особливо кращому втіленні винаходу опосередковано цитотоксичний поліпептид являє собою поліпептид, що має ферментативну активність, і може перетворювати відносно нетоксичні проліки в цитотоксичний лікарський засіб. Коли угруповання, що націлює, являє собою антитіло, систему даного типу часто називають спрямованою на антитіла ферментно-пролікарської терапії (ADEPT; від англ. "Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy"). Ця система вимагає, щоб угруповання, що націлює, було локалізоване на ферментній ділянці для бажаного сайту в організмі пацієнта (тобто в сайті, який експресує MR, такому як нова судинна тканина, асоційована з пухлиною), а потім надання часу для локалізації ферменту в цьому сайті, введення проліків, що є субстратом для ферменту, де кінцевий продукт каталізу являє собою цитотоксичну сполуку. Метою даного підходу є максимізація концентрації лікарського засобу в бажаному сайті й мінімізація концентрації лікарського засобу в нормальних тканинах (див. статті Senter, P.D. et al (1988) "Anti-tumor effects of antibody-alkaline pHospHatase conjugates in combination with etoposide pHospHate" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4842-4846; Bagshawe (1987) *Br. J. Cancer* 56, 531-2; і Bagshawe, K.D. et al (1988) "A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites" *Br. J. Cancer.* 58, 700-703).

Цитотоксична речовина може являти собою будь-який існуючий протираковий лікарський засіб, такий як алкілюючий агент; агент, інтеркалюючий у ДНК; агент, інгібуючий ключові ферменти, такі як дигідрофолатредуктаза, тимідинсінтетаза, рибонуклеотидредуктаза, нуклеозідкінази або топоізомераза; або агент, що впливає на загибель клітин шляхом взаємодії з будь-якими іншими клітинними компонентами. Етопозид являє приклад інгібітору топоізомерази.

Описані пролікарські системи включають наступні системи: проліки фенілізотіоціанат, що

активуються β -глюкуронідазою *E. coli* (Wang et al, 1992 i Roffler et al, 1991); проліки доксорубіцину, що активуються β -глюкуронідазою людини (Bosslet et al, 1994); додаткові проліки доксорубіцину, що активуються α -галактозидазою кавових зерен (Azoulay et al, 1995); проліки даунорубіцину, що активуються α -d-галактозидазою кавових зерен (Gesson et al, 1994); проліки 5-фторурідину, що активуються β -d-галактозидазою *E. coli* (Abraham et al, 1994); і проліки метотрексата (наприклад, метотрексат-аланін), що активуються карбоксипептидазою A (Kuefner et al, 1990, Vitols et al, 1992 i Vitols et al, 1995). Ці й інші агенти включено в таблицю 1.

Таблиця 1

Фермент	Проліки
Карбоксипептидаза G2	Похідні L-Глутамінової кислоти і бензойної кислоти ізотіоціанатів, анілінізотіоціанатів, фенілізотіоціанатів і фенілендіамінізотіоціанатів; фторовані похідної цих сполук
Лужна фосфатаза	Етопозідфосфат
	Мітоміцинфосфат
Бета-глюкуронідаза	пара-гідроксіанілінізотіоціанат-глюкуронід
	Епірубіцин-глюкуронід
Пеніцилін-v-амідаза	Адріаміцин-n-феноксіацетил
Пеніцилін-g-амідаза	N-(4'-гідроксіфеніл-ацетил)палітоксин
	Доксорубіцин и мелфалан
Бета-лактамаза	Хлорметин-цефалоспорин пара-фенілендіамін; похідне доксорубіцина; похідне вінбластіна - цефалоспорина, цефалоспоринізотіоціанат; похідне таксола
Бета-глюкозидаза	D-глюко-Піранозідуринова кислота
Нітроредуктаза	5-(Азаридін-1-Іл)-2,4-дінітробензамід
Цитозіндеаміназа	5-фторцитозін
Карбоксипептидаза A	Метотрексат-аланін

(дана таблиця адаптована зі статті Bagshawe (1995) Drug Dev. Res. 34, 220-230, з якої можуть бути отримані повні посилання на ці системи; похідне таксола описане в статті Rodrigues, M.L. et al (1995) Chemistry & Biology 2, 223).

Підходящі ферменти для утворення частини ферментативної ділянки за винаходом включають наступні ферменти: екзопептидази, такі як карбоксипептидази G, G1 і G2 (для глутамінованих проліків, що представляють собою ізотіоціанатні проліки), карбоксипептидази A і B (для проліків на основі метотрексата (MTX; від англ. "methotrexate")) і амінопептидази (для проліків на основі α -аміноацил-mtc); ендопептидази, такі як тромболізін (для тромбінових проліків); гідролази, такі як фосфатази (наприклад, лужна фосфатаза) або сульфатази (наприклад, арилсульфатази) (для фосфорилованих і сульфатованих проліків); амідози, такі як пеницилінамідази й арілациламідаза; лактамази, такі як β -лактамази; глікозидози, такі як β -глюкуронідаза (для β -глюкурономід-антрациклінів), α -галактозидаза (для амігдаліна) і β -галактозидаза (для β -галактозо-антрацикліна); деамінази, такі як цитозіндеамідаза (для 5FC); кінрази, такі як урокіназа й тімідінкіназа (для ганцикловіру); редуктази, такі як нітроредуктаза (для CB1954 і аналогів), азоредуктаза (для азобензолізотіоціанатів) і Dt-діафораза (для CB1954); оксидази, такі як глюкозооксидаза (для глюкози), ксантиноксидаза (для ксантина) і лактопероксидаза; DI-рацемати, каталітичні антитіла й циклодекстрини.

Проліки є відносно нетоксичними у порівнянні із цитотоксичним лікарським засобом. У характерному випадку вони мають менше 10% токсичності, бажано менш 1% токсичності, вимірюваної в підходящому тесті цитотоксичності *in vitro*. Імовірно, що угруповання, здатне до перетворення проліків в цитотоксичний лікарський засіб, активне в ізоляції від іншої частини сполуки, але єдиною обов'язковою умовою для нього є те, щоб воно мало активність, коли (а) воно перебуває в комбінації з іншою частиною сполуки й (б) ця сполука приєднана до клітин-мішеней, перебуває поблизу їх або інтерналізовано в клітинах-мішенях.

Коли кожне угруповання сполуки являє собою поліпептид, дві частини можуть бути зв'язані разом кожним із традиційних шляхів зшивання поліпептидів, таких як у цілому описані в статті O'sullivan et al (1979) Anal. Biochem. 100, 100-108. Альтернативно ця сполука може бути отримана у вигляді зливої сполуки за допомогою методів рекомбінантних ДНК, де вся довжина ДНК містить відповідні ділянки, що кодують два угруповання сполуки за винаходом, або, що примикають одне до одного, або розділені ділянкою, що кодують лінкерний пептид, який не порушує бажані властивості сполуки. Імовірно, ці дві ділянки сполуки можуть перекриватися повністю або частково.

Цитотоксичне угруповання може являти собою радіосенсибілізатор. Радіосенсибілізатори

включають фторпіримідини, аналоги тімідина, гідроксісечовину, гемцитабін, флударабін, никотинамід, галогеновані піримідини, 3-амінобензамід, 3-амінобензодіамід, етаніксадол, пімонідазол і мізонідазол (див., наприклад, статті McGinn et al (1996) J. Natl. Cancer Inst. 88, 1193-11203; Shewach & Lawrence (1996) Invest. New Drugs 14, 257-263; Horsman (1995) Acta Oncol. 34, 571-587; Shenoy & Singh (1992) Clin. Invest. 10, 533-551; Mitchell et al (1989) Int. J. Radiat. Biol. 56, 827-836; Iliakis & Kurtzman (1989) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16, 1235-1241; Brown (1989) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16, 987-993; Brown (1985) Cancer 55, 2222-2228).

Доставка генів у клітини також може приводити до їх радіосенсибілізації, наприклад, доставка гена p53 або цикліна D (Lang et al (1998) J. Neurosurg. 89, 125-132; Coco Martin et al (1999) Cancer Res. 59, 1134-1140).

Наступне угруповання може являти собою угруповання, яке може стати цитотоксичним або вивільняти цитотоксичне угруповання при опроміненні. Наприклад, ізотоп бор-10 при відповідному опроміненні вивільняє α -частки, що є цитотоксичними (див., наприклад наступні документи: патент US 4348376 автора Goldenberg; Primus et al (1996) Bioconjug. Chem. 7, 532-535).

Подібним чином, цитотоксичне угруповання може являти собою угруповання, корисне у фотодинамічній терапії, таку як фотофрін (див., наприклад, Dougherty et al (1998) J. Natl. Cancer Inst. 90, 889-905).

Цитотоксичне угруповання може являти собою молекулу нуклеїнової кислоти, що є безпосередньо або опосередковано цитотоксичною. Наприклад, молекула нуклеїнової кислоти може являти собою антисенсовий(антисенс)-олігонуклеотид, який при локалізації в сайті-мішені здатний проникати в клітини й приводити до їхньої загибелі. Цей олігонуклеотид може, таким чином, являти собою олігонуклеотид, що запобігає експресії істотного гена, або олігонуклеотид, що приводить до зміни експресії гена, що викликає апоптоз.

Приклади підходящих олігонуклеотидів включають олігонуклеотиди, спрямовані на bcl-2 (Ziegler et al (1997) J. Natl. Cancer Inst. 89, 1027-1036), на ДНК полімеразу α і на топоізомеразу II α (Lee et al (1996) Anticancer Res. 16, 1805-1811).

Пептидні нуклеїнові кислоти можуть бути корисні замість стандартних нуклеїнових кислот (див. статтю Knudsen & Nielsen (1997) Anticancer Drugs 8, 113-118).

У втіленні сполуки за винаходом антитіло або його антигенсполучний фрагмент і цитотоксичне угруповання можуть являти собою поліпептиди, що є злитими. Таким чином, у винаході додатково запропонований поліонуклеотид, що кодує таке сполуки.

У наступному втіленні винаходу додаткове угруповання може являти собою легко знаходжуване угруповання. Розглянуте, що це легко знаходжуване угруповання може містити відповідну кількість кожного з наступних елементів: йоду-123, йоду-131, індію-111, фтору-19, вуглецю-13, азоту-15, кисню-17, технецію-99m, гадолінію, марганцю або заліза.

У вираз «легко знаходжуване угруповання» автори винаходу включають значення, що дане угруповання являє собою угруповання, яке при локалізації в сайті-мішені після введення сполуки за винаходом пацієнтові може бути виявлене, у характерному випадку неінвазивно поза організмом і сайту-мішені, де вона локалізована. Таким чином, сполуки по даному втіленню винаходу корисні при візуалізації й діагностиці.

У характерному випадку легко знаходжуване угруповання являє собою або включає радіоактивний атом, корисний при візуалізації. Підходящі радіоактивні атоми включають технецій-99m або йод-123 для сцинтиграфічних досліджень. Інші легко знаходжувані угруповання включають, наприклад, спіні-мітки для магнітно-резонансної візуалізації (МРВ), такі як знову йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо. Зрозуміло, що сполука за винаходом повинна мати досить підходящих атомних ізотопів, щоб молекула була легко знаходжувана.

Радіо- або інші мітки можуть бути включені в сполуки за винаходом відомими шляхами. Наприклад, якщо антитіло являє собою поліпептид, воно може бути біосинтезовано або може бути синтезоване шляхом хімічного синтезу амінокислот, використовуючи підходящі попередники амінокислот, що містять, наприклад, фтор-19 замість атома водню. Мітки, такі як ^{99m}Tc, ¹²³I, ¹⁸⁶Rh, ¹⁸⁸Rh і ¹¹¹In, можуть бути, наприклад, приєднані за допомогою залишків цистеїна в антитілі. Іттрий-90 може бути приєднаний за допомогою залишку лізіна. Метод йодування (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 49-57) можна використовувати для включення йоду-123. У посиланні («Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy», J-F Chatal, CRC Press, 1989) докладно описані інші способи.

У наступному аспекті в даному винаході запропонований вектор, що містить будь-який поліонуклеотид за винаходом.

Характерні прокаріотичні векторні плазмідні являють собою наступні плазмідні: pUC18, pUC19, pBR322 і pBR329, наявні в продажу від фірми Biorad Laboratories (Richmond, CA, USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 і pRIT5, наявні в продажу від фірми Pharmacia (Piscataway, NJ, USA); вектори pBS, вектори PHagescript, вектори Bluescript, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, наявні в продажу від фірми Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, USA).

Характерна векторна плазмідна клітин ссавців являє собою вектор pSVL, наявний у продажу від фірми PHarmacia (Piscataway, NJ, USA). Прикладом індукційного експресійного вектора ссавців є вектор pMSG, також наявний в продажу від фірми PHarmacia (Piscataway, NJ, USA).

Корисними дріжджовими плазмідними векторами є наступні вектори: pRS403-406 і pRS413-416, які в цілому наявні в продажі від фірми Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, USA). Плазмідні pRS403, pRS404, pRS405 і pRS406 являють собою інтегративні дріжджові плазмідні (YCp) і включають дріжджові селективні маркери HIS3, TRP1, LEU2 і URA3. Плазмідні pRS413-416 являють собою центромірні дріжджові плазмідні (YCp).

Для конструювання експресійних векторів, що містять кодуєчу послідовність і, наприклад, підходящі транскрипційні або трансляційні контролюючі послідовності, можна використовувати способи, добре відомі фахівцям у даній області техніки.

Крім того, у винаході запропонована клітка-хазяїн, що містить будь-який полінуклеотид або вектор за винаходом.

Відомо багато експресійних систем, включаючи системи, у яких використовують бактерії (наприклад, *E. coli* і *Bacillus subtilis*), трансформовані, наприклад, рекомбінантним бактеріофагом, плазмідні або космідні експресійні ДНК-вектори; дріжджі (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*), трансформовані, наприклад, дріжджові експресійні вектори; системи клітин комах, трансформовані, наприклад, вірусними експресійними векторами (наприклад, бакуловірусом); системи рослинних клітин, трансфікованих, наприклад, вірусними або бактеріальними експресійними векторами; системи клітин тварин, трансформованих, наприклад, аденовірусними експресійними векторами.

Вектори можуть включати прокаріотичний реплікон, такий як Col E1 ori, для розмноження в прокаріоті, навіть якщо вектор потрібно використовувати для експресії в інших, непрокаріотичних типах клітин. Вектори можуть також включати підходящий промотор, такий як прокаріотичний промотор, здатний направляти експресію (транскрипцію й трансляцію) генів у бактеріальній клітці-хазяїні, такий як *E. coli*, трансформованої цим вектором.

Промотор являє собою елемент експресійного контролю, утворений послідовністю ДНК, який дає можливість зв'язування РНК полімерази й проходження транскрипції. Промоторні послідовності, сумісні з ілюстративними бактеріальними хазяїнами, у характерному випадку представлені в плазмідних векторах що містять зручні сайти, рестрикції для інсерції сегмента ДНК по даному винаходу.

Полінуклеотид у підходящій клітці-хазяїні можна експресувати із одержанням антитіла або сполуки за винаходом. Таким чином, полінуклеотид можна використовувати відповідно до відомих методів, відповідним чином модифікованими у світлі ідей, що містяться в даному винаході, для конструювання експресійного вектора, який потім використовують для трансформації підходящої клітини-хазяїна для експресії й продукування антитіла або сполуки за винаходом. Такі методи включають методи, описані в патентах US №№ 4440859; 4530901; 4582800; 4677063; 4678751; 4704362; 4710463; 4757006; 4766075 і 4810648, де всі ці документи включені в даний винахід за допомогою посилання.

Полінуклеотид може бути з'єднаний із широкою різноманітністю послідовностей ДНК для введення в підходящого хазяїна. Супутня ДНК залежить від природи хазяїна, від способу введення ДНК у хазяїна й від того, чи бажана підтримка її в епісомному або в інтегрованому стані.

Як правило, полінуклеотид вбудовують в експресійний вектор, такий як плазмідна, у правильній орієнтації й у відповідній рамці читування для експресії. При необхідності ДНК може бути пов'язана з підходящими транскрипційними й трансляційними регуляторними контролюючими нуклеотидними послідовностями, розпізнаваними бажаним хазяїном, хоча такі контролюючі послідовності, як правило, є в експресійном векторі. Таким чином, вставка ДНК може бути функціонально пов'язана з підходящим промотором. Бактеріальні промотори включають промотори *E. coli* lacI і lacZ, промотори T3 і T7, промотор gpt, промотори PR і PL фагу λ, промотор pHoA і промотор trp. Еукаріотичні промотори включають негайно-ранній промотор CMV, промотор тімідінкінази HSV, ранній і пізній промотори SV40 ретровірусних довгих кінцевих повторів (ДКП). Інші підходящі промотори відомі фахівцям у даній області техніки. Експресійні конструкції бажано також містять сайти ініціації й термінації транскрипції, і в транскрибованій ділянці сайт зв'язування рибосоми для трансляції. (Hastings et al, Міжнародний патент № WO 98/16643, опублікований 23 квітня 1998).

Потім вектор вводять у хазяїна стандартними методами. Як правило, не всі з хазяїв трансформуються вектором, і тому необхідно відбирати трансформовані клітини-хазяї. Один з методів відбору включає вбудовування в експресійний вектор послідовності ДНК маркера з кожним з необхідних контролюючих елементів, що кодує селективну ознаку в трансформованій клітині. Ці маркери включають гени стійкості до дігідрофолатредуктази, G418 або неоміцину для культури еукаріотичних клітин і до тетрацикліну, канаміцину або ампіциліну для культивування в *E. coli* і інших бактеріях. Альтернативно ген для такої селективної ознаки може перебувати на іншому векторі, використовуваному для котрансформації бажаної клітки-хазяїна.

Потім клітини-хазяї, трансформовані рекомбінантною ДНК за винаходом, культивують протягом достатнього часу й у підходящих умовах, відомих фахівцям у даній області техніки, у світлі ідей,

розкритих у даному винаході, щоб дати можливість експресії поліпептиду, який потім можна виділити.

Антитіло або сполуки можна виділити й очистити з культур рекомбінантних клітин добре відомими способами, що включають осадження сульфатом амонію або етанолом, екстракцію кислотою, аніоно- або катіонообмінну хроматографію, хроматографію на фосфоцелюлозі, гідрофобну хроматографію, аффіну хроматографію, хроматографію на гідроксіпатиті й хроматографію на лектині. Найбільше бажано для очищення використовувати високоефективну рідинну хроматографію («ВЕРХ»).

Крім того, у винаході запропонована стабільна лінія клітин-хазяїв, що продукують антитіло або його антигенсполучний фрагмент згідно з кожним з попередніх аспектів або сполуки за винаходом, отриманої в результаті включення в лінію клітин екзогенного полінуклеотида або вектора за винаходом.

Клітка-Хазяїн може бути або прокаріотчною, або еукаріотичною. Бактеріальні клітини є кращими прокаріотичними клітками-хазяїнами, і в характерному випадку являють собою штам *Escherichia coli*, такий як, наприклад, штами *E. coli* DH5, доступні з Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, USA, і RR1, доступний з Американської колекції типових клітинних культур (ATCC; від англ. "American Type Culture Collection") Rockville, MD, USA (No ATCC 31343). Кращі еукаріотичні клітини-хазяї включають клітини дріжджів і ссавців, бажано клітини хребетних, таких як миша, пацюк, мавпа, або лінію фібробластів людини. Дріжджові клітини-хазяї включають YPH499, YPH500 і YPH501, у цілому доступні з Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA. Кращі клітини-хазяї ссавців включають клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO; від англ. "Chinese hamster ovary"), доступні з ATCC як CCL61, ембріональні клітини миші Національного інституту охорони здоров'я Швейцарії (NIH Swiss; від англ. "Swiss National Health Institute") NIH/3T3, доступні з ATCC як CRL 1658, і клітини нирок мавп COS-1, доступні з ATCC як CRL1650.

Крім самих трансформованих клітин-хазяїв, у даному винаході також розглянута культура цих клітин, бажано моноклональна (клонально гомогенна) культура або культура, що має походження від моноклональної культури, у живильному середовищі.

У наступному аспекті в даному винаході запропонована фармацевтична композиція/препарат, що містить антитіло або його антигенсполучний фрагмент згідно з будь-яким аспектом винаходу, або полінуклеотид згідно з винаходом, або сполука згідно з винаходом у суміші з фармацевтично прийнятним ексципієнтом, ад'ювантом, розріджувачем або носієм.

В визначення «фармацевтично прийнятний» включають, що препарат є стерильним і апірогенним. Підходящі фармацевтичні носії добре відомі в області фармацевтики. Носій (носії) повинні бути «прийнятними» у тому розумінні, що вони сумісні із сполукою за винаходом й не шкідливі для їхніх реципієнтів. У характерному випадку носії являють собою воду або фізіологічний розчин, що є стерильними й апірогенними; проте, можна використовувати інші прийнятні носії.

У втіленні винаходу фармацевтична композиція/препарат за винаходом може додатково містити додатковий активний інгредієнт, тобто терапевтично активний агент, що відрізняється від антитіла або його антигенсполучного фрагмента за винаходом. Розглянуте, що один або більш додаткових активних агентів можуть підвищувати ефективність фармацевтичної композиції/препарату проти цільового захворювання, якщо це доцільно. У втіленні винаходу додатковий активний інгредієнт може являти собою терапевтичний агент, обраний з агента, залученого в зменшення рубцювання тканини, зменшення числа нейрофібрилярних клубків і/або зниження резистентності до хіміотерапії.

У кращому втіленні винаходу фармацевтичну композицію/препарат можна готувати для внутрішньовенної, внутрішньом'язової або підшкірної доставки пацієнтові.

Бажано, щоб фармацевтична композиція/препарат містила таку кількість антитіла або антигенсполучного фрагмента за винаходом, що буде ефективною для лікування різних патологічних станів, описаних вище й додатково описаних нижче.

У наступному аспекті винаходу запропонований набір із частин, що включає антитіло або його антигенсполучний фрагмент згідно з будь-яким аспектом винаходу, або полінуклеотид згідно з винаходом, або сполуки за винаходом; і один або більш додаткових агентів. Розглянуте, що ці додаткові агенти можуть являти собою будь-які з активних інгредієнтів, розкритих вище, або будь-який інший підходящий агент.

У наступному аспекті у винаході запропонована терапевтично ефективна кількість антитіла або його антигенсполучного фрагмента згідно з будь-яким аспектом винаходу, або полінуклеотида за винаходом, або сполуки, фармацевтичної композиції/препарату, або набору із частин за винаходом для застосування в медицині.

TG2 явно являє собою багатофункціональний фермент, пов'язаний з рядом клітинних функцій, що включають ядерну стабілізацію й транспорт [28, 29], ендцитоз [30, 31], ГТФазну передачу сигналу [32-34], апоптоз [35, 36], клітинну адгезію [37-39], цілісність цитоскелету [28, 29] і стабілізацію ВКМ [9]. Низькомолекулярний інгібітор може утрудняти всі ці функції, оскільки, як правило, він має вільний доступ у позаклітинний простір і всередину клітини. Антитіло не може проникати в клітину, і, як таке, TG 2-специфічне антитіло, введенне *in vivo*, не вплине на внутрішньоклітинні ролі TG2.

Важливо, що в більшості патологічних ролі TG2, очевидно, є позаклітинними, наприклад, її роль при

рубцюванні тканини й фіброзі, целіакії й раці. Отже, застосування антитіла, що селективно зв'язує TG2, у медицині вносить додатковий ступінь селективності, що запобігає небажаним внутрішньоклітинним ефектам, які можуть транслюватися в небажані побічні ефекти терапії.

Таким чином, антитіла і їх антигенсполучні фрагменти за винаходом забезпечували б клінічну перевагу в порівнянні з раніше доступними лікарськими засобами, наприклад, при блокуванні TG2 при фібротичних захворюваннях і захворюваннях, пов'язаних з рубцюванням, де TG2 утворює поперечні зшивки білків ВКМ, при целіакії, де гліадин деамідується в позаклітинному просторі, і при резистентності до хіміотерапії при раку, де клітинна адгезія, очевидно, є захисним чинником. Крім того, малі фрагменти антитіла за винаходом, наприклад, Fab фрагменти, можуть проходити гематоенцефалічний бар'єр і інгібувати TG2 у головному мозку й потенційно забезпечать ефективні терапії для неврологічних патологій із залученням в TG2.

Таким чином, у наступному аспекті винаходу запропоноване антитіло або його антигенсполучний фрагмент згідно з будь-яким аспектом винаходу, або полінуклеотид за винаходом, або сполуки, фармацевтична композиція/препарат, або набір із частин за винаходом, для застосування при зниженні або інгібуванні ферментативної активності TG2 в індивідуума, що потребує цього.

Далі у винаході запропоноване застосування антитіла або його антигенсполучного фрагмента згідно з будь-яким аспектом винаходу, або полінуклеотида за винаходом, або сполуки, фармацевтичної композиції/препарату, або набору із частин за винаходом при одержанні лікарського засобу для зниження або інгібування ферментативної активності TG2 в індивідуума, що потребує цього.

У винаході також запропонований спосіб зниження або інгібування ферментативної активності TG2 в індивідуума, що потребує цього, де даний спосіб включає стадію введення індивідуумові антитіла або його антигенсполучного фрагмента, або його варіанта, злиття або похідного згідно з будь-яким аспектом винаходу, або полінуклеотида за винаходом, або сполуки, фармацевтичної композиції/препарату, або набору із частин за винаходом.

У наступному аспекті винаходу запропонована терапевтично ефективна кількість антитіла або його антигенсполучного фрагмента згідно з будь-яким аспектом винаходу, або полінуклеотида за винаходом, або сполуки, фармацевтичної композиції/препарату, або набору із частин за винаходом для застосування при лікуванні й/або діагностиці целіакії, аномального загоснення рани, рубцювання, склеродерми, келоїдів і гіпертрофованих фляків, очного рубцювання, запального кишкового захворювання, макулярної дегенерації, офтальмопатії Грейвса, медикаментозного ерготизму, псоріазу, захворювань, пов'язаних з фіброзом (наприклад, фіброзу печінки, фіброзу легенів, такого як інтерстиціальна хвороба легенів і фибротична хвороба легенів, серцевого фіброзу, шкірного фіброзу, мієлофіброзу, фіброзу нирок, такого як гломерулосклероз і тубулоунтерстиціальний фіброз), атеросклерозу, рестенозу, запальних захворювань, аутоімунних захворювань, нейродегенеративних/неврологічних захворювань (наприклад, хвороби Гентингтона, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, поліглутамінового захворювання, спинобульбарної м'язової атрофії, дентаторубро-паллідолоїсової атрофії, спино-церебелярних атаксій 1, 2, 3, 6, 7 і 12, рубропаллідарної атрофії, спиноцеребелярного паралічу) і/або раку (наприклад, гліобластом, таких як гліобластома при синдромі Лі-Фраумені й спорадична гліобластома, злоякісних меланом, протокових аденокарцином підшлункової залози, мієлоїдного лейкозу, гострого мієлогенного лейкозу, мієлодиспластичного синдрому, мієлопроліферативного синдрому, гінекологічного раку, саркоми Капоші, хвороби Гансена, коллагенозного коліту).

У винаході також запропоноване застосування терапевтично ефективної кількості антитіла або його антигенсполучного фрагмента згідно з будь-яким аспектом винаходу, або полінуклеотида за винаходом, або сполуки, фармацевтичної композиції/препарату, або набору із частин за винаходом при одержанні лікарського засобу для лікування й/або діагностики целіакії, аномального загоснення рани, рубцювання, склеродерми, келоїдів і гіпертрофованих фляків, очного рубцювання, запального кишкового захворювання, макулярної дегенерації, офтальмопатії Грейвса, медикаментозного ерготизму, псоріазу, захворювань, пов'язаних з фіброзом (наприклад, фіброзу печінки, фіброзу легенів, такого як інтерстиціальна хвороба легенів і фибротична хвороба легенів, серцевого фіброзу, шкірного фіброзу, мієлофіброзу, фіброзу нирок, такого як гломерулосклероз і тубулоунтерстиціальний фіброз), атеросклерозу, рестенозу, запальних захворювань, аутоімунних захворювань, нейродегенеративних/неврологічних захворювань (наприклад, хвороби Гентингтона, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, поліглутамінового захворювання, спинобульбарної м'язової атрофії, дентаторубро-паллідолоїсової атрофії, спино-церебелярних атаксій 1, 2, 3, 6, 7 і 12, рубропаллідарної атрофії, спиноцеребелярного паралічу) і/або раку (наприклад, гліобластом, таких як гліобластома при синдромі Лі-Фраумені й спорадична гліобластома, злоякісних меланом, протокових аденокарцином підшлункової залози, мієлоїдного лейкозу, гострого мієлогенного лейкозу, мієлодиспластичного синдрому, мієлопроліферативного синдрому, гінекологічного раку, саркоми Капоші, хвороби Гансена, коллагенозного коліту).

У винаході також запропонований спосіб лікування й/або діагностики целіакії, аномального

загоєння рани, рубцювання, склеродерми, келоїдів і гіпертрофованих фляків, очного рубцювання, запального кишкового захворювання, макулярної дегенерації, офтальмопатії Грейвса, медикаментозного ерготизму, псоріазу, захворювань, пов'язаних з фіброзом (наприклад, фіброзу печінки, фіброзу легенів, такого як інтерстиціальна хвороба легенів і фибротична хвороба легенів, серцевого фіброзу, шкірного фіброзу, мієлофіброзу, фіброзу нирок, такого як гломерулосклероз і тубулоінтерстиціальний фіброз), атеросклерозу, рестенозу, запальних захворювань, аутоімунних захворювань, нейродегенеративних/неврологічних захворювань (наприклад, хвороби Гентингтона, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, поліглутамінового захворювання, спинобульбарної м'язової атрофії, дентаторубро-паллідолоїсової атрофії, спино-церебелярних атаксій 1, 2, 3, 6, 7 і 12, рубропаллідарної атрофії, спиноцеребелярного паралічу) і/або раку (наприклад, гліобластом, таких як гліобластома при синдромі Лі-Фраумені й спорадична гліобластома, злоякісних меланом, протокових аденокарцином підшлункової залози, мієлоїдного лейкозу, гострого мієлогенного лейкозу, мієлодиспластичного синдрому, мієлопроліферативного синдрому, гінекологічного раку, саркоми Капоші, хвороби Гансена, коллагенозного коліту) у пацієнта, де даний спосіб включає введення пацієнтові терапевтично ефективної кількості антитіла або його антигенсполучного фрагмента згідно з будь-яким аспектом винаходу, або поліпептида за винаходом, або сполуки, фармацевтичної композиції/препарату, або набору із частин за винаходом.

В «лікуванні» автори винаходу включають як терапевтичне, так і профілактичне лікування суб'єкта/пацієнта. Термін «профілактичне» використовують, як такий, що включає застосування антитіла, лікарського засобу, сполуки, композиції або набору, розкритого в даному винаході, який або попереджає, або знижує ймовірність появи або розвитку патологічного стану або розладу (такого як розлад, пов'язаний з фіброзом) в індивідумі.

Бажано, щоб пацієнт являв собою людину, але пацієнт може являти собою будь-якого іншого ссавця, якому може бути корисно це лікування. Наприклад, пацієнт може являти собою мишу, пацюка, хом'яка, кролика, кішку, собаку, козу, вівцю, мавпу або примата.

Вирази «терапевтично ефективна кількість», або «ефективна кількість», або «терапевтично ефективний», які використовують у даному винаході, стосуються до такої кількості, яка забезпечує терапевтичний ефект для даного стану й режиму введення. Ця кількість являє собою визначену кількість активної речовини, обчислену для одержання бажаного терапевтичного ефекту в комбінації з необхідною добавкою й розріджувачем, тобто носієм або основою для введення. Крім того, мають на увазі, що вони означають кількість, достатню для зниження або попередження клінічно значимого дефіциту активності, функції й відповіді хазяїна. Альтернативно терапевтично ефективна кількість є достатньою, щоб викликати поліпшення в клінічно значимому стані в хазяїна, наприклад, ссавця.

Агенти (тобто антитіло, його антигенсполучний фрагмент, варіант, злиття або похідне), лікарські засоби, сполуки, фармацевтичні композиції/препарати й набори за винаходом можна доставляти, використовуючи ін'єкційну систему доставки лікарських засобів пролонгованого вивільнення. Ці системи спеціально розроблені для зниження частоти інфекцій. Прикладом такої системи є депо-препарат нутропіна, який інкапсулює рекомбінантний гормон росту людини (rhGH; від англ. "recombinant human growth hormone") у біорозкладаних мікросферах, який після ін'єкції вивільняє rhGH повільно протягом пролонгованого періоду. Бажано доставку здійснюють внутрішньом'язово (i.m.) і/або підшкірно (s.c.) і/або внутрішньовенно (i.v.).

Агенти, лікарські засоби, сполуки, фармацевтичні композиції/препарати й набори за винаходом можна вводити за допомогою обладнання, імплантованого хірургічним шляхом, яке вивільняє лікарський засіб безпосередньо в потрібному сайті. Наприклад, Vitrasert вивільняє ганцикловір безпосередньо в оці для лікування ретиніту, викликаного цитомегаловірусом (CMV; від англ. "cytomegalovirus"). У результаті безпосереднього застосування даного токсичного агента в сайті захворювання досягається ефективна терапія без значних системних побічних ефектів лікарського засобу.

Переважаючі лікарські засоби й/або фармацевтичні композиції/препарати по даному винаходу являють собою стандартну дозу, що містить добову дозу або одиницю, добову субдозу або її підходящу частину, активного інгредієнта (інгредієнтів).

Агенти, лікарські засоби, сполуки, фармацевтичні композиції й набори за винаходом звичайно вводять парентеральним шляхом, у формі фармацевтичної композиції, що містить активний інгредієнт (інгредієнти), необов'язково у формі нетоксичної органічної або неорганічної солі приєднання кислоти або основи, у фармацевтично прийнятній дозованій формі. Залежно від розладу й від пацієнта, що підлягає лікуванню, а також від шляху введення, композиції можна вводити в дозах, що варіюють.

У терапії людини агенти, лікарські засоби, сполуки, фармацевтичні композиції/препарати й набори за винаходом можна вводити окремо, але, як правило, їх вводять у суміші з підходящим фармацевтичним ексципієнтом, розріджувачем або носієм, обраним з урахуванням призначеного шляху введення й стандартної фармацевтичної практики.

Агенти, лікарські засоби, сполуки, фармацевтичні композиції/препарати й набори за винаходом можна вводити парентерально, наприклад, внутрішньовенно, внутрішньоартеріально,

інтраперитонально, підбололочно, внутрішньом'язово або підшкірно, або їх можна вводити методами інфузії. Найкраще застосовувати їх у формі стерильного водяного розчину, який може містити інші речовини, наприклад, достатню кількість солей або глюкози, щоб зробити цей розчин ізотонічним із кров'ю. Водяні розчини при необхідності повинні бути відповідним чином забуферені (Бажано до рН від 3 до 9). Одержання підходящих парентеральних препаратів у стерильних умовах легко виконують стандартними фармацевтичними методами, добре відомими фахівцям у даній області техніки.

Лікарські засоби й фармацевтичні композиції, що підходять для парентерального введення, включають водні й неводні стерильні ін'єкційні розчини, які можуть містити антиоксиданти, буфери, бактеріостатики й розчинені речовини, що роблять препарат ізотонічним із кров'ю призначеного реципієнта; і водні й неводні стерильні суспензії, які можуть включати суспендуючі агенти й загущувачі. Лікарські засоби й фармацевтичні композиції можуть бути представлені в контейнерах, що містять однократні дози, або багаторазові дози, наприклад, у запаяних ампулах і флаконах, і їх можна зберігати у висушеному виморожуванні (ліофілізованому) стані, що вимагає тільки додавання стерильного рідкого носія, наприклад, води для ін'єкцій, безпосередньо перед застосуванням. Ін'єкційні розчини й суспензії, приготовлені безпосередньо перед застосуванням, можна готувати зі стерильних порошків, гранул і таблеток раніше описаного виду.

Для парентерального введення пацієнтам-людям рівень добової дози агентів, лікарських засобів і фармацевтичних композицій за винаходом звичайно становить від 1 мкг до 10 мг на дорослу людину в добу, де дану кількість вводять в однократній дозі або в розділених дозах. Лікар у кожному разі визначить дійсне дозування, найбільш підходяще для будь-якого індивідуального пацієнта, і воно варіює залежно від віку, маси тіла й відповіді конкретного пацієнта. Наведені вище дозування є ілюстративними для середнього випадку. Звичайно, можуть бути індивідуальні випадки, де кращі більш високі або більш низькі діапазони дози, і такі випадки перебувають у межах обсягу винаходу.

У характерному випадку лікарські засоби, фармацевтичні композиції/препарати й набори за винаходом містять агент за винаходом при концентрації, що становить від приблизно 2 мг/мл до 150 мг/мл або від приблизно 2 мг/мл до 200 мг/мл. У кращому втіленні винаходу лікарські засоби, фармацевтичні композиції/препарати й набори за винаходом містять агент за винаходом при концентрації 10 мг/мл.

Як правило, у людей парентеральне введення агентів, лікарських засобів, сполук, фармацевтичних композицій/препаратів і наборів за винаходом є кращим шляхом, оскільки він найбільш зручний.

Для ветеринарного застосування агенти, лікарські засоби, сполуки, фармацевтичні композиції/препарати й набори за винаходом вводять у вигляді належним чином прийнятого препарату відповідно до звичайної ветеринарної практики, і ветеринар визначає режим дозування й шлях введення, найбільш підходящий для конкретної тварини.

Даний винахід також включає фармацевтичні композиції/препарати, що містять фармацевтично прийнятні солі приєднання кислоти або основи єднальних угруповань поліпептиду по даному винаходу. Кислоти, використовувані для одержання фармацевтично прийнятних солей приєднання кислоти згаданих вище основних сполук, корисних у даному винаході, являють собою кислоти, що утворюють нетоксичні солі приєднання кислоти, тобто солі, що містять фармакологічно прийнятні аніони, такі як, серед іншого, солі, що представляють собою гідрохлорид, гідробромід, гідройодид, нітрат, сульфат, бісульфат, фосфат, кислий фосфат, ацетат, лактат, цитрат, кислий цитрат, тартрат, бітартрат, сукцинат, малеат, фумарат, глюконат, сахарат, бензоат, метансульфонат, етансульфонат, бензолсульфонат, пара- толуолсульфонат і памоат [тобто 1,1'-метилєн-біс-(2-гідроксі-3-нафтоат)].

Фармацевтично прийнятні солі приєднання основи можна також використовувати для одержання фармацевтично прийнятних сольових форм агентів (тобто антитіла або його антигенсполучного фрагмента) згідно із даним винаходом.

Хімічні основи, які можна використовувати в якості реагентів для одержання фармацевтично прийнятних солей приєднання основи даних агентів, які є кислотними по природі. Являють собою основи, що утворюють нетоксичні солі основ з такими сполуками. Такі нетоксичні солі основ включають, але не обмежені ними, серед іншого солі, утворені з таких фармакологічно прийнятних катіонів, таких як катіони лужних металів (наприклад, калію й натрію) і катіони лужноземельних металів (наприклад, кальцію й магнію), солі приєднання амонію або водорозчинного аміну, такого як N-метилглюкамін (меглумін), і нижчого алканоламмонія, а також інші основні солі фармацевтично прийнятних органічних амінів.

Агенти й/або поліпептид-єднальні угруповання за винаходом можуть бути ліофілізовані для зберігання, і відновлені в підходящому носії перед застосуванням. Можна використовувати будь-який підходящий спосіб ліофілізації (наприклад, розпилювального сушіння, сушіння центрифугуванням) і/або методи відновлення. Фахівцям у даній області техніки зрозуміло, що ліофілізація й відновлення можуть привести до ступеня втрати активності антитіла, що варіює, (наприклад, для стандартних імуноглобулінів антитіла IgM схильні до більшої втрати активності, ніж антитіла IgG), і що може бути необхідним регулювати рівні застосування з підвищенням для її компенсації. В одному втіленні

винаходу ліофілізоване (висушене виморожуванням) поліпептид-єднальне угруповання втрачає не більш, ніж приблизно 20%, або не більш, ніж приблизно 25%, або не більш, ніж приблизно 30%, або не більш, ніж приблизно 35%, або не більш, ніж приблизно 40%, або не більш, ніж приблизно 45%, або не більш, ніж приблизно 50% її активності (до ліофілізації) при регідратації.

Переважним у винаході запропоноване антитіло, сполука, фармацевтична композиція/препарат, набір, застосування або спосіб, де ефективна кількість антитіла або його антигенсполучного фрагмента становить від приблизно 0,0001 мг/кг до 50 мг/кг антитіла або його антигенсполучного фрагмента.

Як зрозуміло фахівцям у даній області техніки, точна кількість сполуки може варіювати залежно від його специфічної активності. Підходящі дозуємі кількості можуть містити визначену кількість активної композиції, обчислену для одержання бажаного терапевтичного ефекту, у комбінації з необхідним розріджувачем. У способах і застосуванні для одержання композицій за винаходом запропонована терапевтично ефективна кількість активного компонента. Терапевтично ефективна кількість може бути визначене звичайним фахівцем у медицині або ветеринаром на підставі характеристик пацієнта, таких як вік, маса, стать, стан, ускладнення, інші захворювання і т.д., як добре відомо в даній області техніки.

У наступному аспекті винаходу запропонований спосіб *in vitro* зниження або інгібування ферментативної активності TG2, де даний спосіб включає введення антитіла або його антигенсполучного фрагменту згідно з будь-яким аспектом винаходу, або полінуклеотида згідно з винаходом, або сполуки або набору за винаходом в зразок, що містить TG2.

«Зразок» може являти собою будь-який зразок, отриманий з підходящого джерела, наприклад, джерела ссавця. Наприклад, зразок може являти собою зразок клітини або тканини, що містить TG2. Ілюстративні тканини включають тканину, отриману з головного мозку, шлунково-кишкового тракту, легені, підшлункової залози, печінки, шкіри, нирки, ока, серця, кровоносних судин, лімфатичних вузлів, спинного мозку й кісткового або гладкого м'яза пацієнта.

У винаході також запропонований спосіб зниження або інгібування ферментативної активності TG2 в індивідуума, що потребує цього, де даний спосіб включає введення індивідуумові ефективної кількості полінуклеотида, що кодує антитіло або його антигенсполучний фрагмент згідно з будь-яким аспектом винаходу.

У наступному аспекті запропоноване застосування полінуклеотида, що кодує антитіло або його антигенсполучний фрагмент згідно з будь-яким аспектом винаходу, при одержанні лікарського засобу для зниження або інгібування ферментативної активності TG2 в індивідуума, що потребує цього.

У винаході також запропонований спосіб *in vitro* зниження або інгібування ферментативної активності TG2, де даний спосіб включає введення полінуклеотида, що кодує антитіло або його антигенсполучний фрагмент згідно з будь-яким аспектом винаходу, у зразок, що містить TG2, наприклад, зразок тканини або клітини, що містить TG2.

У наступному аспекті у винаході запропонований спосіб одержання антитіла або антигенсполучного фрагмента згідно із другим аспектом винаходу або сполуки за винаходом, що містить антитіло або антигенсполучний фрагмент згідно із другим аспектом винаходу, де даний спосіб включає експресію полінуклеотида за винаходом або культивування стабільної лінії клітин-хазяїв за винаходом.

У наступному аспекті у винаході запропонований спосіб відбору антитіла або його антигенсполучного фрагмента що селективно зв'язує білок трансглютаміназу, де даний спосіб включає стадію відбору антитіла або його антигенсполучного фрагмента, що селективно зв'язує поліпептид, що включає центральну ділянку/каталітичний домен трансглютамінази, але не включає складчастий або сендвіч-домен трансглютамінази.

У наступному аспекті у винаході запропонований спосіб відбору антитіла або його антигенсполучного фрагменту відповідно першому або другому аспекту винаходу або сполуки за винаходом, що включає антитіло або антигенсполучний фрагмент відповідно першому або другому аспекту винаходу, де даний спосіб включає стадію відбору антитіла або його антигенсполучного фрагмента, що селективно зв'язує поліпептидну послідовність, яка складається з поліпептидної послідовності з амінокислот 143-473 TG2 людини або її фрагмента.

У втіленні винаходу цей спосіб може бути виконаний, використовуючи фаговий дисплей антитіл. Бажано, щоб антитіло або його антигенсполучний фрагмент являло собою інгібіторне антитіло, що пригнічує каталітичну активність білка трансглютамінази.

У наступному аспекті у винаході запропонований спосіб одержання антитіла або його антигенсполучного фрагмента, що селективно зв'язує білок трансглютаміназу, де даний спосіб включає введення тварині, що відрізняється від людини, сполуки, що включає наступні сполуки:

- i) поліпептид, що включає центральну ділянку/каталітичний домен трансглютамінази, але не включає складчастий або сендвіч-домен трансглютамінази, або його фрагмент; і необов'язково
- ii) ад'ювант.

Розглянуте, що поліпептид, що включає центральну ділянку/каталітичний домен

трансглютамінази, але не включає складчастий або сендвіч-домен трансглютамінази, включає каталітичну тріаду, розкриту вище, і необов'язково також сайт зв'язування ГТФ білка трансглютамінази.

У втіленні винаходу цей спосіб може додатково включати стадію відбору антитіла або його антигенсполучного фрагмента на підставі його селективного зв'язування з білком трансглютаміназою.

У наступному аспекті у винаході запропонований спосіб відбору антитіла або його антигенсполучного фрагмента, що селективно зв'язує білок трансглютаміназу, де даний спосіб включає стадію відбору антитіла або його антигенсполучного фрагмента, що селективно зв'язує поліпептидну послідовність, яка складається з поліпептидної послідовності з амінокислот 143-473 TG2 людини або її фрагмента.

У наступному аспекті у винаході запропонований спосіб одержання антитіла або антигенсполучного фрагмента згідно з будь-яким аспектом винаходу, що включає введення тварині, що відрізняється від людини, сполуки, що включає:

i) поліпептидну послідовність, що складається з поліпептидної послідовності з амінокислот 143-473 TG2 людини, або її фрагмент і необов'язково

ii) ад'ювант.

У втіленні винаходу цей спосіб може додатково включати стадію відбору антитіла або його антигенсполучного фрагмента на підставі його селективного зв'язування з TG2, наприклад, з TG2 людини.

У наступному аспекті у винаході запропоноване антитіло або його антигенсполучний фрагмент, які можуть бути отримані кожним з описаних вище способів одержання або відбору антитіла або його антигенсполучного фрагменту.

В «ад'ювант» автори винаходу включають будь-який фармакологічний або імунологічний агент, що підсилює імунну відповідь реципієнта на поліпептид за винаходом. Імунологічні ад'юванти додають у вакцини для стимуляції відповіді імунної системи на антиген-мішень, але сам по собі він не надає імунітет. Приклади ад'ювантів включають масляні емульсії, неорганічні сполуки, такі як солі алюмінію, наприклад, гідроксид алюмінію або фосфат алюмінію, органічні сполуки, такі як сквален, віросоми або будь-яка інша підходяща сполука або сполуки, як зрозуміло фахівцям у даній області техніки.

У наступному аспекті у винаході запропонований ізольований поліпептид, що складається з наступних послідовностей:

i) поліпептидної послідовності з амінокислот 143-473 TG2 людини;

ii) поліпептидної послідовності з амінокислот 304-326 TG2 людини;

iii) поліпептидної послідовності з амінокислот 351-365 TG2 людини;

iv) поліпептидної послідовності з амінокислот 450-467 TG2 людини; або

його фрагмента, похідного або миметика поліпептиду.

У винаході також запропонований ізольований поліпептид, що кодує поліпептид безпосередньо попереднього аспекту.

У винаході запропоноване антитіло або його антигенсполучний фрагмент, застосовувані при лікуванні патологічного стану, обумовленого активністю TG2, по суті, як розкрито в даному винаході з посиланням на опис і графічні матеріали.

У винаході також запропоноване застосування антитіла або його антигенсполучного фрагмента, по суті, як розкрито в даному винаході з посиланням на опис і графічні матеріали.

Як використовують у даному винаході, форми однини включають посилання на множину, якщо контекст явно не диктує інше. Так, наприклад, посилання на «антитіло» включає множину таких антитіл, а посилання на «дозу» включає посилання на одну або більш доз і їх еквівалентів, відомих фахівцям у даній області техніки, і т.д.

Усі документи, на які посилаються в даному винаході, включені в нього за допомогою посилання.

Далі винахід розкритий більш докладно шляхом посилання на наступні необмежуючі графічні матеріали й Приклади.

Фіг. 1: Одержання рекомбінантного білка TG2 людини

А: кДНК каталітичної центральної ділянки TG2 одержували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з вектора pClineo-hTG2 і вбудовували в плазміді рЕТ 21а. Після ампліфікації в *E. coli* цю кДНК розщеплювали Nhe I і Hind III з вивільненням кДНК центральної ділянки TG2 і розділяли на 1% агарозному гелі (доріжка 3). Розмір смуг визначали в порівнянні із ДНК-маркером 100 п.о. (доріжка 1) і маркером молекулярної маси ДНК фага λ (доріжка 2).

В: Вектор центральної ділянки TG2 рЕТ21а використовували для трансформації штаму BL21-Codonplus(DE3)-RIPL *E. coli*. Експресію індукували, використовуючи ізопропілтіогалактозид (ИПТГ) протягом 4 годин. Центральний білок TG2 утворював нерозчинні тільця, які виділяли з лізатів за допомогою центрифугування. Ці тільця повторно солюбілізували, і His-мічена центральна ділянка TG2 молекулярної маси 37 кДа очищали на колонці з нікелем. 10 нг розділяли за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (ДСН-ПААГ), проводили Вестерн-Блоттінг і гібридизували із зондом, що представляє собою антитіло CUB7402 проти TG2

(доріжка 2), у порівнянні з точним маркером молекулярної маси Precision Plus (доріжка 1).

Фіг. 2: Імунологічна відповідь у мишей на центральний білок rhTG2

А: Тестовані зразки крові брали в 4 мишей, імунізованих каталітичною центральною ділянкою, на добу 45 після першої імунізації й 10 днів після другої бустер-імунізації. Сироватку серійно розводили, і реактивність перевіряли за допомогою ELISA проти іммобілізованого центрального білка TG2.

В: Реактивність додатково перевіряли шляхом скрінінга проти rhTG2 людини й каталітичного центрального домену rhTG2. 20, 40, 80 нг білка фракціонували за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ і переносили за допомогою Вестерн-Блоттинга на полівініліденфторидну (ПВДФ) мембрану. Цю мембрану піддавали імунотестуванню з розведенням сироватки 1:1000. Зв'язування антитіла виявляли, використовуючи γ-ланцюг, специфічний проти миші, мічену пероксидазою хрину (HRP; від англ. "horseradish peroxidase"). Для порівняння розміру використовували точний маркер молекулярної маси Precision Plus.

Фіг. 3: Реактивність гібридом проти членів сімейства TG

А: Аналіз ELISA проводили, використовуючи планшети, покриті рекомбінантними TG (100 нг/лунка), щоб визначити типоспецифічність до TG в 109 супернатантах гібридом, що проявляють високу реактивність на TG2. Зв'язування антитіла виявляли, використовуючи γ-ланцюг, специфічний проти миші, мічену HRP. Показаний випадковий відбір гібридом, підданих скрінінгу, що включають EF4, CG9 і FD8, які показали перехресну реактивність.

В: Дев'ять відібраних гібридів піддавали подвійному клонуванню. IgG очищали й тестували на реактивність при 0,1 мкг/мол проти рекомбінантних TG1, TG2, TG3, TG7 і Фактора XIIIa людини, використовуючи аналіз ELISA із планшетами, покритими 100 нг кожної TG. Дані являють собою середнє значення оптичної щільності (OD; від англ. "optical density") в 3 окремих аналізах ELISA ± стандартна помилка середнього (SEM; від англ. "standard error of the mean").

Фактор XIIIa позначений на графіках як TG13.

Фіг. 4: Ідентифікація гібридом, що володіє інгібіторною активністю проти TG2

Кондиціоновані середовища з 32 лунок гібридом, що володіють специфічністю до TG2, піддавали скрінінгу на їхні дії на активність 100 нг rhTG2, використовуючи аналіз включення ³H путресцине. Хімічний універсальний інгібітор TG2 1,3-диметил-2-[(оксо-пропіл)тіо]імідазолія хлорид використовували як позитивний контроль на інгібування. Середовище RPMI (некондиціоноване середовище) використовували в якості негативного контролю. 500 нг інгібіторного антитіла до TG2, випробуваного фірмою Quark Biotechnology, включали для порівняння. Дані являють собою середнє число імпульсів у хвилину (cpm; від англ. "counts per minute"), включене за 30 хв щонайменше від трьох експериментів, проведених у двох повторях, ±SEM. Столпчики, виділені сірим кольором, показують значиме інгібування TG2 (p<0,05).

Фіг. 5: Картування епітопів інгібіторного антитіла

Кожне інгібіторне моноклональне антитіло зв'язували із планшетом ELISA і піддавали пенінгу проти фагової бібліотеки TG2 людини. Зв'язування фага з антитілом рятували, ампліфікували й піддавали 4 додатковим раундам пенінга. Потім фрагменти бібліотеки TG2 у фазі секвенували, і послідовності, що перекриваються, використовували для визначення епітопа для кожного антитіла. Потім послідовності, загальні між антитілами, використовували для визначення консенсус-послідовності для конкретного інгібіторного епітопа, і антитіла групували відповідно. Було ідентифіковано 3 інгібіторних епітопа.

Фіг. 6: Структурна локалізація інгібіторних епітопів у каталітичній центральній ділянці TG2

Амінокислотну послідовність TG2 вводили в програму PyMol і створювали 3D-графічне зображення структури в її відкритому, Ca²⁺ активованому стані з передбачуваними сайтами зв'язування кальцію (бірюзовий колір) і каталітичною тріадою (сірий колір), показаної для порівняння (ліва панель). Потім додавали інгібіторні консенсус-епітопи в синьому кольорі (антитіло групи 1 – сайт AB1), червоному кольорі (антитіло групи 2 – сайт DF4) і жовтому кольорі (антитіло групи 3, сайт DD9).

Фіг. 7: Послідовність VL інгібіторних антитіл

РНК із кожної інгібіторної гібридом екстрагували, піддавали зворотній транскрипції й ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи вироджені праймери FR1, праймери MH1 і MH2 і 3 праймери константної області для ампліфікації генів VH. Отримані в результаті послідовності VH і VK показані для AB1.

Фіг. 8. Ефективність AB1 при інгібуванні активності TG2 у гомогенаті клітин

А: Клітини HerG2 піддавали лізису, і 45 мкг білка змішували з 750 нг IgG від AB1, DH2, DD9, BB7, DC1 і EH6 протягом 20 хвилин. Потім цю суміш аналізували, використовуючи аналіз активності TG на підставі включення ³H путресцина з відбором зразків через 1 годину. Швидкість реакції обчислювали й виражали у вигляді відсотка того ж лізату, проінкубованого з випадковим антитілом (MAB002). Дані являють собою середній відсоток інгібування ± SEM від 2 окремих експериментів, проведених у двох повторях. * p<0,05

В: Клітини HerG2 піддавали впливу зростаючих концентрацій глюкози протягом 96 годин для підвищувальної регуляції експресії TG2. Клітини збирали, піддавали лізису, і 25 мкг лізату

фракціонували за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ, переносили за допомогою Вестерн-Блоттинга й піддавали імунотестуванню з розчином 1 нг/мол АВ1 IgG, використовуючи результат хемілюмінесценції.

Фіг. 9. (Таблиця 1): Порівняльні значення IC_{50} для інгібіторних антитіл TG2

Для визначення значення IC_{50} для кожного антитіла проти людини, пацюка й миші використовували аналіз 3H путресцину. 100 нг TG2 людини або 25 нг TG2 миші й пацюка використовували для постановки реакції, де приблизно 3000 cpm путресцину було включено в годину в 10 мкл реакційної суміші. Потім наносили серійні розведення кожного антитіла, починаючи з додавання в реакційну суміш 500 нг (кінцева концентрація 5 мкг/мол), і інкубували з TG2 протягом 20 хвилин перед активацією реакції. Значення IC_{50} обчислювали шляхом визначення концентрації, при якій ферментативна швидкість реакції була знижена на 50%, використовуючи відповідну криву найкращого наближення в програмі GraphPad Prism. Значення виражені у вигляді кількості IgG у мкг/мл у реакції, яке інгібувало б 1 нг TG2.

Фіг. 10. Позаклітинна активність TG у клітинах HK2 у відповідь на інгібування TG2

Клітини HK2 висівали на фібронектин і інкубували протягом 2 годин у присутності 0,1 М біотинкадаверину або з 4 нг/мкл антитіла проти TG2 людини (AB1) (частина А), або з 4 нг/мкл антитіла проти TG2 людини (DC1) (частина В), або з 400 мкм сайт-специфічного універсального інгібітору TG 1,3-диметил-2-[(2-оксо-пропіл)тіо]імідазоліа хлориду. Позаклітинну активність TG вимірювали на підставі включення біотинкадаверину у фібронектин, де включення виявляли, використовуючи екстравадин-HRP і субстрат тетраметилбензидин (ТМБ). Зміни оптичної щільності вимірювали при 450 нм у зчитувальному обладнанні для 96-ямкових планшетів. Дані являють собою середню OD при 450 нм, скоректовану на 1 мг клітинного білка. $n = 6$ лунок на експериментальну групу.

Фіг. 11. Порівняння інгібування TG2 антитілом АВ1 з інгібуванням Fab фрагментом інгібіторного антитіла до TG2 Quark, використовуючи аналіз включення 3H путресцину

100 нг hTG2 аналізували на активність TG2 на підставі включення 3H путресцину в диметилказеїн протягом 60-хвилинного періоду з додаванням або 1 мкг Fab фрагмента антитіла, розкритого автором Quark у документі WO2006/100679 і синтезованого в Sheffield University, або 500 нг АВ1. Дані являють собою середню активність TG у вигляді включення 3H путресцину (cpm) \pm SEM від 3 незалежних експериментів, проведених у двох повторях.

Фіг. 12. Порівняння відсотка інгібування TG2 антитілом АВ1 з інгібуванням Fab фрагментом інгібіторного антитіла до TG2 Quark, використовуючи аналіз включення 3H путресцину

Дані з фіг. 11 альтернативно виражали у вигляді відсотка активності TG у кожний момент часу, щоб виявити відносно порівняльне вимикання активності TG2 у результаті застосування антитіла АВ1 і Fab фрагмента антитіла Quark.

Фіг. 13. Порівняння інгібування TG2 антитілом АВ1 з інгібуванням рекомбінантним IgG пацюка інгібіторного антитіла TG2 Quark, використовуючи аналіз включення 3H путресцину

100 нг hTG2 аналізували на активність TG2 на підставі включення 3H путресцину в диметилказеїн протягом 60-хвилинного періоду з додаванням або 500 нг рекомбінантного варіанта інгібіторного антитіла до TG2 пацюка, розкритого автором Quark у документі WO2006/100679 і синтезоване в Medical Research Council Technology, або 500 нг АВ1. Дані являють собою середню активність TG у вигляді включення 3H путресцину (cpm) \pm SEM від 3 незалежних експериментів, проведених у двох повторях.

Фіг. 14. Порівняння відсотка інгібування TG2 антитілом АВ1 з інгібуванням рекомбінантним IgG пацюка інгібіторного антитіла TG2 Quark, використовуючи аналіз включення 3H путресцину

Дані з фіг. 13 альтернативно виражали у вигляді відсотка активності TG у кожний момент часу, щоб виявити відносно порівняльне вимикання активності TG2 у результаті застосування антитіла АВ1 і рекомбінантного IgG пацюка Quark.

Фіг. 15. Дія АВ1 на рівні ВКМ у клітинах HK2

Рівні зрілого колагену в клітинах HK-2 вимірювали на підставі включення 3H проліну у ВКМ протягом 76-годинного періоду або з додаванням, або без додавання інгібіторного антитіла АВ1 до TG2. Дані являють собою включення 3H проліну на мг клітинного білка, виражене у вигляді відсотка середнього рівня в неопрацьованих клітинах \pm SEM. $n=2$.

Фіг. 16. Аналіз ELISA зв'язування гуманізованих варіантів антитіл

Супернатанти із клітин HEK293F, котрансфікованих різними комбінаціями векторів гуманізованих легких ланцюгів і важкого ланцюга, аналізували в аналізі ELISA IgG проти людини для визначення концентрації в аналізі ELISA проти huTG2. Кожний супернатант аналізували в трьох повторях і визначали значення IC_{50} . найбільш ефективна комбінація була відібрана для подальшого дослідження й у якості гуманізованого антитіла-кандидата.

Фіг. 17. Тестування антитіла MRC Quark CTD190 на TG2 людини за допомогою ELISA

В 96-ямкові планшети поміщали hTG2 (1 мкг/мол) у карбонатному буфері протягом ночі, і виявлення за допомогою ELISA проводили, використовуючи 100 нг/мол першого антитіла. Виявлення проводили, використовуючи IgG проти миші (SIGMA 3673) для CUB і IgG проти пацюка (SIGMA A5795)

для Quark (обоє розведення 1:5000). Антитіло Quark, отримане MRC T, реагує з TG2 людини.

Фіг. 18: РНК із гібридами АВ1 екстрагували, піддавали зворотній транскрипції й ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи вироджений праймер сигнальної послідовності MHV4 із праймером константної області важкого ланцюга MHCG1, або використовуючи вироджений праймер сигнальної послідовності MKV4 із праймером константної області легкого ланцюга каппа MKC. Представлені отримані в результаті послідовності VH і VK.

Фіг. 19: РНК із гібридами BB7 екстрагували, піддавали зворотній транскрипції й ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи вироджений праймер сигнальної послідовності MHV4 із праймером константної області важкого ланцюга MHCG1, або використовуючи вироджений праймер сигнальної послідовності MKV4 із праймером константної області легкого ланцюга каппа MKC. Представлені отримані в результаті послідовності VH і VK.

Фіг. 20: РНК із гібридами DC1 екстрагували, піддавали зворотній транскрипції й ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи вироджений праймер сигнальної послідовності MHV4 із праймером константної області важкого ланцюга MHCG1, або використовуючи вироджений праймер сигнальної послідовності MKV4 із праймером константної області легкого ланцюга каппа MKC. Представлені отримані в результаті послідовності VH і VK.

Фіг. 21: РНК із гібридами JE12 екстрагували, піддавали зворотній транскрипції й ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи 5' ПЦР зі швидкою ампліфікацією кінців кДНК (RACE-PCR) із праймером константної області важкого ланцюга MHCG1, або використовуючи праймер сигнальної послідовності MKV1 із праймером константної області легкого ланцюга каппа MKC. Представлені отримані в результаті послідовності VH і VK.

Фіг. 22: РНК із гібридами EH6 екстрагували, піддавали зворотній транскрипції й ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи 5' RACE-PCR із праймером константної області важкого ланцюга MHCG2B, або використовуючи праймер сигнальної послідовності MKV із праймером константної області легкого ланцюга каппа MKC. Представлені отримані в результаті послідовності VH і VK.

Фіг. 23: РНК із гібридами AG9 екстрагували, піддавали зворотній транскрипції й ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи вироджений праймер сигнальної послідовності MHV7 із праймером константної області важкого ланцюга MHCG1, або використовуючи суміш вироджених праймерів сигнальної послідовності MKV1 - 11 із праймером константної області легкого ланцюга каппа MKC. Представлені отримані в результаті послідовності VH і VK.

Фіг. 24: РНК із гібридами AH3 екстрагували, піддавали зворотній транскрипції й ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи вироджений праймер сигнальної послідовності MHV7 із праймером константної області важкого ланцюга MHCG2B, або використовуючи праймер сигнальної послідовності із праймером константної області легкого ланцюга каппа MKC. Представлені отримані в результаті послідовності VH і VK.

Фіг. 25: РНК із гібридами DD9 екстрагували, піддавали зворотній транскрипції й ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи 5' RACE-PCR із праймером константної області важкого ланцюга MHCG2A, або використовуючи вироджений праймер сигнальної послідовності MKV5 із праймером константної області легкого ланцюга каппа MKC. Представлені отримані в результаті послідовності VH і VK.

Фіг. 26: РНК із гібридами DH2 екстрагували, піддавали зворотній транскрипції й ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи 5' RACE-PCR із праймером константної області важкого ланцюга MHCG2B, або використовуючи вироджений праймер сигнальної послідовності MKV45 із праймером константної області легкого ланцюга каппа MKC. Представлені отримані в результаті послідовності VH і VK.

Фіг. 27: РНК із гібридами DD6 екстрагували, піддавали зворотній транскрипції й ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи 5' RACE-PCR із праймером константної області важкого ланцюга MHCG2B, або використовуючи 5' RACE-PCR із праймером константної області легкого ланцюга лямбда MLC. Представлені отримані в результаті послідовності VH і VL.

Фіг. 28: РНК із гібридами IA12 екстрагували, піддавали зворотній транскрипції й ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи вироджений праймер сигнальної послідовності MHV9 із праймером константної області важкого ланцюга MHCG1, або використовуючи вироджений праймер сигнальної послідовності CL14 із праймером константної області легкого ланцюга каппа MKC. Представлені отримані в результаті послідовності VH і VK.

Фіг. 29. Криві доза-відповідь і значення IC_{50} для ферментативного інгібування рекомбінантної TG2 людини химерними антитілами проти TG2: (a) cAB003, (b) cBB001, (c) cDC001, (d) cDD9001, (e) cDH001 і (f) наявним у продажі антитілом CUB7402 TG2. Значення IC_{50} являють собою середні значення 3 незалежних експериментів.

Фіг. 30. Криві доза-відповідь і значення IC_{50} для ферментативного інгібування рекомбінантної TG2 яванського макака химерними антитілами проти TG2: (a) cDC001 і (b) комерційні антитіло до TG2 CUB7402.

Фіг. 31. Криві доза-відповідь і значення IC_{50} для ферментативного інгібування рекомбінантної TG2

людини гуманізованими антитілами проти TG2: (a) hBB001AA, (b) hBB001BB, (c) hAB005 і (d) hAB004.

Фіг. 32. Криві доза-відповідь і значення IC_{50} для ферментативного інгібування рекомбінантної TG2 яванського макака гуманізованими антитілами проти TG2: (a) hBB01AA і (b) hAB004.

Фіг. 33. Криві доза-відповідь і значення IC_{50} для ферментативного інгібування рекомбінантної TG2 людини мишачими моноклональними антитілами проти TG2: (a) mAB003, (b) mBB001, (c) mDC001, (d) mDD9001, (e) mDH001 і (f) mDD6001.

Фіг. 34. Аналіз зв'язування ELISA гуманізованими варіантами антитіл AB1.

Супернатанти клітин HEK293F, котрансфікованих різними комбінаціями векторів легких ланцюгів гуманізованого AB1 і важкого ланцюга AB1 оцінювали в аналізі ELISA проти IgG людини, щоб визначити концентрацію в аналізі ELISA антитіла проти huTG2. Кожний супернатант аналізували в трьох повторях і визначали значення IC_{50} . найбільш ефективна комбінація була відібрана для подальших досліджень і в якості гуманізованого антитіла-кандидата.

Фіг. 35. Криві доза-відповідь аналізу зв'язування ELISA і дані EC_{50} для зв'язування наступних антитіл з TG2 людини: (a) химерних антитіл cDD9001, cDH001, cDC001, комерційного антитіла до TG2 CUB7402 і контролю, спорідненого за ізотипом, (b) химерного антитіла cBB1 і контролю, спорідненого за ізотипом, і (c) химерного антитіла cAB003 і контролю, спорідненого за ізотипом.

Фіг. 36. Криві доза-відповідь аналізу зв'язування ELISA і дані EC_{50} для зв'язування наступних антитіл з TG2 яванського макака: (a) химерних антитіл cDD9001, cDH001, cDC001, комерційного антитіла до TG2 CUB7402 і контролю, спорідненого за ізотипом, (b) химерного антитіла cBB001 і контролю, спорідненого за ізотипом, і (c) химерного антитіла cAB003 і контролю, спорідненого за ізотипом.

Фіг. 37. Криві доза-відповідь аналізу зв'язування ELISA і дані EC_{50} для зв'язування наступних антитіл з TG2 людини: (a) гуманізованих антитіл hBB001AA, hBB001BB, комерційного антитіла до TG2 CUB7402 і контролю, спорідненого за ізотипом, і (b) гуманізованого антитіла hAB004.

Фіг. 38. Криві доза-відповідь аналізу зв'язування ELISA і дані EC_{50} для зв'язування наступних антитіл з TG2 яванського макака: (a) гуманізованих антитіл hBB001AA, hBB001BB, комерційного антитіла до TG2 CUB7402 і контролю, спорідненого за ізотипом, і (b) гуманізованого антитіла hAB004.

Фіг. 39: Єднальна активність гуманізованого AB1 з позаклітинним TG2

Інгібування активності позаклітинної TG2, продукуючої клітинами HK2, аналізували, використовуючи вимір включення біотин-кадаверину у фібронектині за допомогою ELISA. Показаний приклад кривої, що показує інгібування активності TG2 гуманізованим AB1 (hAB005) і отримане значення IC_{50} .

Фіг. 40: Єднальна активність гуманізованого BB7 з позаклітинним TG2

Інгібування активності позаклітинної TG2, продукуючої клітинами HK2, аналізували, використовуючи вимір включення біотин-кадаверину у фібронектині за допомогою ELISA. Показаний приклад кривої, що показує інгібування активності TG2 гуманізованим BB7 (hBB001AA і hBB001BB) і отримані значення IC_{50} .

Фіг. 41: Результати контрольного аналізу цитохалазіну D, R281 і ZDON методом заростання подряпини й результати аналізу комерційного антитіла CUB7402 методом заростання подряпини

Аналізи методом заростання подряпини проводили, використовуючи клітини WI-38, після висівання й вирощування протягом ночі клітини промивали в середовищі без сироватки й створювали подряпину в моношарі клітин, використовуючи маркер подряпини Essen Wound Maker. Середовище видаляли й заміняли 95 мкл/лунка середовища без сироватки, що містить контролю й тестовані антитіла. Планшет вміщували в інтерактивну систему для тривалих клітинних досліджень Essen Incucyte, і заростання подряпини аналізували, використовуючи програмне забезпечення Incucyte. Відносну щільність подряпини наносили на графік проти часу для контролів цитохалазіну D, R281 і Z-Dop (панель A) і комерційного антитіла CUB7402 і цитохалазіну (панель B).

Фіг. 42: Результати аналізу гуманізованого BB7 методом заростання подряпини

Аналізи методом заростання подряпини проводили, використовуючи клітини WI-38, після висівання й вирощування протягом ночі клітини промивали в середовищі без сироватки й створювали подряпину в моношарі клітин, використовуючи маркер подряпини Essen Wound Maker. Середовище видаляли й заміняли 95 мкл/лунка середовища без сироватки, що містить контролю й тестовані антитіла. Планшет вміщували в інтерактивну систему для тривалих клітинних досліджень Essen Incucyte, і заростання подряпини аналізували, використовуючи програмне забезпечення Incucyte. Відносну щільність подряпини наносили на графік проти часу для гуманізованого антитіла hBB001 AA і контролю цитохалазіну D (панель A) і hBB001BB і контролю цитохалазіну D (панель B).

Фіг. 43: Результати аналізу гуманізованого AB1 методом заростання подряпини

Аналізи методом заростання подряпини проводили, використовуючи клітини WI-38, після висівання й вирощування протягом ночі клітини промивали в середовищі без сироватки й створювали подряпину в моношарі клітин, використовуючи маркер подряпини Essen Wound Maker. Середовище видаляли й заміняли 95 мкл/лунка середовища без сироватки, що містить контролю й тестовані антитіла. Планшет поміщали в інтерактивну систему для тривалих клітинних досліджень Essen

Incucyte, і заростання подряпини аналізували, використовуючи програмне забезпечення Incucyte. Відносну щільність подряпини наносили на графік проти часу для гуманізованого hAB005 і контролю цитохалазіну D.

Фіг. 44: Результати аналізу химерного антитіла DC1 методом заростання подряпини

Аналізи методом заростання подряпини проводили, використовуючи клітини WI-38, після висівання й вирощування протягом ночі клітини промивали в середовищі без сироватки й створювали подряпину в моношарі клітин, використовуючи маркер подряпини Essen Wound Maker. Середовище видаляли й заміняли 95 мкл/лунка середовища без сироватки, що містить контролю й тестовані антитіла. Планшет поміщали в інтерактивну систему для тривалих клітинних досліджень Essen Incucyte, і заростання подряпини аналізували, використовуючи програмне забезпечення Incucyte. Відносну щільність подряпини наносили на графік проти часу для химерного антитіла cDC001 і контролю цитохалазіну D.

Фіг. 45: Зв'язування TG2 людини з іммобілізованим антитілом cAB003 методом Biacore

Фази асоціації введення TG2 людини на біосенсор, покритий cAB003 при концентрації 25, 50, 100 і 200 нм, включаючи введення у двох повторях при 50 нм, показані ліворуч. З того ж експерименту реєстрували дві тривалі фази дисоціації, як показано праворуч. Збіги показані у вигляді суцільних чорних ліній, і результати наведено в таблиці 25.

Фіг. 46: Зв'язування TG2 яванського макака з іммобілізованим антитілом hAB004 методом Biacore

Фази асоціації введення TG2 яванського макака на біосенсор, покритий hAB004, при концентраціях 25, 50, 100, 200 і 400 нм, включаючи введення у двох повторях при 50 нм, показані ліворуч. З того ж експерименту реєстрували дві тривалі фази дисоціації, як показано праворуч. Збіги показані у вигляді суцільних чорних ліній, і результати наведено в таблиці 26.

Фіг. 47: Зв'язування TG2 людини з іммобілізованим антитілом cDH001 методом Biacore під час відсутності кальцію

Фази асоціації введення TG2 людини на біосенсор, покритий cDH001, при концентраціях 25, 50, 100 і 200 нм, включаючи введення у двох повторях при 50 нм, показані ліворуч. З того ж експерименту реєстрували дві тривалі фази дисоціації, як показано праворуч. Збіги показані у вигляді суцільних чорних ліній, і результати наведено в таблиці 25.

Приклад 1: Розробка інгібіторного антитіла до TG2, що підходить для терапевтичного застосування в людини, з ідентифікацією 3 специфічних інгібіторних епітопів

Трансглютаміназа типу 2 (TG2) каталізує утворення ϵ -(γ -глутаміл)-лізін-ізопептидного зв'язку між пептидами, що примикають, або білками, включаючи пептиди або білки позаклітинного матриксу (ПКМ). Підвищений рівень позаклітинної TG2 приводять до прискореного депонування й зниженому кліренсу ПКМ, що лежить в основі рубцювання тканини й фіброзу. Цей підвищений рівень також пов'язаний із целіацією, нейродегенеративними розладами й деякими раками. Хоча розроблені численні сполуки, що інгібують трансглютамінази, жодна з них не має специфічності до TG2 і до певного ступеня інгібує всі трансглютамінази. Хоча ці сполуки дали можливість провести дослідження обґрунтованості концепції про роль TG2 у цих патологіях, відсутність специфічності до ізоформи не дозволяло застосовувати їх у людини. Щоб розв'язати цю проблему, автори винаходу почали розробку високоафінного TG2-специфічного антитіла, яке інгібувало б активність тільки TG2.

Рекомбінантний білок, що включає амінокислоти 143-473 центральної ділянки TG2 людини, продукували в *Escherichia coli*, піддавали рефолдингу, і 100 мкг ін'єкували 4 мишам з бустер-ін'єкціями через 2, 5, 7 і 10 тижнів. Селезінки виділяли через 4 доби після останньої бустер-ін'єкції, і спленоцити піддавали злиттю із клітинами мієломи Sp2/0-ag-14. Сімдесят п'ять супернатантів гібридом показали специфічність до TG2. Ці супернатанти гібридом піддавали скрінінгу на їхню здатність до інгібування активності TG2 в аналізі включення путресцину, що містить 100 мкг TG2. Десять TG2-специфічних супернатантів були інгібіторними. Потім їх піддавали подвійному клонуванню. Використовуючи Фаговий дисплей для скрінінга бібліотеки фрагментів TG2, кожне антитіло картували до точних епітопів центрального домену TG2 і визначили 3 окремих інгібіторних епітопи. Була визначена кількість антитіла для зниження активності 100 нг TG2 на 50%.

2 найбільш ефективних антитіла, AB1 і DC1, зв'язувалися з амінокислотами 304-327 і мали IC_{50} , рівну $1,1 \times 10^{-5}$ мг/мл IgG на нг рекомбінантного TG2. Нанесення AB1 і DC1 було здатне успішно інгібувати TG2 у клітинах Her2G людини й позаклітинну TG2 у клітинах HK-2 людини при внесенні в культуральне середовище.

Таким чином, імунізація мишей центральним доменом TG2 неочікувано забезпечувала утворення моноклональних антитіл, націлених на раніше не описані епітопи в межах каталітичної центральної ділянки. Ці антитіла є специфічними, ефективно інгібують активність TG2 і підходять для застосування *in vivo*.

Матеріали й методи

Одержання каталітичного центрального домену трансглютамінази 2

Каталітичний центральний домен TG2 людини (залишки Cys143 – Met 473 TG2) експресували, піддавали рефолдингу й очищали, щоб дати можливість імунізації в мишей. Каталітичний центральний

домен (Сенсовий (сенси)-праймер ПЦР: GCG CGC GCT AGC TGC CCA GCG GAT GCT GTG TAC CTG GAC, антисенсовий (антисенси)-праймер: GCG CGC AAG CTT CAT CCC TGT CTC CTC CTT CTC GGC CAG) клонували в експресійному векторі pET21a(+) і експресували у вигляді нерозчинних тілець включення в штамі BL21-Codonplus(DE3)-RIPL E. coli (Agilent Technologies). Коротко, 50 мкл компетентних клітин BL21 (DE3) plyss трансформували 1 мкл експресійної плазмиди (30 нг/мкл) і висівали на чашки Петрі з агаром Лурія-Бертані (LB), що містить селективні антибіотики (100 мкг/мол ампіциліну, 34 мкг/мол хлорамфеніколу) і 1% глюкози, і інкубували протягом ночі при 37 °С. Окрему колонію збирали й висівали в 10 мл свіжого середовища LB, що містить 100 мкг/мол ампіциліну, 34 мкг/мол хлорамфеніколу й 1% глюкози у струшувачі-інкубаторі при 37 °С і при 200 об/хв. Після вирощування протягом ночі культури переносили в 100 мл середовища 2xYT з 1% глюкозою й вирощували до оптичної щільності (OD)_{600 нм} 0,8, а потім переносили в 1 л середовища 2xYT доти, поки OD_{600 нм} знову не досягала 0,8. Після 4 годин індукції 1 мМ ИПТГ для стимуляції експресії, осаджували, і бактерії піддавали лізису шляхом обробки ультразвуком у буфері А (10 мМ Тріс; 1 мМ етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА); 10 мМ дітіотрейтол (ДТТ); 1 мМ фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ); 0,5 мг/мл пігулок інгібітору протеази лізоциму (Roche), рН 8,0). Тільця включення збирали шляхом центрифугування при 40000 x g і промивали три рази в відмивочному буфері В (50 мМ Тріс; 1 мМ ЕДТА; 10 мМ ДТТ; 2% деоксіхолат натрію, рН 8,0), після чого піддавали кінцевому відмиванню в деіонізованій воді.

Тільця включення солюбілізували в 3,5 мл буфера для ресольюбілізації (40 мМ Тріс-НCl, 8 М сечовина й 10 мМ ДТТ, рН12) і піддавали рефолдингу протягом 16-годинного періоду в буфері для рефолдингу (40 мМ Тріс-НCl; 150 мМ NaCl; 20% гліцерин; 5 мМ цистеїн; 0,5 мМ цистин рН 8) при 4 °С у темряві.

Ресольюбілізовані тільця включення наносили на стовпчик з нікелем обсягом 1 мл. Коротко, колонку попередньо врівноважували єднальним буфером (40 мМ Тріс; 300 мМ NaCl; 10 мМ імідазол) і наносили тільця включення. Колонку інтенсивно промивали (40 мМ Тріс; 300 мМ NaCl; 30 мМ імідазол). Рекомбінантний білок елюїрували високою концентрацією імідазольного буфера (40 мМ Тріс; 300 мМ NaCl; 300 мМ імідазол). Елюїровані фракції, що містять білок, поєднували й піддавали діалізу протягом ночі проти підходящого буфера (40 мМ Тріс; 300 мМ NaCl рН 8). Білок оцінювали, використовуючи аналіз білка по Бредфорду.

Культура клітин і лізати HepG2

Клітини HepG2 були люб'язно надані Richard Ross (University of Sheffield). Клітини рутинно вирощували при 37 °С в 95% зволоженій атмосфері при 5% CO₂ у модифікованому Дульбекко середовищі Голка (DMEM; від англ. "Dulbecco modified Eagle's medium")/4,5 г на літр глюкози, з додаванням 10% фетальної сироватки теляти (ФСТ), 100 МЕ пеніциліну й 100 мкг/мл стрептоміцину, 2 мМ L-глутамін (усі компоненти від фірми GIBCO). Два мільйони клітин висівали на 10 см чашки Петрі й вирощували протягом 48 годин. Клітини піддавали лізису в 250 мкл буфера STE (0,32 М сахароза, 5 мМ Тріс, 1 мМ EDTA, що містить інгібітори протеаз фенілметилсульфонілфторид (1 мМ), бензамідин (5 мМ) і лейпептин (10 мкг/мл) і обробляли ультразвуком на льоду з одержанням клітинного лізата, корисного в аналізі активності TG2.

Клітини нирок людини 2 (HK2; від англ. "Human Kidney")

Клітини HK-2 (циліндричний епітелій проксимального каналця нирки) придбавали з Європейської колекції клітинних культур, пасаж 3. Клітини рутинно вирощували при 37 °С в 95% зволоженій атмосфері 5% CO₂ у середовищі без сироватки для кератиноцитів (KSFM, Gibco 17005-042) з L-глутаміном, з додаванням рекомбінантного епітеліального фактора росту (EGF; від англ. "epithelium growth factor") (0,1-0,2 нг/мл) і екстракт бичачого гіпофіза (20-30 мкг/мл). Для пересівання середовище видаляли, і клітини промивали 1 x фосфатно-сольовим буферним розчином (ФСБ), після чого тріпсінізували 1 мл 0,25% трипсин/ЕДТА (флакон T75) протягом 1 хвилини при 37 °С. Клітини ресуспендували в 10 мл KSFM і центрифугували при 400 g протягом 1 хвилини. Середовище видаляли, і клітини висівали в KSFM (нормальним є поділ від 1:3 до 1:5). Клітини використовували в експерименті при пасажах 5-14. У характерному випадку клітини вирощували до 95% конфлюентності.

Забарвлення Кумассі й Вестерн-Блоттінг

Чистоту рекомбінантних білків перевіряли шляхом поділу 5 мкг виділеного білка на 10% (мас/об) поліакриламідному денатуруючому гелі й забарвлювали розчином Кумассі діамантового синього R для фарбування (Sigma).

Підтвердження синтезу центрального білка TG2, а також вимір рівнів реактивності TG2 і центральної ділянки TG2 після імунізації проводили за допомогою Вестерн-Блоттінга. Рекомбінантні білки (від 10 до 80 нг) наносили на 10% (мас/об) поліакриламідний денатуруючий або не денатуруючий гель по необхідності й переносили на ПВДФ мембрани (Transblot SD, Biorad, UK) протягом однієї години при 100 В. Мембрани блокували протягом ночі при 4 °С 3% (мас/об) бичачим сироватковим альбуміном (BCA) у сольовому Тріс-Буфері (ТБС)/0,1% (об/об) Твін 20. Потім мембрани промивали й піддавали імунотестуванню моноклональними антитілами миші проти трансклутамінази в ТБС/Твін, що містить 1% BCA. Для підтвердження рекомбінантного центрального білка TG2, і в

якості позитивного контролю для скрінінга антитіл використовували комерційне антитіло Sub7402 (Neomarkers) при розведенні 1:1000. Зв'язування першого антитіла виявляли за допомогою другого антитіла, що представляє собою гамма-ланцюг проти миші, зшитий з пероксидазою хрину (HRP) (Sigma, Poole, UK). Смуги візуалізували, використовуючи хемілюмінесцентну систему виявлення ECL (Amersham, UK).

Імунізація мишей і злиття

Кожну мишу імунізували сумішшю 50 мкг антигену (доведеного до обсягу 50 мкл стерильним ФСБ) і 50 мкл повного ад'юванту Фрейнда. Ін'єкували чотирьох мишей (вік 8-12 тижнів) BALB/C. Дві бустер-імунізації проводили (доба 14 і доба 35), використовуючи такий же протокол, за винятком того, що для цих ін'єкцій використовували неповний ад'ювант Фрейнда. На добу 45 у всіх тварин брали кров для тестування й оцінювали на реактивність до TG2 за допомогою ELISA.

Двох кращих респондерів піддавали додатковій бустер-ін'єкції 100 мкг центрального білка (у ФСБ), знову змішаного з неповним ад'ювантом Фрейнда через 10 тижнів, і через 4 доби тварин умертвляли для виділення спленоцитів і злиття із клітками міеломи Sp2/0-Ag-14. З даного злиття приблизно 1000 лунок піддавали скрінінгу на реактивність до білка TG2 за допомогою ELISA.

Скрінінг на специфічність до TG2

Кондиціоноване середовище й очищений IgG тестували на реактивність до членів сімейства трансглютаміназ. Здатність кожного з них до зв'язування кожної трансглютамінази (TG1, TG2, TG3, TG5, TG7 і Фактора XIIIa; усі білки від фірми Zedira) визначали, використовуючи планшетний аналіз зв'язування. Микротитраційні планшети (Costar, Cambridge, UK) покривали рекомбінантним TG (Zedira, Darmstadt, Germany) в 50 мкл 0,1 М бікарбонатного/карбонатного буфера (pH 9,6) протягом ночі при 4 °C. Планшети блокували протягом 2 год при 37 °C 200 мкл ФСБ, що містить 3% мас/об БСА. Планшети промивали три рази ФСБ, що містить 0,05% Твін 20 (відмивочний буфер), і додавали 100 мкл розведеного кондиціонованого середовища (розведення від 1:5 до 1:20) або очищені моноклональні антитіла (mAb; від англ. "monoclonal antibodies") до каталітичної центральної ділянки TG2. Планшети інкубували ще протягом 1 год при кімнатній температурі. Стадію відмивання повторювали й додавали гамма-ланцюг проти миші – пероксидазу хрину (1:5000) у ФСБ, що містить 0,05% Твін 20 (об:об) і 1% БСА (мас:об) (Sigma, Poole UK) на 1 ч. Після восьми відмивань зв'язування виявляли 50 мкл субстрату, що представляє собою 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Реакцію зупиняли додаванням 25 мкл 0,1 М H₂SO₄ і визначали поглинання при 450 нм.

Скрінінг на інгібування TG2

Активність TG вимірюють на підставі Ca²⁺ залежного включення ³ Н-путресцину в N',N'-диметилказеїн. Рекомбінантну TG2 людини (100 нг) попередньо інкубували протягом двадцяти хвилин при кімнатній температурі з тестованим зразком (кондиціонованим середовищем або очищеним IgG) перед початком реакції. Для початку реакції додавали двадцять п'ять мкл реакційної суміші (5 мкл 25 мМ CaCl₂, 5 мкл 40 мМ дитіотрейтолу, 5 мкл суміші ³Н-путресцин і 10 мкл 25 мг/мл N',N'-диметилказеїну (заміняють 25 мМ CaCl₂ 100 мМ EDTA для неферментативного контролю), і зразки інкубували при 37 °C протягом аж до 1 години. Аліквоти по 10 мкл наносили у вигляді плям на смугу фільтрувального паперу Ватман 3 MM і відразу занурювали в охолоджену в льоду 10% трихлороцтову кислоту (ТХО) з метою осадження зшитих пептидів, у характерному випадку на періоди 0, 10, 30 і 60 хвилин у ході реакції. Після трьох інтенсивних відмивань в охолодженій у льоду 5% ТХО з наступними 3 промиваннями в охолоджену в льоді 95% етанолі фільтр, висушений на повітрі, рахували в 2 мл сцинтиляційної рідини (Ultima Gold Packard, Perkin Elmer). Обчислювали швидкість реакції. 1 одиниця TG еквівалента включенню 1 нмоль путресцину в годину при 37 °C.

Такий же протокол використовували для оцінки інгібування TG у клітинних лізатах шляхом заміни 25 мкл рекомбінантного білка 25 мкл клітинного лізату.

Клонування гібридом і очищення антитіл з кондиціонованого середовища

Виділення моноклонального антитіла здійснювали із клонованих інгібіторних гібридом. Спочатку ідентифіковані лунки, що містять гібридоми, піддавали подвійному клонуванню способом обмежуючого розведення (щоб гарантувати стабільність і клональність) відповідно до традиційних способів (Loirat MJ et al, 1992), де субклони тестували, як описано, за допомогою ELISA і скрінінгів на активність. Відібрані клони, що продукують антитіло, розмножували у флаконах на 25 і на 75 см² і підживлювали середовищем без сироватки (Hyclone, Fisher Scientific, Loughborough, UK). У міру розмноження клітин кондиціоноване середовище збирали для очищення IgG з використанням афінної хроматографії на колонці з білком G (Amersham Life Sciences). Кондиціоноване середовище розводили в рівному обсязі 10 мМ фосфату натрію, pH 7,25, і наносили на колонку з білком G при швидкості току від 1,0 до 2,0 мл/хв. Колонку інтенсивно промивали 10 обсягами колонки того ж буфера. Зв'язане антитіло елюювали в розчині гліцину (0,1 М; pH 2,7) і нейтралізували 0,15% обсягу 1М Tris/HCl pH 9. Зразки піддавали діалізу проти 1000 обсягів фосфатно-сольового буферного розчину протягом 24 годин з 2 змінами буфера.

Картування епітопов антитіла за допомогою фагового дисплея

Повнорозмірну послідовність, що кодує, TG2 людини ампліфікували за допомогою полімеразної

ланцюгової реакції, використовуючи наступні праймери: TG2-FL-1 5' ATGGCCGAGGAGCTGGTCTTAGAGA 3' і TG2-FL-2 5' GGCGGGGCCAATGATGACATTCCGGA 3'. Продукт ампліфікації довжиною приблизно 2 т.п.н. очищали, використовуючи набір для очищення продуктів ПЦР Qiagen PCR cleanup (Qiagen), і розщеплювали на випадкові фрагменти, використовуючи ДНКазу I RQ (Promega). ДНКазну реакцію RQ обробляли фрагментом Кленова ДНК полімерази I і ДНК полімеразою T4 для одержання фрагментів з тупими кінцями. Ці фрагменти очищали за допомогою гель-електрофорезу, і фрагменти в діапазоні довжини від 50-150 п.н. екстрагували, використовуючи набір для виділення фрагментів з гелю Qiagen gel recovery (Qiagen, Crawley UK).

Вектор фагового дисплея розщиплювали EcoRV, обробляли лужною фосфатазою й очищали за допомогою гель-електрофорезу й набору Qiagen gel recovery. 100 нг очищеного вектора лігували з 15 нг отриманих фрагментів з тупими кінцями кДНК TG2 людини. Отриману лігасну суміш вводили за допомогою електропорації в електрокомпетентні клітини XL1-blue (Agilent Technologies), і бібліотеку фрагментів рятували за допомогою хелперного фагу VCSM13 (Agilent). Фагові частки осаджували 2% глюкозою й 4% ПЕГ 6000 і ресуспендували у ФСБ із 0,1% Твін 20 (об:об) і 1% БСА (мас:об).

Картування епітопів виконували, використовуючи описаний нижче спосіб. Лунки ELISA покривали протягом ночі при 4 °C 30 мкг моноклонального антитіла в 100 мкл покриваючого буфера. Покриті лунки покривали ФСБ/Твін і блокували 400 мкл 3% БСА у ФСБ (мас:об) протягом 1 год при кімнатній температурі. У блокуванні лунки додавали приблизно 10¹⁰ фагових часток (100 мкл) і інкубували при кімнатній температурі протягом 1 г. Лунки промивали 8 раз 400 мкл ФСБ/0,5 % Твін (об:об), і прикріплений фаг елюювали 0,2 М гліцином pH 2,2. Елюйований фаг використовували для інфекції 1 мл хазяїна XL1-blue, і зразки висівали на агар LB (60 мкг/мл ампіциліну, 15 мкг/мл тетрацикліну), інші клітини-хазяї висівали в 100 мл середовища LB (60 мкг/мл ампіциліну, 15 мкг/мл тетрацикліну) і вирощували протягом ночі при 37 °C у струшувачі-інкубаторі при 200 об/хв із одержанням збагаченої бібліотеки відібраних фрагментів. Даний спосіб збагачення повторювали 5 раз, і випадкові колонії кінцевого раунду відбирали для секвенування.

Визначення послідовності області VL антитіла

Праймери

Сенс-праймери важкого ланцюга: Пару високо вироджених праймерів FR1, MH1 і MH2 (Wang et al 2000), поєднували з 3 праймерами константної області для ампліфікації генів VH.

MH1 5' CGCGCGCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGTC 3'

MH2 5'CGCGCGCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGSAGTC 3'

Mouse-G1 5' AGGCGCAGTACTACAATCCCTGGGCACAATTTTCTTGTCACC 3'

Mouse-G2a 5' AGGCGCAGTACTACAGGGCTTGATTGTGGGCCCTCTGGG 3'

Mouse-G2b 5' AGGCGCAGTACTACAGGGGTTGATTGTTGAAATGGGCCCG 3'

Каппа-праймери

VK1 5' CGCTGCGAGCTCGATATTGTGATGACBCAGDC 3'

VK2 5' CGCTGCGAGCTCGAGRRTTKTGATGACCCARAC 3'

VK3 5' CGCTGCGAGCTCGAAAATGTGCTCACCCAGTC 3'

VK4 5' CGCTGCGAGCTCGAYATTGTGATGACACAGTC 3'

VK5 5' CGCTGCGAGCTCGACATCCAGATGACACAGAC 3'

VK6 5' CGCTGCGAGCTCGAYATTGTGCTSACYCARTC 3'

VK7 5' CGCTGCGAGCTCGACATCCAGATGACYCARTC 3'

VK8 5' CGCTGCGAGCTCCAAATTGTTCTCACCCAGTC 3'

K-CONST 5' GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCCTGTTGAA 3'

Сумарну РНК екстрагували з моноклональних клітин гібридами (приблизно 10⁵ клітин), використовуючи Трізол (GIBCO) відповідно до протоколу виробника й кількісно визначали на підставі A_{260нм}. кДНК синтезували, використовуючи зворотну транскриптазу Improm II (Promega) і випадкові гексамерні праймери. Реакційна суміш була наступною; 1 мкг сумарної РНК, 0,1 мкг оліго(dN)₆, 12 мкл буферу Improm II, 1 мкл 10 мМ дезоксінуклеотидтрифосфатів (dNTP) (Promega), 8 мкл 25 мМ MgCl₂, 4 мкл зворотної транскриптази Improm II (Promega), диетилпірокарбонат (ДЕПК)-оброблена Н₂О до загального обсягу реакційної суміші, рівного 60 мкл. РНК і суміш випадкових праймерів нагрівали до 70 °C протягом 10 хв, а потім розміщували на лід. Додавали інші компоненти реакційної суміші, а потім інкубували при 20 °C протягом 10 хв, потім при 40 °C ще протягом 40 хв.

Ампліфікацію генів VH і VK виконували з полімеразою GoTaq (Promega). Кожна реакційна суміш на 50 мкл містила наступні компоненти: кДНК 2 мкл, 20 пмоль сенс- і антисенс-праймерів, 10 мкл буфера реакції GoTaq, 1 мкл 10 мМ dNTP, 5 мкл 25 мМ MgCl₂, 2,5 од. полімерази GoTaq, Н₂О до кінцевого обсягу 50 мкл. Реакції проводили у вигляді 35 циклів, використовуючи наступні умови: первісна денатурація 95 °C 2 хв; денатурація 94 °C 1 хв, віджиг 56 °C 1 хв, елонгація 72 °C 1 хв. Продукти ПЦР аналізували за допомогою гель-електрофорезу й клонували, використовуючи набір для клонування ТОРО ТА (Invitrogen). Випадкові мініпрепарати продуктів ПЦР важкого й легкого ланцюга відбирали для секвенування.

Вимір позаклітинної активності TG

Позаклітинну активність TG вимірювали за допомогою модифікованого клітинного аналізу ELISA. Епітеліальні клітини НК-2 збирали, використовуючи 0,1 М ЕДТА або 0,25% трипсін/ЕДТА й висівали при щільності 8×10^4 клітин/лунка в середовищі без сироватки на 96-ямковому планшеті, який був покритий протягом ночі 100 мкл/лунка фібронектина (5 мкг/мл в 50 мМ Tris-HCl pH 7,4) (Sigma, Poole UK). Клітинам давали можливість прикріпитися протягом 2,5 год при 37 °C у присутності 0,1 М біотин-кадаверину [N-(5-амінопентил-біотинамід)трифтороцтова кислота] (Molecular Probes, Eugene OR, USA). Планшети двічі промивали 3 мМ ЕДТА/ФСБ, і клітини видаляли 0,1% (мас/об) дезоксіхолатом в 5 мМ ЕДТА/ФСБ. Супернатант збирали й використовували для визначення білка. Планшети промивали 50 мМ Tris-HCl, і включення біотин-кадаверина виявляли, використовуючи 1:5000 екстравідин-HRP (Sigma, Poole, UK) протягом 1 год при кімнатній температурі з наступним додаванням субстрату ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидину). Реакцію зупиняли 50 мкл 2,5 М H₂SO₄ і зчитували поглинання при 450 нм.

Вимір рівнів колагена за допомогою радіоактивного мічення

Клітини висівали при щільності $3,75 \times 10^6/10 \text{ см}^2$ чашка Петрі або 1×10^6 /лунка 6-ямкового планшета. Колаген ВКМ оцінювали шляхом мічення 20 мКи ^{3,4} Н-проліну (1,0 мКи/мл, ICN). Мічення виконували протягом 72 год у стандартних умовах культивування клітин. Після мічення середовище видаляли, клітини промивали ФСБ і видаляли 2 мл 0,25 М гідроксиду амонію в 50 мМ Tris pH 7,4 при 37 °C протягом 10 хв. Розчинну фракцію збирали, і концентрацію білка визначали, використовуючи аналіз із біцинхоніною кислотою (БЦК). Чашки Петрі інтенсивно промивали зростаючими обсягами ФСБ, після чого ВКМ солюбілізували 2 мл 2,5% (мас/об) додецилсульфату натрію (ДСН) в 50 мМ Tris pH 6,8. Чашку зішкрібали, щоб гарантувати повне видалення ВКМ, і 200 мкл вимірювали на радіоактивність у бета-сцинтиляційному лічильнику. Рахунок коректували на мг солюбілизованого клітинного білка й виражали у вигляді відсотка середнього значення контролю.

Одержання рекомбінантного ратифікованого IgG Quark

В експериментальних цілях було отримане химерне антитіло людини й пацюка, що складається з послідовності одноланцюжкового Fv антитіла людини проти трансглютамінази типу II людини. Це антитіло назване QPCDTGII (скорочене до QCT), і послідовності його варіабельних областей доступні з документа WO 2006/100679A2.

Підклас $\gamma 2a$ пацюка відбирали на константні області важкого ланцюга, видаляючи сайт глікозидування, щоб знизити ймовірність реакції антитілозалежної клітинної цитотоксичності (АЗКЦ) у тестованих тварин, що представляють собою пацюків. Відібрана константна область пацюка для важкого ланцюга являла собою 013593 (Bruggemann, M. Gene 74: 473-482 (1988); Bruggemann, M., Free, J., Diamond, A., Howard, J., Cobbold, S. and Waldmann, H. Proc. Natl. Acad. Sci USA 83: 6075-6079 (1986)) з бази даних Kabat (Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., and Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. (NIH National Technical Information Service, 1991)). Константна область для легкого ланцюга каппа являла собою 013718 (Sheppard, H. W. and Gutman, G. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7064-7068 (1981)) з бази даних Kabat.

Коротко, послідовності важкого ланцюга, що кодують й каппа-ланцюги були отримані шляхом синтезу ДНК (використання кодонів було адаптовано для індексу випадковості використання синонімічних кодонів у геномі ссавців).

Продукт синтезу генів важкого ланцюга ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи праймери QCT_HindIII і QCT_H_rev. Продукт ПЦР рестрикували HindIII і NgomI і лігували в експресійному векторі MRCT. Клони компетентних бактерій DH5 α , хімічно трансформованих продуктом лігування, піддавали ПЦР скрінінгу, використовуючи праймери HCMVi і rat_gamma1. Три клони, що утворюють продукт ПЦР передвіщеного розміру, були секвеновані.

Продукт синтезу генів ланцюга каппа ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи праймери QCT_HindIII і QCT_L_rev. Продукт ПЦР рестрикували HindIII і PvuMI і лігували в експресійному векторі rKN100. Клони компетентних бактерій DH5 α , хімічно трансформованих продуктом лігування, піддавали ПЦР скрінінгу, використовуючи праймери HCMVi і rat_kappa. Три клони, що утворюють продукт ПЦР передвіщеного розміру, були секвеновані.

Був отриманий експресійний вектор з подвійною вставкою, що кодує як важкий ланцюг, так і ланцюг каппа, і цим вектором трансфікували клітини HEK293T. Супернатанти клітинної культури від двох великомасштабних трансфекцій HEK293T, поєднували й афінно очищали на колонці обсягу 1 мл з агарозою з білком L, використовуючи хроматографічну систему ÄKTA Explorer в відповідності із протоколами виготовлювача. Єдиний пік OD при 280 нм елюювали буфером для елювання IgG і піддавали діалізу проти двох змін ФСБ. Цей елюат аналізували як за допомогою поглинання в ультрафіолетовому світлі (УФ) при 280 нм, так і за допомогою ELISA на IgG_{2a} пацюка. Сумарний вихід становив приблизно 700 мкг (по OD_{280 нм}); 303,5 мкг (по ELISA).

Гуманізація антитіла AB1

Бази даних кДНК VH і VK людини

Білкові послідовності імуноглобулінів людини й миші з Міжнародної бази даних імуногенетики

(International Immunogenetics Database) 2009101 і бази даних Kabat Database Release 5 °F Sequences of Proteins of Immunological Interest (останнє оновлення 17 листопада 1999)¹⁰² використовували для складання бази даних послідовностей імуноглобулінів людини при вирівнюванні по Kabat. База даних авторів винаходу містить 10606 послідовностей VH і 2910 послідовностей VK.

Молекулярна модель AB1

Модель гомології варіабельних областей антитіла миші AB1 обчислена, використовуючи програму Modeller program¹⁰³ в автоматичному режимі. Атомні координати 1 MQK.pdb, 3LIZ.pdb і 1MQK.pdb являли собою матриці послідовностей найбільш високої ідентичності для Interface, VL і VH відповідно, як визначено за допомогою аналізу Blast бази даних структур антитіл бази даних структур білка (pdb; від англ. "Protein Database") Accelrys. Ці матриці використовували для створення 20 первісних моделей, кращі з яких уточнювали шляхом моделювання кожної петлі ділянки CDR з його 3 кращими матрицями петлі.

Вибір каркасної ділянки hAB1

Програму аналізу послідовностей gibsSR застосували для детального дослідження баз даних VH і VK людини з білковими послідовностями VHс, VKс і VKс₁ AB1, використовуючи різні критерії відбору. Залишки каркасної ділянки (FW; від англ. "framework") у межах 5Å залишку CDR (визначення Kabat) у моделі гомології антитіла миші AB1 були ідентифіковані й позначені як залишки "наближеності 5Å".

Послідовність AF06220 була обрана в якості FW, на якому була заснована вихідна конструкція VHс гуманізованого AB1. У таблиці 1 показано вирівнювання й ідентичність залишків AF06220 мишачого Ab1. У таблиці 2 показаний діапазон наближеності послідовностей 5Å. AF062260 має тільки 1 соматичну мутацію в порівнянні з його геном VH зародкової лінії Z12347 (таблиця 3).

Послідовність AY247656 була обрана в якості FW, на якому була заснована вихідна конструкція VKс гуманізованого AB1. Вирівнювання й ідентичність залишків мишачого AB1 показано в таблиці 4; у таблиці 5 показаний діапазон наближеності послідовностей 5Å. Це послідовність показала 5 соматичних мутацій у порівнянні з геном VK зародкової лінії X93620 (таблиця 6).

Послідовність AF193851 була обрана в якості FW, на якому була заснована вихідна конструкція VKс₁ AB1. Вирівнювання й ідентичність залишків мишачого AB1 показано в таблиці 7. У таблиці 8 показаний діапазон наближеності послідовностей 5Å. Ця послідовність не проявляє соматичних мутацій у порівнянні з геном VK зародкової лінії J00248 (таблиця 9).

Аналіз зв'язування ELISA

Клітини HEK 293F котрансфікували комбінаціями різних векторів гуманізованого легкого ланцюга відповідно до різних векторів гуманізованого важкого ланцюга. Рекомбінантну TG2 людини використовували для виміру зв'язування антитіла за допомогою ELISA. Результати показали, що варіант RHA важкого ланцюга (таблиця 10) у комбінації з кожним з варіантів легкого ланцюга RKE і RKJ (таблиця 11) (що представляють собою різні гуманізовані варіанти легкого ланцюга) проявляв оптимальне зв'язування (фіг. 16).

Варіант RHA важкого ланцюга являє собою немодифіковане щеплення ділянок CDR мишачого антитіла AB1 на донорну послідовність людини. Проте, обидва варіанти легкого ланцюга RKE і RKJ мають ту саму єдину зворотну мутацію, що перебуває в наближеності 5Å, F72 (нумерація Kabat, показана зеленим кольором). Ця зворотна мутація перебуває зовні від залишків Vernier¹⁰⁴, Canonical¹⁰⁵ або Interface¹⁰⁶ (див. таблицю 11).

101. Lefranc, M.P. IMGT, the international Immunogenetics database(R). Nucleic Acids Res. 31, 307-310 (2003).

102. Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. & Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH National Technical Information Service, (1991).

103. Eswar, N. et al. Comparative protein structure modelling using Modeller. Curr. Protoc. Bioinformatics. Chapter 5: Unit 5.6., Unit (2006).

104. Foote, J. & Winter, G. (1992). Антитіло framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol. Biol. 224, 487-499.

105. Morea, V., Lesk, A. M. & Tramontano, A. (2000). Антитіло modeling: implications for engineering and design. Methods 20, 267-279.

106. Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R. & Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. J Mol. Biol. 186, 651-663.

Таблица 4

[illegible]

Таблица 5

	Залишки наближеності 5A
AB_VKC	EIVLTQTCWFTHLYGVFPFSGSGQDFFFCFG
AY247656YL.....T..T....

Таблица 6

[illegible]

Таблица 7

[illegible]

Таблица 8

	Залишки набlijеност15A
AB_VKc	DIQMTQTCWFTLIYGVFFSGSGSGQDFFYCFG
AF193851S.....T..T....

Таблица 9

```

J00248.seq      DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNVLAWFOQKPKAPKSLIIAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYVCOQYNSYP
AF193851.seq    .....R.....N.....H.T.W
                                <----->
                                <----->

```


Результати

Одержання центрального білка rhTG2

Щоб підсилити утворення антитіл, які були б з більшою ймовірністю націлені на епітопи, критичні для активності TG2, ніж на сприятливі сайти на молекулі TG2, автори винаходу імунізували мишей імовірноше каталітичною центральною ділянкою TG2, чим повнорозмірною молекулою TG2. Для одержання рекомбінантного домену TG2 була отримана конструкція ПЦР, що проходить від основи 329 до основи 1419, і вбудована у вектор Pet21+(a) (фіг. 1A). Впровадження й експресія даного вектора в бактеріях BL21-Codonplus (DE3)-RIPL привели в результаті до утворення нерозчинного білка довжиною від амінокислоти 143 до 473, що включає всю каталітичну центральну ділянку. Даний білок солюбілізували й піддавали рефолдингу у 40 mM Tris HCl; 150 mM NaCl; 20% гліцерин; 5 mM цистеїн; 0,5 mM цистин pH 8.10 нг цього білка розділяли за допомогою електрофорезу у невідновлюваному поліакриламідному гелі, переносили за допомогою Вестерн-Блоттинга й піддавали імунотестуванню CUB7402. При 37 кДа була видна чітка смуга, відповідна до передвіщеного розміру центральної ділянки TG2 (фіг. 1B). Смуги більшого розміру, що також володіють імунореактивністю з CUB7402, найімовірноше, являють собою агрегати центрального білка, оскільки вони відсутні при поділі на відновлювальному гелі (дані не представлені).

Імунізація й злиття

Чотирьох мишей імунізували 50 мкг центральної ділянки rhTG2. Приблизно на п'ятому й дев'ятому тижні після імунізації від кожної миші брали зразок сироватки й тестували на реактивність проти rhTG2 за допомогою ELISA, використовуючи серійне розведення сироватки. Усі миші показали сильну імунну реакцію на центральну ділянку rhTG2, навіть при найвищому використовуваному розведенні (1:51000) (фіг. 2A). Щоб підтвердити, що антитіла також розпізнають повнорозмірний TG2, rhTG2 і центральний білок rhTG2 розділяли на не денатуруючому гелі, переносили за допомогою Вестерн-Блоттинга й піддавали імунотестуванню розведенням мишачої сироватки 1:1000 (фіг. 2B). Миша, що володіє найдужчою реактивністю (миша C) проти обох білків, піддавали бустер-ін'єкції, і спленоцити виділяли для злиття, використовуючи University of Sheffield's Hybridoma service, Bioserv.

Відбір позитивних гібридом і клонування

З 400 лунок гібридом, відібраних Bioserv як найвищі позитивні, супернатанти з 109 показали постійну реактивність до TG2, проте, тільки 34 не реагували на інших ключових членів сімейства TG при тестуванні в ELISA (репрезентативні приклади представлені на фіг. 3A). Супернатант гібридом, специфічних до TG2, піддали скрінінгу за допомогою аналізу включення ³H-цину на здатність до інгібування активності TG2 у результаті 100 нг TG2 (фіг. 4). Цей первісний скрінінг показав, що 10 супернатантів гібридом мали здатність до інгібування активності TG2 (AB1; DC1; BB7; EH6; DH2; DD9; JE12; AG9; AH3; DF4). Дев'ять із десяти були успішно клоновані шляхом обмежуючого розведення. Для клону DF4, хоча клони були виділені після клонування, вони очевидно, не були інгібіторними. Після клонування IgG очищали з кожної клонованої гібридоми й повторно тестували на селективну реактивність до TG2 (фіг. 3B).

Інгібіторний потенціал TG2

Для кожної клонованої гібридоми IgG протестований на інгібіторну активність у відношенні TG2 проти TG2 людини, пацюка й миші, і обчислене значення IC₅₀ на підставі кількості IgG, необхідного для інгібування 1 нг TG2. Значення IC₅₀ проти TG2 людини перебували в 12-кратному діапазоні від найбільш ефективного AB-1 при 1,1x10⁻⁵ мг/мл IgG до найменш ефективного JE12 при 12,3x1,1x10⁻⁵ мг/мл IgG (фіг. 9; таблиця 1). Цікаво, що автори винаходу змогли визначити IC₅₀ тільки для 4 антитіл (DH2, DD9, EH6 і BB7), де проти TG2 кращим було антитіло DH2, що має IC₅₀ 2,23x10⁻⁴ мг/мл IgG, що є приблизно в 6 раз менш активним, чим проти TG2 людини, і порівняно в 38 раз менш активним, ніж кращий інгібітор AB-1 проти TG2 (фіг. 9; таблиця 1). Жодне із цих інгібіторних антитіл не мало здатності до інгібування TG2 миші, імовірно, за рахунок імунної толерантності.

Картування епітопов інгібіторних антитіл

Щоб установити, які епітопи в TG2 були імунологічно унікальними для TG2, при цьому будучи інгібіторними, а також установити, чи націлені ці 10 антитіл на той самий або на різні сайти, кожне антитіло було картоване, використовуючи Фаговий дисплей. Конструювали фагову бібліотеку TG2 і піддавали пенінгу проти кожного mAb. Потім епітоп визначали шляхом консенсус-секвенування єднальних фагів.

Усі антитіла AB1, AG1, AH1, BB7, DC1, EH6 і JE12 виявилися повністю або частково єднальними до одного епітопу (фіг. 5), що включає амінокислоти 304-326 і, очевидно, розташований перед активним центром усередині кишені, що зв'язує субстрат (фіг. 6). Дану ділянку автори винаходу назвали сайтом AB-1, і назвали антитіла, націлені на цей сайт, антитілами групи 1.

Антитіло DF4 унікально націлений на послідовність, що триває від амінокислоти 351 до 365 (фіг. 5), що йде спереду назад центральної ділянки, включаючи Asp 358 у каталітичній тріаді (фіг. 6). Це антитіло автори винаходу назвали групою 2.

Антитіла DH2 і DD9 зв'язувалися з послідовністю, що покриває амінокислоти 450-467 (фіг. 5). Ці антитіла групи 3 зв'язуються з ділянкою в задній частині центральної ділянки поблизу сполуки з β-

складчастим доменом 1, який автори винаходу назвали сайтом DH2. Цей епітоп охоплює передбачуваний сайт зв'язування кальцію (фіг. 6).

Секвенування антитіла

З метою встановлення послідовності варіабельного легкого ланцюга для кожного антитіла РНК із кожної інгібіторної гібридоми екстрагували, піддавали зворотній транскрипції й ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи пару високо вироджених праймерів FR1, MH1 і MH2, при об'єднанні з 3 праймерами на константну область для ампліфікації генів VH.

Отримані в результаті послідовності VH і VK показані на фіг. 7 для AB1.

Здатність AB1 до інгібування активності TG2 у суміші білків *in vitro*

Найбільш ефективним інгібіторним антитілом проти рекомбінантної TG2 є AB1. Щоб мати терапевтичну цінність, воно повинне мати здатність до інгібування активності TG2 не тільки в чистому розчині, але також у складному білковому розчині, і жодним чином не зв'язуватися з іншими білками. Щоб перевірити це, був отриманий гомогенат лінії гепатоцитів людини HepG2. Нанесення 0,5 мкг AB1 було здатне інгібувати 70% активності TG2 (фіг. 8A). Проте, BB7 робило значно краще вимикання активності TG2 на 90%. Імунотестування 25 мкг цього лізату з AB1 показало відсутність нецільового зв'язування з окремою імунореактивною смугою розміру, що відповідає TG2 (фіг. 8B).

Здатність AB1 і DC1 до інгібування позаклітинної активності TG2

Щоб оцінити, чи можуть ці антитіла інгібувати активність TG2 у клітинній системі. AB1 (фіг. 10a) і DC1 (фіг. 10b) наносили на клітини циліндричного епітелію нирок людини 2 (HK-2) у культурі й аналізували активність позаклітинної TG, використовуючи аналіз із використанням біотин-кадаверину. AB1 було здатне досягати 60% інгібування, а DC1 55% інгібування активності при нанесенні в культуральне середовище 4 нг/мкл, що було порівнянно з хімічним універсальним інгібітором TG 1,3-диметил-2-[(2-оксо-пропил)тіо]імідазоліа хлоридом, нанесеним при 400 мкМ.

Порівняння антитіла AB1 з іншими відомими інгібіторними антитілами

Для тестування ефективності AB1 у порівнянні з іншими відомими інгібіторними антитілами до TG2 як Fab фрагменти (фіг. 11,12), так і повнорозмірний IgG (фіг. 13, 14) антитіла, як описано Quark Biotechnology у заявці на патент номер WO2006/100679, були протестовані на інгібування активності TG2 в аналізі включення ³H-путресцину. Активність 100 нг TG2 людини може бути інгібована на 60-80% 500 нг AB1. При порівнянні ні Fab фрагмент, ні повнорозмірний IgG антитіла Quark не могли значуще інгібувати TG2 у даному аналізі.

Обговорення

Існує явна необхідність у валідізації TG2 у якості терапевтичної мішені в людини протягом ряду захворювань, де експериментальні дослідження припустили її залучення. Ці захворювання включають рубцювання тканини, целіакію, нейродегенеративні захворювання й хіміотерапевтичну резистентність при деяких раках. Обмеженням цього є недолік сполук, специфічних до TG2, селективно інгібуючих активність TG2 у людини.

У даному дослідженні автори винаходу вперше імунізували мишей фрагментом TG2, щоб мати можливість виділити широкий ряд антитіл проти TG2 проти каталітичної центральної ділянки цього ферменту при пошуку інгібіторних епітопов. Це викличе гарну імунну відповідь із антитілами, що розпізнають як центральну ділянку rhTG2, так і нативну TG2, але не розпізнають інші TG.

10 з виділених антитіл показало інгібіторну активність. Потім для цих антитіл було картовано 3 TG2-специфічних, крім того, інгібіторних епітопа. Ці антитіла клоновані, секвеновані, і виділені IgG з обчисленими значеннями IC₅₀. Доведене, що три антитіла (AB1, DC1 і BB7), націлені на єднальну кишеню субстрату, є особливо ефективними інгібіторами. Найбільше важливо, що ці антитіла також добре діють як на лізаті клітин, так і в культурі клітин, що вказує на те, що ці антитіла мають потенціал функціонування в навколишньому середовищі, багатому білками, що є критичним для застосування *in vivo*.

Автори винаходу вважають, що ключовим елементом в успішному створенні цих інгібіторних антитіл, було рішення імунізувати тільки центральним білком. Згідно зі знаннями авторів винаходу жодне з наявних у продажі антитіл проти TG2 не мають інгібіторного потенціалу якої-небудь значимості. Власні спроби авторів винаходу використовувати повнорозмірну TG2 привели в результаті до великої кількості антитіл, кілька з яких були специфічні до TG2, і жодне з яких не було інгібіторним. Очевидно, це пов'язане з явною імуногенною перевагою петель білка в межах повнорозмірної TG2, багато з яких попадають у задню частину каталітичної центральної ділянки в положеннях, аналогічних найчастіше використовуваним антитілом проти TG2, CUB7402 (aa447 aa478).

Неочікувано, що підхід авторів винаходу привів до одержання значно більш ефективних антитіл. Не зв'язуючись якою-небудь теорією, автори винаходу вважають, що проста індукція антитіл до білка меншого розміру, що покриває тільки центральну ділянку, автори винаходу не тільки усувають деякі з переважних імунологічних епітопов, але також підсилюють націлювання на центральну ділянку. Одне це збільшує різноманітність антитіл, доступних для відбору, і, отже, більш широкого покриття центральної ділянки. Проте, імунізація тільки центральною ділянкою означає, що більша частина згортання втрачається, і, отже, деякі з епітопов, які, можливо, були менш доступні в межах

повнорозмірної молекули TG2, можуть являти собою більш привабливі епітопи, чим центральна ділянка, у даному форматі. З врахуванням того, що всі з 10 антитіл розпізнавали лінійні епітопи (тобто зв'язувалися з TG2 на гелі, що відновлює), тоді як 80% антитіл, раніше виділених авторами винаходу з використанням повнорозмірної TG2 у якості імуногену, були конформаційно залежними, дозволяє припустити, що саме це може являти собою основний фактор.

Раніше проведені інші дослідження, у яких постульована ідея інгібіторного антитіла до TG2 для застосування в медицині. Esposito зі співавторами розробили рекомбінантні антитіла від пацієнтів із целиакією, де постульоване, що антитіла до TG2 можуть відіграти інгібіторну роль [19]. Одне із цих антитіл було розроблено для комерційного застосування Quark Biotechnology, і подана заявка на патент (WO2006/100679). Дане антитіло продемонструвало деякі надихаючі ранні дані при попередженні фіброзу нирки в моделі односторонньої обструкції сечоводу (UUO; "Unilateral Ureteral Obstruction") на пацюках. Проте, автори винаходу одержали рекомбінантний варіант цього антитіла, і, хоча воно реагувало з TG2 в аналізі ELISA (фіг. 17) і Вестерн-Блоттинзі, автори винаходу досягли невеликого інгібування, що становить 500 нг IgG на нг TG2 для даного антитіла, при тому, що всі антитіла, розроблені в даному дослідженні, по суті повністю блокують активність TG2. Крім того, в WO2006/100679 розкрито одержання мишачого варіанта даного антитіла людини, і, як таке, тривале застосування у визначених моделях захворювання нирок на пацюках виявляється скрутним.

В описаному вище дослідженні примітне картування 3 інгібіторних епітопів у межах центральної ділянки TG2. Епітоп AB1 безумовно є найбільш ефективним відносно мішені, що, можливо, неочікувано з урахуванням положення епітопа. Дослідження його положення в межах передбаченої активної структури TG2 [20] дозволяє припустити, що він зв'язується на впускному каналі каталітичної тріади, у якому може перебувати кишень субстрату. З урахуванням того, що в скрінинговому аналізі автори винаходу використовували відносно мало субстратів (путресцин і диметилказеїн), можливо, неочікувано, що даний сайт настільки ефективний. Проте, положення епітопа повинне бути таким, щоб IgG великого розміру (150 кДа) щільно розташовувався в каталітичному сайті. На підставі даних по епітопам можна передбачити, що сайт DD9 може бути більш ефективним, оскільки він пов'язаний з передбачуваним сайтом зв'язування кальцію [21]. Проте, дослідження літератури дозволяє припустити 5 або більш передбачуваних сайтів зв'язування Ca^{2+} [21] і, хоча він має явний виражений ефект, він не є критичним для активності TG2 у цілому.

Сайт DF4 гіпотетично був би найбільш ефективним епітопом, оскільки антитіло зв'язується з однією з незамінних амінокислот у каталітичній тріаді. Проте, неможливо було успішно клонувати DF4 при продукуванні даного інгібіторного антитіла, і саме продукування достатньої кількості IgG для адекватного проведення тестів IC_{50} було неможливе. Дійсно, може бути дуже складним клонувати антитіла, що володіють занадто високою ефективністю, з урахуванням роботи Gunzler et al (1982) FEBS Lett. 150(2): 390-6, у якій припустили, що лімфоцити, для проліферації яких потрібна активність TG2, і, отже, антитіла, що володіють кращим інгібіторним потенціалом, можуть бути можливі тільки при використанні рекомбінантних підходів або континуальної системи екстракції IgG.

Однією з найбільше бентежних проблем при виконанні даної роботи була явна нездатність усіх розроблених антитіл до ефективного блокування активності TG2, що відрізняється від людини, що є критичним для доклінічних випробувань. Усі антитіла реагували з TG2 пацюка й миші як у Вестерн-Блоттинзі, так і в аналізі ELISA, у деяких випадках з невеликою відмінністю по інтенсивності. Проте, з 9 антитіл автори винаходу одержали єдиний IgG, для якого було можливо визначити IC_{50} для 4 пацюків і ні однієї з мишей. Ці 4, де IC_{50} було обчислено проти TG2 пацюка, проявляли 30-кратну або більш низьку кратність IC_{50} проти TG2 пацюка, ніж AB1 проти TG2 людини, що означає, що будь-яка доза *in vivo* була б неприйнятно велика. Крім того, жодне з них не буде інгібувати в лізаті клітин пацюка. З урахуванням реактивності в ELISA і Вестерн-Блоттингу й, крім того, що існує тільки 5 розбіжностей між видами для AB1 і 3 для DD9, значна видоспецифічність інгібування була несподіваною й чітко показує принципову важливість спорідненості для ефективного інгібування. Таким чином, оскільки ці інгібіторні епітопи ідентифіковані для TG2 людини, тепер принципово важливо, що аналогові антитіла розроблені для цих сайтів в TG2 пацюка, якщо їх значення повинне бути встановлене в доклінічних моделях захворювання *in vivo*.

Існує широкий ряд доступних інгібіторів TG. Зокрема, сполуки на основі тіоімідазола, уперше розроблені Merke Sharpe Dome [22], аналоги карбобензоксі (CBZ; від англ. "carbobenzoxy")-глутаміла, розроблені Griffin зі співавторами [23], які автори винаходу досить успішно застосовували для лікування експериментального рубцювання нирки [16], і інгібітори дігідрізоксазольного типу, розроблені Khosla зі співавторами [24-27], успішно використовувані в різних моделях раку. Була надія, що в результаті постійного вдосконалення цих сполук можна одержати прийнятний інгібітор TG2 людини, але перехресна реактивність сімейства TG або потенційно токсична природа цих сполук, очевидно, запобігає цій можливості. Більш недавно розкриті ациліденоксоіндоли як новий оборотний клас інгібіторів TG2 [24], але дані, що стосуються їхньої перехресної реактивності до інших членів сімейства TG, відсутні. На конференції Gordon 2010 по TG2 при захворюваннях людини Pasternack зі співавторами з фірми Zedira представили докладний опис ряду сполук, у яких використовують

акцептори бічного ланцюга Майкла в якості інгібіторів TG2, причому, заявлена їхня придатність для застосування *in vivo* і селективність до TG2, проте, повна публікація цих даних дотепер не виконана. На тій же конференції в ранній роботі авторів Macdonald et al продемонстровані деякі цікаві розробки в конструюванні інгібітору TG2 для лікування хореї Гентингтона, але, знову ж, повна публікація ще очікується. Безсумнівно, низькомолекулярний інгібітор TG2 був би у високому ступені бажаний, якби його можливо було одержати. Тканинна проникність, здатність проходити гематоенцефалічний бар'єр, одержання, вартість і простота дозування є лише декількома з переваг. Проте, у деяких випадках інгібітор, що представляє собою антитіло, розроблений у даному винаході, може бути кращим.

TG2 явно являє собою багатофункціональний фермент, пов'язаний з рядом клітинних функцій, що включають ядерну стабілізацію й транспорт [28, 29], ендцитоз [30, 31], ГТФазну передачу сигналу [32-34], апоптоз [35, 36], клітинну адгезію [37-39], цілісність цитоскелету [28, 29] і стабілізацію ВКМ [9]. Ясно, що низькомолекулярний інгібітор може утрудняти всі ці функції, оскільки, як правило, він має вільний доступ у позаклітинний простір і всередину клітини. Антитіло не може проникати в клітину, і як таке не може вплинути на внутрішньоклітинні ролі TG2. Важливо, що в більшості патологічних ролі TG2, очевидно, є позаклітинними, наприклад, її роль при рубцюванні тканини й фіброзі, целиакії й раку. Отже, застосування антитіла, що селективно зв'язує TG2, у медицині вносить додатковий ступінь селективності, що запобігає небажаним внутрішньоклітинним ефектам. Таким чином, антитіло забезпечило б переваги при блокуванні TG2 при фібротичних захворюваннях і захворюваннях, пов'язаних з рубцюванням, де TG2 утворює поперечні зв'язки білків ВКМ, при целиакії, де гліадин перетерплює деамідування в позаклітинному просторі, і при резистентності до хіміотерапії при раку, де клітинна адгезія, очевидно, є захисним чинником. Проте, за винятком випадків, коли може бути отриманий невеликий Fab фрагмент, який міг би проходити через гематоенцефалічний бар'єр, антитіло, інгібуюче TG2, мало застосовуватися при лікуванні неврологічних патологій.

На закінчення, автори винаходу вперше змогли розробити інгібіторні антитіла до TG2, селективно націлені на TG2. Автори винаходу також ідентифікували 3 нових інгібіторних епітопа в межах центрального домена TG2. Гуманізація антитіла AB1 уперше відкриває можливість терапії, націленої на TG2, у людини.

Посилання

1. Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: review article. Verderio, E.A., T. Johnson, and M. Griffin, *Amino acids*, 2004. 26(4): p. 387-404.
2. Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. Grenard, P., S. Bresson-Hadni, S. El Alaoui, M. Chevallier, D.A. Vuitton, and S. Ricard-Blum, *J Hepatol*, 2001. 35(3): p. 367-75.
3. Changes in transglutaminase activity in an experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat. Griffin, M., L.L. Smith, and J. Wynne, *Br J Exp Pathol*, 1979. 60(6): p. 653-61.
4. Cardiac specific overexpression of transglutaminase II (G(h)) results in a unique hypertrophic phenotype independent of pHospholipase C activation. Small, K., J.F. Feng, J. Lorenz, E.T. Donnelly, A. Yu, M.J. Im, G.W. Dorn, 2nd, and S.B. Liggett, *J Biol Chem*, 1999. 274(30): p. 21291-6.
5. Tissue transglutaminase and the progression of human renal scarring. Johnson, T.S., A.F. El-Koraie, N.J. Skill, N.M. Baddour, A.M. El Nahas, M. Nijloma, A.G. Adam, and M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 2003. 14(8): p. 2052-62.
6. Thrombin upregulates tissue transglutaminase in endothelial cells: a potential role for tissue transglutaminase in stability of atherosclerotic plaque. Auld, G.C., H. Ritchie, L.A. Robbie, and N.A. Booth, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(10): p. 1689-94.
7. Cross-linking of fibronectin to collagenous proteins. Mosher, D.F., *Mol Cell Biochem*, 1984. 58(1-2): p. 63-8.
8. Transglutaminases. Lorand, L. and S.M. Conrad, *Mol Cell Biochem*, 1984. 58(1-2): p. 9-35.
9. Modulation of tissue transglutaminase in tubular epithelial cells alters extracellular matrix levels: a potential mechanism of tissue scarring. Fisher, M., R.A. Jones, L. Huang, J.L. Haylor, M. El Nahas, M. Griffin, and T.S. Johnson, *Matrix Biol*, 2009. 28(1): p. 20-31.
10. Transglutaminase transcription and antigen translocation in experimental renal scarring. Johnson, T.S., N.J. Skill, A.M. El Nahas, S.D. Oldroyd, G.L. Thomas, J.A. Douthwaite, J.L. Haylor, and M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 1999. 10(10): p. 2146-57.
11. Do changes in transglutaminase activity alter latent transforming growth factor beta activation in experimental diabetic nephropathy? Huang, L., J.L. Haylor, M. Fisher, Z. Hau, A.M. El Nahas, M. Griffin, and T.S. Johnson, *Nephrol Dial Transplant*, 2010. 25(12): p. 3897-910.
12. Expression induced by interleukin-6 of tissue-type transglutaminase in human hepatoblastoma HepG2 cells. Suto, N., K. Ikura, and R. Sasaki, *J Biol Chem*, 1993. 268(10): p. 7469-73.
13. Tnf- α modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. Kuncio, G.S., M. Tsyganskaya, J. Zhu, S.L. Liu, L. Nagy, V. Thomazy, P.J. Davies, and M.A. Zern, *Am J Physiol*, 1998. 274(2 Pt 1): p. G240-5.
14. Inhibition of transglutaminase activity reduces extracellular matrix accumulation induced by high

glucose levels in proximal tubular epithelial cells. Skill, N.J., T.S. Johnson, I.G. Coutts, R.E. Saint, M. Fisher, L. Huang, A.M. El Nahas, R.J. Collighan, and M. Griffin, *J Biol Chem*, 2004. 279(46): p. 47754-62.

15. Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. Johnson, T.S., M. Fisher, J.L. Haylor, Z. Hau, N.J. Skill, R. Jones, R. Saint, I. Coutts, M.E. Vickers, A.M. El Nahas, and M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 2007. 18(12): p. 3078-88.

16. Transglutaminase inhibition ameliorates experimental diabetic nephropathy. Huang, L., J.L. Haylor, Z. Hau, R.A. Jones, M.E. Vickers, B. Wagner, M. Griffin, R.E. Saint, I.G. Coutts, A.M. El Nahas, and T.S. Johnson, *Kidney Int*, 2009. 76(4): p. 383-94.

17. Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through Tgf-beta activation and cell infiltration. Shweke, N., N. Boulos, C. Jouanneau, S. Vandermeersch, G. Melino, J.C. Dussaule, C. Chatziantoniou, P. Ronco, and J.J. Boffa, *Am J Pathol*, 2008. 173(3): p. 631-42.

18. GPR56, an atypical G protein-coupled receptor, binds tissue transglutaminase, TG2, and inhibits melanoma tumor growth and metastasis. Xu, L., S. Begum, J.D. Hearn, and R.O. Hynes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(24): p. 9023-8.

19. Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ. Esposito, C., F. Paparo, I. Caputo, M. Rossi, M. Maglio, D. Sblattero, T. Not, R. Porta, S. Auricchio, R. Marzari, and R. Troncone, *Gut*, 2002. 51(2): p. 177-81.

20. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. Pinkas, D.M., P. Strop, A.T. Brunger, and C. Khosla, *Plos Biol*, 2007. 5(12): p. e327.

21. Functional significance of five noncanonical Ca²⁺-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. Kiraly, R., E. Csosz, T. Kurtan, S. Antus, K. Szigeti, Z. Simon-Vecsei, I.R. Korponay-Szabo, Z. Keresztessy, and L. Fesus, *FEBS J*, 2009. 276(23): p. 7083-96.

22.3,5 substituted 4,5-dihydroisoxazoles as transglutaminase inhibitors. Syntex, US Patent 4, 912, 120, 1990. March.

23. Griffin M, Coutts I G, and S. R, Novel Compounds and Methods of Using The Same., in International Publication Number WO 2004/113363, 2004: GB patent PCT/GB2004/002569.

24. Acylideneoxindoles: a new class of reversible inhibitors of human transglutaminase 2. Klock, C., X. Jin, K. Choi, C. Khosla, P.B. Madrid, A. Spencer, B.C. Raimundo, P. Boardman, G. Lanza, and J.H. Griffin, *Bioorg Med Chem Lett*. 21(9): p. 2692-6.

25. Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states. Siegel, M. and C. Khosla, *Pharmacol Ther*, 2007. 115(2): p. 232-45.

26. Structure-based design of alphaHa-amido aldehyde containing gluten peptide analogues as modulators of HLA-DQ2 and transglutaminase 2. Siegel, M., J. Xia, and C. Khosla, *Bioorg Med Chem*, 2007. 15(18): p. 6253-61.

27. Novel therapies for celiac disease. Sollid, L.M. and C. Khosla, *J Intern Med*. 269(6): p. 604-13.

28. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. Fesus, L. and M. Piacentini, *Trends Biochem Sci*, 2002. 27(10): p. 534-9.

29. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. Lorand, L. and R.M. Graham, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(2): p. 140-56.

30. Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. Toth, B., E. Garabuczi, Z. Sarang, G. Vereb, G. Vamosi, D. Aeschlimann, B. Blasko, B. Becsi, F. Erdodi, A. Lacy-Hulbert, A. Zhang, L. Falasca, R.B. Birge, Z. Balajthy, G. Melino, L. Fesus, and Z. Szondy, *J Immunol*, 2009. 182(4): p. 2084-92.

31. Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alphaHa 2-macroglobulin and polypeptide hormones. Davies, P.J., D.R. Davies, A. Levitzki, F.R. Maxfield, P. Milhaud, M.C. Willingham, and I.H. Pastan, *Nature*, 1980. 283(5743): p. 162-7.

32. GTP binding and signaling by Gh/transglutaminase II involves distinct residues in a unique Gtp-binding pocket. Iismaa, S.E., M.J. Wu, N. Nanda, W.B. Church, and R.M. Graham, *J Biol Chem*, 2000. 275(24): p. 18259-65.

33. The core domain of the tissue transglutaminase Gh hydrolyzes GTP and ATP. Iismaa, S.E., L. Chung, M.J. Wu, D.C. Teller, V.C. Yee, and R.M. Graham, *Biochemistry*, 1997. 36(39): p. 11655-64.

34. Gh: a Gtp-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. Nakaoka, H., D.M. Perez, K.J. Baek, T. Das, A. Husain, K. Misono, M.J. Im, and R.M. Graham, *Science*, 1994. 264(5165): p. 1593-6.

35. Searching for the function of tissue transglutaminase: its possible involvement in the biochemical pathway of programmed cell death. Fesus, L. and V. Thomazy, *Adv Exp Med Biol*, 1988. 231: p. 119-34.

36. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. Fesus, L., V. Thomazy, and A. Falus, *FEBS Lett*, 1987. 224(1): p. 104-8.

37. Fibronectin-tissue transglutaminase matrix rescues Rgd-impaired cell adhesion through syndecan-4 and beta1 integrin co-signaling. Telci, D., Z. Wang, X. Li, E.A. Verderio, M.J. Humphries, M. Baccarini, H. Basaga, and M. Griffin, *J Biol Chem*, 2008. 283(30): p. 20937-47.

38. Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, and cell death. Verderio, E., B. Nicholas, S. Gross, and M. Griffin, *Exp Cell Res*, 1998. 239(1): p. 119-38.

39. A novel Rgd-independent cell adhesion pathway mediated by fibronectin-bound tissue transglutaminase rescues cells from anoikis. Verderio, E.A., D. Telci, A. Okoye, G. Melino, and M. Griffin, *J Biol Chem*, 2003. 278(43): p. 42604-14.

Приклад 2: Секвенування нових інгібіторних антитіл до TG2 за винаходом.

Секвенування антитіл

З метою встановлення послідовностей варіабельних областей кожного антитіла за винаходом осад клітин гібридом обробляли з використанням набору Qiagen RNase Mini Kit для екстракції РНК, дотримуючись протоколів виготовлювача. Екстраговану РНК піддавали зворотній транскрипції для одержання до ДНК із використанням набору для синтезу першої нитки ДНК 1st Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare), використовуючи праймер NotI-dT₁₈, відповідно до протоколів виготовлювача. Препарат кДНК очищали, використовуючи набір для очищення продуктів ПЦР Qiagen PCR Purification Kit, відповідно до протоколів виготовлювача.

Для визначення послідовності важкого ланцюга кДНК миші ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи серію вироджених праймерів (MHV1-12) із праймером константної області (MHCG1, MHCG2A, MHCG2B, MHCG3 або сумішшю чотирьох праймерів), як показано в таблиці 12. Аналогічно, визначення послідовності легкого ланцюга кДНК миші ампліфікували за допомогою ПЦР, використовуючи серію вироджених праймерів (MVK1-11) із праймером константної області МКС, як показано в таблиці 13.

Якщо продукти ампліфікації не були видні при використанні первісної серії ПЦР важкого ланцюга, проводили 5' RACE PCR (Invitrogen), використовуючи праймер NotI-dT₁₈, для одержання кДНК; і праймери константної області (MHCG1, MHCG2A, MHCG2B, MHCG3 або суміш усіх чотирьох) і якорний праймер 5' RACE, GGCCACGCGTCTGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIG (де I являє собою основу для дезоксіінозину) для ПЦР.

Отримані в результаті смуги ампліфікації лігували у векторі pCR2.1[®]-TOPO[®], використовуючи набір для клонування TOPO-TA Cloning[®] (Invitrogen), використовуючи протокол виготовлювача, і посіли у фірму GATC Biotech AG для секвенування.

Таблиця 12: Праймери ПЦР для клонування варіабельних областей важкого ланцюга миші

Назва	Послідовність
MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATCTTCTTC
MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT
MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT
MHV4	ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRTTT
MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTT
MHV6	ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTGC
MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT
MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG
MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG
MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCTG
MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG
MHV12	ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCTG
MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG

Назва	Послідовність
MHCG2A	CAGTGGATAGACCGATGGGGC
MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG
MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC

Коди невизначеності: R = A або G; Y = C або T; M = A або C; K = G або T; S = G або C; W = A або T.

MHV указує на праймери, що гібридизуються з лідерними послідовностями генів варіабельної області важкого ланцюга миші, MHCG указує на праймери, що гібридизуються з геном константної області миші.

Таблиця 13: Праймери ПЦР для клонування варіабельних областей легкого ланцюга каппа миші

Назва	Розмір	Послідовність
MKV1	30-мер	ATGAAGTTGVVTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
MKV2	29-мер	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG
MKV3	30-мер	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGS GTT G
MKV4	33-мер	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCTTG
MKV5	30-мер	ATGGATTTWAGGTGCAGATTWTCAGCTTC
MKV6	27-мер	ATGAGGTKCKKTGKTSAGSTSCTGRGG
MKV7	31-mer	ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACAKWYYCWGG
MKV8	31-мер	ATGTGGGGAYCTKTTYTCMMTTTTTCAATTG
MKV9	25-mer	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG
MKV10	27-мер	ATGTATATATGTTTGTTGTCTATTTCT
MKV11	28-мер	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
CL12A		ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT
CL12B		ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT
CL13		ATGGATTCACAGGCCCCAGGTCTTAT
CL14		ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTT
CL15		ATGAATTTGCCTGTTTCATCTCTTGGTGCT
CL16		ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT
CL17A		ATGAGGTGCCTARCTSAGTTCCTGRG
CL17B		ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG
CL17C		ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG
MKC	20-мер	ACTGGATGGTGGGAAGATGG

Коди невизначеності: R = A або G; Y = C або T; M = A або C; K = G або T; S = G або C; W = A або T.

MKV указує на праймери, що гібридизуються з лідерними послідовностями генів варіабельної області легкого ланцюга каппа миші, MKC указує на праймери, що гібридизуються з геном константної області каппа миші.

Дані секвенування

Антитіло AB1 було секвеноване на додаток до антитіл BB7, DC1, JE12, EH6, AG9, AH3, DD9, DH2, DD6 і IA12. Ці послідовності представлені на фіг. 18-28.

Приклад 3: Конструювання й характеристика химерних і гуманізованих нових антитіл проти TG2 за винаходом.

Щоб додатково охарактеризувати антитіла за винаходом й забезпечити ранжирування й

визначення черговості антитіл для гуманізації, була сконструйована панель химерних антитіл до TG2 (варіабельні області миші й IgG1 людини й каппа людини). Методологія, використана для одержання химерного антитіла, представлена нижче.

Методи

Бази даних кДНК VH і VK

Білкові послідовності імуноглобулінів людини й миші з Міжнародної імуногенетичної бази даних 2009¹ і випуск 5 бази даних Kabat Database Release 5 °F Sequences of Proteins of Immunological Interest (останнє оновлення 17 листопада 1999)² використовували для складання бази даних послідовностей імуноглобулінів людини при вирівнюванні по Kabat. База даних авторів винаходу містить 10606 послідовностей VH і 2910 послідовностей VK.

Молекулярна модель AB1

У якості репрезентативного прикладу антитіл групи 1 (тобто антитіл, що зв'язують епітоп, що перекриває амінокислоти 304-326 TG2 людини) обчислена модель гомології мишачого антитіла AB1, використовуючи програму Modeller³ в автоматичному режимі. Атомні координати 1 MQK.pdb, 3LIZ.pdb і 1MQK.pdb являли собою матриці послідовностей найвищої ідентичності для Interface, VL і VH відповідно, як визначено за допомогою аналізу Blast бази даних pdb структур антитіл Accelrys. Ці матриці використовували для створення 20 первісних моделей, кращі з яких уточнювали шляхом моделювання кожної петлі CDR з 3 найкращими матрицями петлі.

Вибір каркасної ділянки hAB1

Програму аналізу послідовностей gibssr застосували для детального дослідження баз даних VH і VK людини з білковими послідовностями Vhc, Vkc і Vkc₁, AB1, Vhc і Vkc BB7 і Vhc і Vkc DC1, використовуючи різні критерії відбору. Залишки FW у межах 5Å від залишку CDR (визначення Kabat) у моделі гомології мишачого антитіла AB1 минулого ідентифіковані й позначені як залишки "наближеності 5Å".

Послідовність AF06220 була обрана в якості FW, на якому були засновані первісні гуманізовані варіанти важкого ланцюга. У таблиці 14 показане вирівнювання й ідентичність залишків AF06220 антитілам миші. У таблиці 15 показані кордони наближеності 5Å послідовностей. Послідовність AF062260 має тільки одну соматичну мутацію в порівнянні з її геном VH зародкової лінії Z12347 (таблиця 16).

Послідовність AY247656 була обрана в якості FW, на якому була заснований первісний гуманізований легкий ланцюг каппа AB1. Вирівнювання й ідентичність залишків з легким ланцюгом каппа антитіла AB1 миші показано в таблиці 17; у таблиці 18 показані кордони наближеності 5Å послідовностей. Ця послідовність проявляє 5 соматичних мутацій у порівнянні з її геном VK зародкової лінії X93620 (таблиця 19).

Послідовність AF193851 була обрана в якості FW, на якому були засновані інші гуманізовані конструкції легкого ланцюга каппа. Вирівнювання й ідентичність залишків з антитілами миші показано в таблиці 20. У таблиці 21 показані кордони наближеності 5Å послідовностей. Ця послідовність не проявляє соматичних мутацій у порівнянні з її геном VK зародкової лінії J00248 (таблиця 22).

Одержання експресійних векторів

Конструювання химерних експресійних векторів включає приєднання до VH і VL підходящої лідерної послідовності, якій передуює сайт рестрикції Hind III і послідовність Козака. Послідовність Козака забезпечує ефективну трансляцію послідовності варіабельної області. Вона визначає коректний кодон AUG, від якого рибосома може почати трансляцію, і найбільше принципово важливу підставу є аденін у положенні -3, вище старту AUG.

Для важкого ланцюга конструювання химерних експресійних векторів включає введення 5' фрагмента константної області γ1 людини, аж до природного сайту рестрикції ApaI, що примикає до 3' кінця ділянки J варіабельної області. Область CH кодується в експресійному векторі нижче вбудованої послідовності VH, але в ній відсутній інтрон V-C.

Для легкого ланцюга природний донорний сайт сплайсінгу й сайт BamHI приєднують нижче області V. Донорна послідовність сплайсінгу сприяє сплайсінгу інтрона V:C каппа, необхідному для приєднання VL до константної області в рамці читування.

Послідовності ДНК варіабельних областей оптимізували й синтезували за допомогою Geneart®. Лідерна послідовність обрана як послідовність, що забезпечує високу експресію антитіла в культивованих клітинах ссавців.

Конструкції варіабельної області важкого ланцюга вирізали із клонуючого вектора, використовуючи розщеплення HindIII + ApaI, очищали й лігували в аналогічно розщепленому й обробленому фосфатазою експресійному векторі MRCT важкого ланцюга, і використовували для трансформації бактерій TOP10.

Конструкції варіабельної області легкого ланцюга каппа вирізали, використовуючи розщеплення HindIII + ApaI, очищали, лігували в аналогічно розщепленому й обробленому фосфатазою експресійному векторі MRCT легкого ланцюга каппа, і використовували для трансформації бактерій TOP10.

Експресія антитіла

Експресійний вектор з подвійною вставкою, що кодує як важкий, так і каппа-ланцюг, конструювали й трансфікували ним клітини HEK293T. Супернатант клітинної культури очищали на агарозі з білком G відповідно до протоколів виготовлювача.

Аналіз зв'язування ELISA

Клітини HEK293F котрансфікували комбінаціями різних векторів гуманізованого легкого ланцюга в комбінації з різними векторами гуманізованого важкого ланцюга. Рекомбінантну TG2 людини використовували для виміру зв'язування антитіла за допомогою ELISA. Результати показали, що варіант важкого ланцюга RHA (таблиця 23) у комбінації з кожним з варіантів легкого ланцюга RKE і RKJ (таблиця 24) (що представляють собою різні варіанти гуманізованого легкого ланцюга) виявили оптимальне зв'язування (фіг. 34) і були, отже, відібрані для подальшої характеристики. Аналогічний підхід використовували для ідентифікації оптимальних пар важкого й легкого ланцюгів гуманізованого BB7 і важкого й легкого ланцюгів гуманізованого DC1.

Варіант RHA важкого ланцюга являє собою немодифікований продукт щеплення ділянок CDR антитіла AB1 миші на донорну послідовність людини. Проте, обидва варіанти легкого ланцюга RKE і RKJ мають ту саму зворотну мутацію залишку наближеності 5A, F72 (таблиця 24). Ця зворотна мутація перебуває зовні від залишків Vernier⁴, Canonical⁵ або Interface⁶.

Посилання

1. Lefranc, M.P. IMGT, the international Immunogenetics database(R). Nucleic Acids Res. 31, 307-310 (2003).
 2. Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. & Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH National Technical Information Service, (1991).
 3. Eswar, N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. Curr. Protoc. Bioinformatics. Chapter 5:Unit 5.6., Unit (2006).
 4. Foote, J. & Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol. Biol. 224, 487-499.
 5. Morea, V., Lesk, A. M. & Tramontano, A. (2000). Antibody modelling: implications for engineering and design. Methods 20, 267-279.
 6. Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R. & Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. J Mol. Biol. 186, 651-663.
- У наведеній нижче таблиці А підсумовані отримані химерні й гуманізовані антитіла з перехресним посиланням на ідентифікатори, використовувані в графічних матеріалах.

Антитіло миші	Химерне антитіло	Гуманізоване антитіло
AB1	cAB001 cAB003	hAB004 (hAB001AE) hAB005 (hAB001AJ)
BB7	cBB001	hBB001AA hBB001BB
DC1	cDC001	hDC001AA hDC001BB
DD6	cDD6001	
DD9	cDD9001	
DH2	cDH001	

Таблица 14

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
Номери по Kabat ²	Kabat ²	90	100	110					
Vernier ⁴	- ----- -----AB----	--ABC-----	ABCDEFGHIJK----- -	*.....**.....*	****.....***.....*****..*.~.				
Canonical ⁵	-.....l.l.l.l.....l.....2...22.....2.....								
Interface ⁶	-.....I.I.I.....I.I.....I.I.....								
Наближеність 5Å	**** * * **** *** *** ***** *	**** ** <----->	<----->	<-----><----->					*
CDR	----->								
AB_VHc (mAb001VH)	-EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSAMS--WVRQTPDRRLRWATISVGSGKTYYPDSVKGRTISRDNAKNTLYL QMNSLRSEDTAMYYCAKLI----- -----SlyWGQGTTLVSS								
Bb7_VHc (mbB7001VH)	-AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGIIFSSAMS--WVRQTPEKRLEWVAITISS-GRSTYYYPDSVKGRTVS RDS AKNTLYL QMDSLRSEDTAIIYCAKLI----- -----SPYWQGTTLTIVSS								
DCl_VHc (mdC001VH)	-EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSHAMSS--WVRQTPEKRLEWVAITISS-GRSTYYYPDSVKGRTISRDNVNKNTLYL QLSSLRSEDTAIFYFCARLI----- -----STYGQGTTTLTVSS								
Af062260	C....L.....Q.....R.....F.Y....-.A.GKS....SA..G-s.s.A.....S..... A. V. DG ---- -----GV LV								

Таблиця 15

	Залишки наближеності 5Å
AB_VHc (mAB001VH)	EVQLCAFTLSWVRWVAREFTISRNLVCAKWG
BB7_VHc (mBB7001VH)	AVQLCAIIFSWVRWVAREFTVSRSLVCAKWG
DC1_VHc (mDC001VH)	EVQLCAFTLSWVRWVAREFTISRNLFCARWG
AF062260F.....S.....

Таблиця 16

		10	20	30	40	50	60	70	80	90
		-----+	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+	-----+
Z12347.seq	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTIYLQMNSLRAEDTAVYYCAK									
AF062260.seqR									

Таблиця 17

Номери по Kabat ²	1	10	20	100	30	40	50	60	70	80
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vernier ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canonical ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Interface ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Наближеність 5Å	*****	***	***	***	***	***	***	***	***	***
CDR	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->	<----->
AB_VKc (mAB001VK)	-EIVLTQSPSSMYASLGERTVITCSAQ-----DINSYLTWFQKPKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRFSGSGGQDFFLTISILEY	EDMGIIYYCLQYDDFP-----YTFGGGTKLEI-K								
AY247656	-.....LS.V.D.....Q.....SN.N.Y.....A.L...DASN.ET.....T..TF.....QP	..F.T...Q..NTY.-----L.....-								

Таблиця 18

	Залишки наближеності 5Å
AB_VKc (mAB001VK)	EIVLTQTCWFNTLIYGVPSRFSGSGGQDFFYCFG
AY247656YL.....T..T....

Таблиця 19

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
X93620.seq	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISINVLNWYQQKPKAPKLLIYDASNLETGVP	SRFSGSGSGTDFTT	ISSLOPED	DIATYYCQQYDNLP					
AY247656.seq	E.VL.....	NTY.L	5	FG.....					

Таблиця 20

Номери по Kabat ²	1	10	20	30	40	50	60	70	80
90			100						
Vernier ⁴	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----								
Canonical ⁵	-.1.....3.....3.....1.....1111.1.....2.22.....2.....1.....								
Interface ⁶	-.....I..I.....II.....								
Наближеність 5Å	*****	**	**	**	**	****	***	*****	
CDR	**	**	**	**	**	**	**	**	**
AB_VKc1	-DIQMTQSPSSMYASLG	RVITITCKASQ-----	DINSYLTWFQ	QKPKSPKTLIYRTNRLFDG	VPSRFS	SGSGQDFFLT	ISSLEY		
(mAB002VK)	EDMGYYCLQYDDFP-----	YTFGGG	TKLEI-K						
AB1_VKc2	-DIQMTQSPSSMYASLG	RVITITCKASQ-----	DINSYLTWFQ	QKPKSPKTLIYRTNRLFDG	VPSRFS	SGSGQDFFLT	ISSLEY		
(mAB003VK)	EDMGYYCLQYDDFP-----	YTFGGG	TKLEI-K						
BB7_VKc	-AIKMTQSPSSMYASLG	RVITITCKASQ-----	DINSYLTWFQ	QKPKSPKTLIYLTNRLMDG	VPSRFS	SGSGQEFLLT	ISGLEH		
(mBB001VK)	EDMGYYCLQYVDFP-----	YTFGGG	TKLEI-K						
DC1_VKc	-DITMTQSPSSIYASLG	RVITITCKASQ-----	DINSYLTWFQ	QKPKSPKILIYLVNRLVDG	VPSRFS	SGSGQDYALT	ISSLEY		
(mDC001VK)	EDMGYYCLQYDDFP-----	YTFGGG	TKLEI-K						
AF193851	-.M.....LS..V.D.....R.....	-----G.RN..A.....A..S...AASN.QS.....T..T.....QP							
	..FAT...Q.HNTY.-----W...Q...V...-								

Таблица 23

Номери по Kabat	1	10	20	30	40	50	60	70	80
	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	90	100		110				
	--ABC----- ----- -----AB----- ----- -----ABC----- -----								
Vernier ⁴	-.*.	***

Canonical ⁵	-	1.11.1.

Interface ⁶	-

Наближеність 5Å	****	****	****	****	****	****	****	****	****
CDR									
AB_RHA (hAB001HA)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAMS--WVRQAPGKGLEWVSTISV-GGKTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYL								
BB7_RHA (hBB001HA)	QMNSLRAEDTAVYCAKLI-----SLYWGQGLTVTVSS								
	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAMS--WVRQAPGKGLEWVSTISS-GGRSTYYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYL								
	QMNSLRAEDTAVYCAKLI-----SPYWGQGLTVTVSS								
BB7_RHB (hBB001HB)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFSSAMS--WVRQAPGKGLEWVATISS-GGRSTYYPD SVKGRFTVSRD SSKNTLYL								
	QMNSLRAEDTAVYCAKLI-----SPYWGQGLTVTVSS								
DC1_RHA (hDC001HA)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHAMS--WVRQAPGKGLEWVSTISS-GGRSTYYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYL								
	QMNSLRAEDTAVYCAKLI-----STYWGQGLTVTVSS								
DC1_RHB (hDC001HB)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMS--WVRQAPGKGLEWVATISS-GGRSTYYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYL								
	QMNSLRAEDTAVYFCARLI-----STYWGQGLTVTVSS								

Таблица 24

Номери по Kabat	1	10	20	30	40	50	60	70	80	
	90	100								
Vernier ⁴	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
	-.*. *.....**.....****.....*.***.*.....*	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
Canonical ⁵	-1.....1.....1111.1.....2.22.....2.....1.....	3.....3.....								
Interface ⁶	-.....I..I.....II.....I..I.....								
5 Å Proximity	*****	**	**	****	***	*****				
	**									
CDR	<----->									
AB_RKE	<----->									
(hAB001KE)	-EIVLTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQ-----DINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPSPRFSGSGSGTDFFFTISSLQPE	DFGTYVCLQYDDFP-----YTFGGGTKLEI-K								
AB_RKJ	-DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQ-----DINSYLTWYQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVPSPRFSGSGSGTDFFLTISSLQPE	DFATYYCLQYDDFP-----YTFGQGTKVEI-K								
(hAB001KJ)										
BB7_RKA	-DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQ-----DINSYLTWYQQKPGKAPKSLIYLTNRLMDGVPSPRFSGSGSGTDFFLTISSLQPE	DFATYYCLQYVDFP-----YTFGQGTKVEI-K								
(hBB001KA)										
BB7_RKB	-DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQ-----DINSYLTWYQQKPGKAPKTLIYLTNRLMDGVPSPRFSGSGSGEQEFLLTISSLQPE	DFATYYCLQYVDFP-----YTFGQGTKVEI-K								
(hBB001KB)										
DC1_RKA	-DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQ-----DINSYLTWYQQKPGKAPKSLIYLVNRLVDGVPSPRFSGSGSGTDFFLTISSLQPE	DFATYYCLQYDDFP-----YTFGQGTKVEI-K								
(hDC001KA)										
DC1_RKB	-DITMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQ-----DINSYLTWYQQKPGKAPKILYLVNRLVDGVPSPRFSGSGSGQDYALTISSLQPE	DFATYYCLQYDDFP-----YTFGQGTKVEI-K								
(hDC001KB)										

Таблица 24А

Важкий ланцюг - CDR1	<p>AB BB7 RHB BB7 RHA DC1 RHA DC1 RHB</p> <p>CAASGFTFSSAMSWVR CAASGFTFSSAMSWVR CAASGFTFSSAMSWVR CAASGFTFSSAMSWVR CAASGFTLSTHAMSWVR</p> <p>або FTFSSAMSWVR або SSAMS. або FTFSSAMSWVR або SSAMS. або IIFSSAMSWVR або SSAMS. або FTFSTHAMSWVR або THAMS. або FTLSTHAMSWVR або THAMS.</p>
Важкий ланцюг – CDR2	<p>AB BB7 RHB BB7 RHA DC1 RHA DC1 RHB</p> <p>WVSTISVGGGKTYYPD^{SVKGRFTISRDN}SKNTL або WVSTISVGGGKTYYPD^{SVKGRFTISRDN}або WVSTISVGGGKTYYPD^{SVKGRFTISR}або TISVGGGKTYYPD^{SVKG}. WVSTISSGGRSTYYPD^{SVKGRFTISRDN}SKNTL або WVSTISSGGRSTYYPD^{SVKGRFTISRDN}або WVSTISSGGRSTYYPD^{SVKGRFTISR}або TISSGGRSTYYPD^{SVKG}. WVATISSGGRSTYYPD^{SVKGRFTVSRD}SSKNTL або WVATISSGGRSTYYPD^{SVKGRFTVSRD}або WVATISSGGRSTYYPD^{SVKGRFTVSR}або TISSGGRSTYYPD^{SVKG}. WVSTISSGGRSTYYPD^{SVKGRFTISRDN}SKNTL або WVSTISSGGRSTYYPD^{SVKGRFTISRDN}або WVSTISSGGRSTYYPD^{SVKGRFTISR}або TISSGGRSTYYPD^{SVKG}. WVATISSGGRSTYYPD^{SVKGRFTISRDN}SKNTL або WVATISSGGRSTYYPD^{SVKGRFTISRDN}або WVATISSGGRSTYYPD^{SVKGRFTISR}або TISSGGRSTYYPD^{SVKG}.</p>
Важкий ланцюг – CDR3	<p>AB BB7 RHB BB7 RHA DC1 RHA DC1 RHB</p> <p>YCAKLISLYWG YCAKLISPYWG YCAKLISPYWG YCAKLISPYWG FCARLISTYWG</p> <p>або LISLY. або LISPY. або LISPY. або LISTY. або LISTY.</p>

Легкий ланцюг - CDR1	<p>AB RKE AB RKJ BB7 RKB BB7 RKA DC1 RKA DC1 RKB</p> <p>TCKASQDINSYLTWY або KASQDINSYLT. TCKASQDINSYLTWF або KASQDINSYLT. TCKASQDINSYLTWF або KASQDINSYLT. TCKASQDINSYLTWF або KASQDINSYLT. TCKASQDINSYLTWF або KASQDINSYLT. TCKASQDINSYLTWF або KASQDINSYLT. TCKASQDINSYLTWF або KASQDINSYLT.</p>
Легкий ланцюг - CDR2	<p>AB RKE AB RKJ BB7 RKB BB7 RKA DC1 RKA DC1 RKB</p> <p>LLIYRTNRLFDGVPSPRFSGSGGTDF SLIYRTNRLFDGVPSPRFSGSGGTDF SLIYLTNRLMDGVPSPRFSGSGGTDF TLIYLTNRLMDGVPSPRFSGSGGTDF SLIYLVNRLVDGVPSPRFSGSGGTDF ILIYLVNRLVDGVPSPRFSGSGGTDF</p> <p>або LLIYRTNRLFDGVP або SLIYRTNRLFDGVP або SLIYLTNRLMDGVP або TLIYLTNRLMDGVP або SLIYLVNRLVDGVP або ILIYLVNRLVDGVP</p> <p>або RTNRLFD або RTNRLFD або LTNRLMD або LTNRLMD або LVNRLVD або LVNRLVD</p>
Легкий ланцюг - CDR3	<p>AB RKE AB RKJ BB7 RKB BB7 RKA DC1 RKA DC1 RKB</p> <p>YCLQYDDFFPYTFG YCLQYDDFFPYTFG YCLQYVDDFFPYTFG YCLQYVDDFFPYTFG YCLQYDDFFPYTFG YCLQYDDFFPYTFG</p> <p>або LQYDDFFPYT. або LQYDDFFPYT. або LQYVDDFFPYT. або LQYVDDFFPYT. або LQYDDFFPYT. або LQYDDFFPYT.</p>

У таблиці 14 показане вирівнювання й ідентичність послідовності AF062260 з мишачими антитілами. Ідентичність залишків показана крапковими знаками (.). Відмінності залишків показані, де застосовне. Гепи (-) використовують для збереження нумерації по Kabat, і щоб показати інсерцію або делецію залишку, де застосовне.

У таблиці 15 показані залишки каркасної ділянки важкого ланцюга антитіла, розташовані в межах кордонів 5' ділянок CDR. Ідентичності залишків показані крапковими знаками (.). Відмінності залишків показані, де застосовне.

У таблиці 16 показане, що AF062260 має 1 соматичну мутацію в порівнянні з геном VH зародкової лінії Z12347. Ідентичності залишків показані крапковими знаками (.). Відмінності залишків показані, де застосовне.

У таблиці 17 показане вирівнювання й ідентичність залишків AY247656 з мишачим антитілом AB1. Ідентичності залишків показані крапковими знаками (.). Відмінності залишків показана, де застосовне. Гепи (-) використовують для збереження нумерації по Kabat, і щоб показати інсерцію або делецію залишку, де застосовне.

У таблиці 18 показані залишки каркасної ділянки легкого ланцюга каппа антитіла AB1, розташовані в межах кордонів 5A ділянок CDR. Ідентичності залишків показані крапковими знаками (.). Відмінності залишків показані, де застосовне.

У таблиці 19 показане, що AY247656 має 5 соматичних мутацій у порівнянні з геном VK зародкової лінії X93620. Ідентичності залишків показані крапковими знаками (.). Відмінності залишків показані, де застосовне.

У таблиці 20 показане вирівнювання й ідентичність залишків AF193851 з мишачими антитілами. Ідентичності залишків показані крапковими знаками (.). Відмінності залишків показані, де застосовне. Гепи (-) використовують для збереження нумерації по Kabat, і щоб показати інсерцію або делецію залишку, де застосовне.

У таблиці 21 показані залишки каркасної області легкого ланцюга каппа антитіла, розташовані усередині кордонів 5A ділянок CDR. Ідентичності залишків показані крапковими знаками (.). Відмінності залишків показані, де застосовне.

У таблиці 22 показане, що AF193851 не має соматичних мутацій у порівнянні з геном VK зародкової лінії J00248. Ідентичності залишків показані крапковими знаками (.). Відмінності залишків показані, де застосовне.

У таблиці 23 показані вирівнювання послідовності кінцевих гуманізованих варіантів важких ланцюгів AB1, BB7 і DC1. Гепи (-) використовують для збереження нумерації по Kabat, і щоб показати інсерцію або делецію залишку, де застосовне.

У таблиці 24 показані вирівнювання послідовностей кінцевих гуманізованих варіантів легких ланцюгів каппа AB1, BB7 і DC1. Гепи (-) використовують для збереження нумерації по Kabat, і щоб показати інсерцію або делецію залишку, де застосовне.

У таблиці 24а підсумована інформація про послідовності, представлені в таблицях 23 і 24, зокрема, показані послідовності CDR і CDR із фланкуючими ділянками у важких і легких ланцюгах антитіл AB, BB-7 і DC-1.

Характеризація химерних і гуманізованих антитіл

Химерні й гуманізовані Ab аналізували на зв'язування з TG2 людини і яванського макака й на ферментативне інгібування цих ферментів відповідно до методології, описаної нижче.

Методи

Аналіз ELISA на зв'язування TG2

Зв'язування антитіла з TG2 людини і яванського макака визначали в аналізі ELISA. Прозорі полістирольні 96-ямкові планшети "Maxisorp" (Nunc) покривали 50 нг очищеної TG2 людини і яванського макака в 50 мкл 0,05 М карбонат-бікарбонатного буфера pH 9,6 при 4 °C протягом ночі. Контрольні лунки покривали 50 мкл 100 мкг/мл бичачого сироваткового альбуміну (BSA). Планшети відмивали 3 × 300 мкл фосфатно-сольового буферного розчину pH 7,4 (ФСБ), що містить 0,1 % Твін 20 (ФСБТ) і блокували 300 мкл 3 % мас/об знежиреного молока Marvel у ФСБ протягом 1 години при кімнатній температурі. Після 3х відмивання ФСБТ 50 мкл химерних або гуманізованих антитіл проти TG2, очищених на білку А, або контроль ізотипу антитіла, що представляє собою IgG1 каппа людини, або CUB7402 (Abcam) серійно розводили в 4 рази з вищої концентрації 50 нМ у ФСБ і додавали в планшет у двох повторях. Після 1 години при кімнатній температурі планшети відмивали 3х у ФСБТ і інкубували з 50 мкл IgG (Fc) коза проти людини, кон'югованого з пероксидазою хрину (Serotec), розведеним 1/5000 в 3 % мас/об знежиреного молока Marvel у ФСБ, або для лунок, що містять CUB7402, IgG (Fc) коза проти миші, кон'югованим з пероксидазою хрину, 1/5000 (Sigma) протягом 1 години при кімнатній температурі. Після 3х відмивання ФСБТ планшети проявляли 50 мкл субстрату ТМБ (Sigma) протягом 5 хв при кімнатній температурі, після чого реакцію зупиняли 25 мкл 0,5 М H₂SO₄ і зчитували поглинання при 450 нМ у зчитувальному обладнанні для мікротитраційних планшетів (Biotek EL808). Аналізували криві доза-відповідь і визначали значення EC₅₀ і інші статистичні параметри, використовуючи 4-параметричну логістичну відповідність даних (GraphPad Prism).

Аналіз інгібування TG2 антитілами за винаходом на основі флуоресценції трансглютамінази

Трансглютаміназні активності очищених ферментів TG2 людини (Zedira) або яванського макака (Trenzyme) вимірювали шляхом включення дансильованого лізіна KxD (Zedira) в N, N-діметаборований казеїн (DMC, від англ. "N, N-dimethylated casein", Sigma). TG2 людини або яванського макака розводили в буфері переамідування (25 мМ 4-(2-гідроксietил)-1-піперазин етансульфонова кислота (ГЕПЕС) pH 7,4, що містить 250 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 5 мМ CaCl₂, 0,2 мМ ДТТ і 0,05 % об/об Плуоронік F-127) до 1 нМ і 10 нМ відповідно й змішували з різними концентраціями мишачих, химерних або гуманізованих антитіл до TG2, очищених на білку А, протягом 180 хв при кімнатній температурі в 384-ямкових чорних мікротитраційних планшетах (Corning). Реакції ініціювали додаванням DMC і KxD до кінцевої концентрації 10 мМ і 20 мМ відповідно й кінцевого обсягу реакційної суміші 30 мкл і давали

можливість протікання при КТ протягом 180 хв, і стежили за зростанням флуоресценції (відносні одиниці флуоресценції, ОЕФ) (збудження при 280 нм, випускнення при 550 нм), використовуючи зчитувальне обладнання для планшетів Tecan Safire². Дані нормалізували на відсоток активності: % активності = (ОЕФ тестованого антитіла – ОЕФ низьких контролів)/ОЕФ високих контролів – ОЕФ низьких контролів) x 100, де низькі контролі складали всі компоненти, за винятком ферменту, а високі контролі містили всі компоненти за винятком антитіла.

Криві доза-відповідь антитіла будували, використовуючи програму GraphPad Prism, і знаходили відповідність, використовуючи 4-параметричну логістичну модель, для обчислення IC₅₀ і інших статистичних параметрів. Результати проілюстровані на фіг. 29-33.

Результати й обговорення експериментів по інгібуванню ферменту й аналізу зв'язування ELISA гуманізованими й мишачими антитілами проти TG2

Здатність химерних і гуманізованих антитіл до TG2 до інгібування переамідування TG2 людини визначали на підставі дозозалежного інгібування TG2-залежного включення дансілованого лізіна в N, N-диметилований казеїн (приклад наведений на фіг. 29 і 31). Як химерні, так і гуманізовані антитіла із групи 1 (наприклад, cAB003, cBB001, cDC001, hBB001AA, hAB001BB, hAB005 і hAB004) проявляють ефективне інгібування активності TG2 у низькому наномольному діапазоні, що узгоджується з даними ELISA, що показують зв'язування з іммобілізованою TG2 людини в тому ж діапазоні (фіг. 35 і 37). На противагу цьому, комерційне антитіло CUB7402 було нездатне інгібувати ферментативні активності TG2 людини і яванського макака (фіг. 29F і 30B), незважаючи на порівнянне зв'язування з антитілами групи 1 в аналізах ELISA (фіг. 35A, 36A, 37A і 38A), що узгодиться з розпізнаванням CUB7402 епітопа, який не перешкоджає функції переамідування ферменту. Таким чином, антитіла групи 1 можна відрізнити за їхньою здатністю до інгібування функції ферменту від інших антитіл, таких як CUB7402, які зв'язуються, але не діють на ферментативну активність. Аналогічно мишачі й химерні антитіла, репрезентативні для групи 3 (наприклад, mDD9001, mDH001, cDD9001 і cDH001), відповідно, інгібували переамідування TG2 людини, але з більш низькою ефективністю, ніж антитіла групи 1 (фіг. 29 і 33). Інгібування TG2 людини ілюстративними батьківськими мишачими моноклональними антитілами із групи 1 і групи 3 (фіг. 33) проявляють ефективності, порівнянні з їх химерними й гуманізованими варіантами, що вказує на те, що функціональна ефективність мишачих антитіл зберігається в гуманізованих варіантах. Аналогічно дані зв'язування TG2 людини в ELISA для ілюстративних гуманізованих антитіл hBB001AA, hBB001BB і hAB004 (фіг. 37) показують значення EC₅₀, порівнянні зі значеннями, отриманими для химерних варіантів cBB001 і cAB003, що вказує на те, що єднальна спорідненість також збережена в гуманізованих варіантах. Химерні й гуманізоване антитіла також проявляють ефективне інгібування TG2 яванського макака (фіг. 30 і 32) і порівнянні значення EC₅₀ в ELISA (фіг. 36 і 38) між видами, що узгоджується з консервативністю спорідненого епітопа в TG2 яванського макака, що має загальну ідентичність послідовності 99 %. На противагу цьому, CUB7402 проявляє зв'язування з TG2 обох видів, порівнянне з антитілами групи 1, але не інгібує ні одну з ферментативних активностей (фіг. 35-38 і 29-30).

Аналізи на основі клітин

Зв'язування антитіл за винаходом з позаклітинної TG2 з епітеліальних клітин НК-2 аналізували, використовуючи описаний нижче протокол.

Вимір позаклітинної активності TG

Позаклітинну активність TG вимірювали за допомогою модифікованого клітинного аналізу ELISA. Епітеліальні клітини НК-2 збирали, використовуючи акутазу, і висівали при щільності 2×10⁴ клітин/лунка в середовищі без сироватки на 96-ямковий планшет, який був покритий протягом ночі 100 мкл/лунка фибронектину (5 мкг/мл в 50 мМ Тріс-НСІ рН 7,4) (Sigma, Poole UK). Клітинам давали можливість прикріпитися протягом ночі при 37 °С. Середовище заміняли середовищем DMEM (Life Technologies) і додавали сполуки, антитіла або контролі й давали можливість зв'язуватися при 37 °С. У лунки додавали 0,1 мМ біотин-кадаверину [N-(5-амінопентил-біотинамід)трифтороцтову кислоту] (Zedira), і планшет повертали на 37 °С протягом 2 годин. Планшети двічі відмивали 3 мМ ЕДТА/ФСБ, і клітини видаляли 0,1 % (мас/об) дезоксіхолом в 5 мМ ЕДТА/ФСБ. Супернатант збирали й використовували для визначення білка. Планшети відмивали ФСБ/Твін, і включений біотин-кадаверин виявляли, використовуючи 1:5000 екстравідин-HRP (Sigma, Poole, UK) протягом 1 год. при кімнатній температурі, а потім субстрат K Blue (Skybio). Реакцію зупиняли Red Stop (Skybio), і поглинання зчитували при 650 нм. Кожне антитіло тестували щонайменше в трьох окремих випадках.

Результати представлені на фіг. 39 і 40 і показують ілюстративну криву й таблицю значень IC₅₀, отриманих для тестованих антитіл. На фіг. 39 показані результати для гуманізованого антитіла AB1, а на фіг. 40 показані результати для гуманізованого антитіла BB7.

hAB005 інгібувало позаклітинну TG2 клітин НК2 при IC₅₀ 71,85 нМ, і максимальне інгібування становило приблизно 30 % контрольної активності. hBB001AA інгібувало активність при IC₅₀ 19,8 нМ, і максимальне інгібування становило 40 % контрольної активності. hBB001BB мало кращу IC₅₀, рівну 4,9 нМ, але максимальне інгібування приблизно 55 % контролю.

Аналізи методом заростання подряпини

Аналізи методом заростання подряпини також проводили для оцінки єднальної активності гуманізованих і химерних антитіл проти TG2 за винаходом.

Показане, що TG2 відіграє важливу роль при фіброзі легенів, і нокаут-миші по TG2 проявляють зменшене рубцювання й фіброз у моделі блеоміцину. (Keith C. Olsen, Ramil E. Sapinoro, R. M. Kottmann, Ajit A. Kulkarni, Siiri E. Iismaa, Gail V. W. Johnson, Thomas H. Thatcher, Richard P. Phipps, and Patricia J. Sime (2011), Transglutaminase 2 and Its Role in Pulmonary Fibrosis. *Am. J of Respiratory & Critical Care Med.* 184 0699-707). Міграція клітин з нокаут-мишей по TG2 у подряпину, нанесену в клітинному моношарі, була знижена в порівнянні з диким типом. Аналіз методом заростання подряпини проводили, щоб оцінити дію гуманізованих і/або химерних антитіл проти TG2 за винаходом на швидкість заростання подряпини в шарі нормальних фібробластів легенів (клітин WI-38).

Протокол аналізу методом заростання подряпини:

Клітини WI-38 (нормальні фібробласти легенів людини ATCC, № по каталогу CCL-75) висівали в 96-ямковий планшет Image Lock (Essen, № по каталогу 4379) при щільності 2×10^4 /лунка в середовищі DMEM (Life Technologies, № по каталогу 32561) з 10 % ФБС і вирощували протягом ночі до більш 97 % конфлюентності. Клітини відмивали 2X середовищем DMEM без сироватки, і подряпину створювали, використовуючи маркер Essen Wound Maker і протокол виготовлювача. Середовище видаляли й заміняли 95 мкл/лунка середовища без сироватки. У лунки додавали контролю й тестовані антитіла. Планшет поміщали в систему Essen Incucyte, і заростання подряпини аналізували, використовуючи протокол методу заростання подряпини.

Цитохалазин D використовували в якості контролю аналізу при 0,1 мкм. R281, низькомолекулярний неспецифічний інгібітор трансглютамінази, тестували при 100 мкм. Пептид ZDON, що представляє собою необоротний інгібітор трансглютамінази, тестували при 10 мкм і 100 мкм. Наявне в продажі антитіло до TG2 Cub7402 (Abcam № по каталогу ab2386) тестували при 5 мкг/мол. Антитіла за винаходом тестували щонайменше в трьох випадках при різних концентраціях, як зазначено. У всіх експериментах контролі, що представляють собою цитохалазин D при 0,1 мкм і ZDON при двох концентраціях, проявляють дозозалежний ефект.

Ілюстративні результати аналізів методом заростання подряпини показані на фіг. 41-44. Як видно на фіг. 41, усі сполуки: цитохалазин D, R281 і ZDON інгібували заростання подряпини (було показано, що ZDON інгібує його дозозалежно), але антитіло Cub7402 не інгібувало заростання подряпини. Усі антитіла: гуманізоване антитіло BB7, гуманізоване антитіло AB1 і химерне антитіло DC1 інгібували заростання подряпини.

Значення спорідненості химерних і гуманізованих Ab проти TG2

Значення єднального спорідненості (константи дисоціації K_d і швидкості дисоціації) для панелі химерних і гуманізованих Ab за винаходом проти TG2 людини й TG2 яванського макака оцінювали, використовуючи методи Biacore. Протоколи й результати описані нижче й показані на фіг. 45-47.

Методи Biacore

Рекомбінантна TG2 людини була отримана від фірми Zedira GmbH (№ по каталогу T002). Рекомбінантна TG2 яванського макака була отримана від фірми Trenzyme. Поверхневий плазмонний резонанс (SPR; від англ. "Surface plasmon resonance") вимірювали на приладі Biacore T200 (GE Healthcare). Мікрочипи CM5 (GE Healthcare № по каталогу BR-1006-68) покривали моноклональним антитілом IgG1 (Fc) миша проти людини (MAH; від англ. "mouse anti-human") (GE Healthcare № по каталогу BR-1008-39) шляхом амінного поєднання, як описано в інструкціях виготовлювача. Буфер HBS-EP+ (0,01 М ГЕПЕС, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05 % об/об поверхнево-активну речовину P20) і буфер HBS-P+ (0,01 М ГЕПЕС, 0,15 М NaCl, 0,05 % поверхнево-активна речовина P20) придбавали у фірми GE Healthcare у вигляді 10х концентрованих розчинів (№№ по каталогу BR-1006-69 і BR-1006-71). Розчин хлориду кальцію був отриманий від фірми Sigma Aldrich (№ по каталогу 21115).

Спосіб, застосований для визначення спорідненості антитіл проти TG2, включав іммобілізацію химерних або гуманізованих антитіл на чипі CM5, покритому MAH, з наступним упорскуванням серії зразків TG2 у рухомому буфері. Рухомий буфер являв собою 1х HBS-P+, що містить 1 мМ CaCl_2 , або 1х HBS-EP+ для експериментів без кальцію. Іммобілізацію антитіла виконували протягом часу контакту 120 секунд при швидкості току 10 мкл/хв, що приводить у результаті до іммобілізації приблизно 40-80 відносних одиниць (ОЕ). TG2 впорскували на іммобілізоване антитіло при концентраціях, що перебувають у діапазоні від 25 нМ до 400 нМ, при часі контакту аж до 600 секунд при швидкості току 30 мкл/хв. Дисоціацію TG2 у характерному випадку вимірювали протягом аж до 5400 секунд (1,5 годин). Потім виконували регенерацію мікрочипа, використовуючи 3 М MgCl_2 протягом часу контакту 60 секунд при швидкості току 30 мкл/мл з наступним періодом стабілізації 300 з перед наступним зразком. Для кожної з TG2, людини і яванського макака, проводили щонайменше 5 упорскувань при різних концентраціях щонайменше у двох окремих експериментах.

Кінетичні дані експортували із програми Biacore T200 Evaluation Software і аналізували, використовуючи програму GraphPad Prism, де фази асоціації й фази дисоціації аналізували окремо, використовуючи однофазну модель асоціації й однофазну модель експонентного загасання відповідно. Швидкості асоціації (k_{on}) обчислювали для кожної кривої окремо, а значення швидкості

дисоціації (k_{off}) з даних, зібраних для тривалої фази дисоціації. Де значення k_{off} були обчислені як складові менш $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$, значення були встановлені як 1×10^{-5} для аналізів, оскільки більш повільні швидкості, ніж дана швидкість, не можуть бути точно встановлені. Значення для k_{on} і k_{off} представлені в таблицях нижче у вигляді середнього окремих обчислених значень для кожного антитіла для TG2 кожного виду із множинних концентрацій +/- 1 стандартне відхилення. Значення K_D обчислюють як середнє k_{off} /середнє k_{on} .

Результати експериментів Biacore

Таблиця 25

Антитіло		TG2 людини				
		k_{off} (c^{-1})	Станд. відкл.	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$)	Станд. відкл.	K_D (M)
cAB003	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$1,7 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$	$< 6 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$8,6 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$< 1 \times 10^{-10}$
cBB001	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$2,1 \times 10^5$	$6,9 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$1,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$< 7 \times 10^{-11}$
hAB004 (hAB001AE)		$2,4 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-10}$
hAB005 (hAB001AJ)		$< 10^{-5}$	-	$1,9 \times 10^5$	$6,8 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
hBB001AA		$< 10^{-5}$	-	$2,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$< 4 \times 10^{-11}$
hBB001BB		$< 10^{-5}$	-	$2,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$< 4 \times 10^{-11}$
cDC001		$< 10^{-5}$	-	$3,2 \times 10^5$	$5,7 \times 10^4$	$< 3 \times 10^{-11}$
cDH001	+ Ca^{2+}	$1,8 \times 10^{-5}$	$4,9 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$6,4 \times 10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$4,9 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^{-8}$
cDD9001	+ Ca^{2+}	$1,3 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$7,1 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^4$	$7,6 \times 10^3$	$3,1 \times 10^{-9}$

У таблиці 25 показані кінетичні дані, отримані проти TG2 людини. Де швидкості k^{off} були обчислені як складові менш 10^{-5} c^{-1} , значення були встановлені як 10^{-5} c^{-1} для аналізу, оскільки більш повільні швидкості, ніж дана швидкість, не можуть бути точно встановлені.

Таблиця 26

Антитіло		TG2 яванського макака				
		k_{off} (c^{-1})	Станд. відкл.	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$)	Станд. відкл.	K_D (M)
cAB003	+ Ca^{2+}	$1,2 \times 10^{-5}$	$8,1 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$5,0 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$1,3 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$9,3 \times 10^{-11}$
cBB001	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$2,9 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	$< 3 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$1,9 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
hAB004 (hAB001AE)		$1,8 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^{-11}$
hAB005 (hAB001AJ)		$3,4 \times 10^{-5}$	$4,6 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^5$	$4,1 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{-10}$
hBB001AA		$< 10^{-5}$	-	$3,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$< 3 \times 10^{-11}$
hBB001BB		$3,7 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-10}$
cDC001		$< 10^{-5}$	-	$4,2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^{-11}$
cDH001	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$1,5 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$	$< 7 \times 10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$6,3 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{-9}$
cDD9001	+ Ca^{2+}	$1,6 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-5}$	$3,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$5,2 \times 10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$4,1 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$4,6 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$8,9 \times 10^{-10}$

У таблиці 26 показані кінетичні дані, отримані проти TG2 яванського макака. Де швидкості k_{off} були обчислені як складові менш 10^{-5} c^{-1} , значення були встановлені як 10^{-5} c^{-1} для аналізу, оскільки більш повільні швидкості, ніж дана швидкість, не можуть бути точно встановлені.

На фіг. 45-47 наведений приклад серії даних Biacore. Як видно, гуманізовані й химерні антитіла cAB003, cBB001, hAB004, hAB005, hBB001AA, hBB001BB, cDC001 до TG2 мали відмінну спорідненість до TG2 людини і яванського макака при значеннях K_D 120 nM або краще. Химерні антитіла cDH001 і cDD9001 проявляють більш повільні швидкості асоціації з TG2 людини і яванського макака й більш слабку загальну спорідненість. Дослідження відбору антитіл під час відсутності кальцію показало, що ефект є невеликим або відсутній, за винятком випадку cDH001 і cDD9001, де зв'язування є більш

слабким внаслідок більш високих швидкостей дисоціації (k_{off}).

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> МЕДІКАЛ РІСЕЧ КАУНСЕЛ ТЕКНОЛОДЖІ

<120> Сполуки

<130> MEDBX/P53198PC

<140> PCT/GB2013/051373

<141> 2013-05-24

<150> GB1209096.5

<151> 2012-05-24

<160> 296

<170> Bissap 1.2

<210> 1

<211> 2064

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..2064

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"

/примітка="Нуклеотидна послідовність ТГ2 людини"

/організм="Homo sapiens"

<400> 1

atggccgagg agctggtctt agagaggtgt gatctggagc tggagacca tggccgagac 60

caccacacgg ccgacctgtg ccgggagaag ctggtggtgc gacggggcca gcccttctgg 120

ctgacctgc actttgaggg ccgcaactac gaggccagt tagacagtct caccttcagt 180

gtcgtgaccg gccagcccc tagccaggag gccgggacca agggccgttt tccactaaga 240

gatgctgtgg aggaggggtga ctggacagcc accgtggtgg accagcaaga ctgcaccctc 300

tcgctgcagc tcaccacccc ggccaacgcc cccatcggcc tgtatgcct cagcctggag 360

gcctccactg gctaccaggg atccagcttt gtgctgggcc acttcatttt gctcttcaac 420

gcctggtgcc cagcggatgc tgtgtacctg gactcggaag aggagcggca ggagtatgtc 480

ctcaccacgc agggctttat ctaccagggc tcggccaagt tcatcaagaa cataccttgg 540

aattttgggc agtttgaaga tgggatccta gacatctgcc tgatccttct agatgtcaac 600

ccaagtcc tgaagaacgc cggccgtgac tgctcccgcc gcagcagccc cgtctacgtg 660

ggccgggtgg tgagtggcat ggtaactgc aacgatgacc aggggtgtgct gctgggacgc 720
tgggacaaca actacgggga cggcgtcagc cccatgtcct ggatcggcag cgtggacatc 780
ctgcggcgct ggaagaacca cggctgccag cgctgaagt atggccagt ctgggtcttc 840
gccgccgtgg cctgcacagt gctgaggtgc ctgggcatcc ctaccgcgt cgtgaccaac 900
tacaactcgg cccatgacca gaacagcaac ctctcatcg agtacttccg caatgagttt 960
ggggagatcc agggtgacaa gagcgagatg atctggaact tccactgctg ggtggagtgc 1020
tgatgacca ggccggacct gcagccgggg tacgagggtt ggcaggccct ggaccaacg 1080
ccccaggaga agagcgaagg gacgtactgc tgtggcccag ttccagttcg tgccatcaag 1140
gagggcgacc tgagcaccaa gtacgatgcg cctttgtct ttgcggaggt caatgccgac 1200
gtggtagact ggatccagca ggacgatggg tctgtgcaca aatccatcaa ccgttccctg 1260
atcgttgggc tgaagatcag cactaagagc gtgggcccag acgagcggga ggatcacc 1320
cacactaca aatacccaga ggggtcctca gaggagaggg aggccttcac aaggcgcaac 1380
cacctgaaca aactggccga gaaggaggag acagggatgg ccatgcggat ccgtgtgggc 1440
cagagcatga acatgggcag tgactttgac gtccttggc acatcaccaa caacaccgct 1500
gaggagtacg tctccgcct cctgctctgt gcccgaccg tcagctacaa tgggatcttg 1560
gggcccagat gtggcaccaa gtacctgctc aacctcaacc tggagcctt ctctgagaag 1620
agcgttctc ttgcatcct ctatgagaaa taccgtgact gccttacgga gtccaacctc 1680
atcaagggtgc gggccctcct cgtggagcca gttatcaaca gctacctgct ggctgagagg 1740
gacctctacc tggagaatcc agaaatcaag atccggatcc ttggggagcc caagcagaaa 1800
cgcaagctgg tggctgaggt gtcctgcag aaccgctcc ctgtggccct ggaaggctgc 1860
accttactg tggagggggc cggcctgact gaggagcaga agacggtgga gatccagac 1920
ccgtggagg caggggagga agttaagggt agaattgacc tgctgccgct ccacatgggc 1980
ctccacaagc tgggtgtgaa cttcgagagc gacaagctga aggtgtgaa gggcttccgg 2040
aatgtcatca ttggccccgc ctaa 2064

<210> 2

<211> 687

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Амінокислотна послідовність ТГ2 людини

<400> 2

Met Ala Glu Glu Leu Val Leu Glu Arg Cys Asp Leu Glu Leu Glu Thr
1 5 10 15
Asn Gly Arg Asp His His Thr Ala Asp Leu Cys Arg Glu Lys Leu Val
20 25 30
Val Arg Arg Gly Gln Pro Phe Trp Leu Thr Leu His Phe Glu Gly Arg
35 40 45
Asn Tyr Glu Ala Ser Val Asp Ser Leu Thr Phe Ser Val Val Thr Gly
50 55 60
Pro Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gly Thr Lys Ala Arg Phe Pro Leu Arg
65 70 75 80
Asp Ala Val Glu Glu Gly Asp Trp Thr Ala Thr Val Val Asp Gln Gln
85 90 95
Asp Cys Thr Leu Ser Leu Gln Leu Thr Thr Pro Ala Asn Ala Pro Ile
100 105 110
Gly Leu Tyr Arg Leu Ser Leu Glu Ala Ser Thr Gly Tyr Gln Gly Ser
115 120 125
Ser Phe Val Leu Gly His Phe Ile Leu Leu Phe Asn Ala Trp Cys Pro
130 135 140
Ala Asp Ala Val Tyr Leu Asp Ser Glu Glu Glu Arg Gln Glu Tyr Val
145 150 155 160
Leu Thr Gln Gln Gly Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Ala Lys Phe Ile Lys
165 170 175
Asn Ile Pro Trp Asn Phe Gly Gln Phe Glu Asp Gly Ile Leu Asp Ile
180 185 190
Cys Leu Ile Leu Leu Asp Val Asn Pro Lys Phe Leu Lys Asn Ala Gly
195 200 205
Arg Asp Cys Ser Arg Arg Ser Ser Pro Val Tyr Val Gly Arg Val Val
210 215 220
Ser Gly Met Val Asn Cys Asn Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gly Arg
225 230 235 240
Trp Asp Asn Asn Tyr Gly Asp Gly Val Ser Pro Met Ser Trp Ile Gly
245 250 255
Ser Val Asp Ile Leu Arg Arg Trp Lys Asn His Gly Cys Gln Arg Val
260 265 270
Lys Tyr Gly Gln Cys Trp Val Phe Ala Ala Val Ala Cys Thr Val Leu
275 280 285
Arg Cys Leu Gly Ile Pro Thr Arg Val Val Thr Asn Tyr Asn Ser Ala
290 295 300
His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe Arg Asn Glu Phe
305 310 315 320
Gly Glu Ile Gln Gly Asp Lys Ser Glu Met Ile Trp Asn Phe His Cys
325 330 335
Trp Val Glu Ser Trp Met Thr Arg Pro Asp Leu Gln Pro Gly Tyr Glu
340 345 350
Gly Trp Gln Ala Leu Asp Pro Thr Pro Gln Glu Lys Ser Glu Gly Thr

355 360 365
 Tyr Cys Cys Gly Pro Val Pro Val Arg Ala Ile Lys Glu Gly Asp Leu
 370 375 380
 Ser Thr Lys Tyr Asp Ala Pro Phe Val Phe Ala Glu Val Asn Ala Asp
 385 390 395 400
 Val Val Asp Trp Ile Gln Gln Asp Asp Gly Ser Val His Lys Ser Ile
 405 410 415
 Asn Arg Ser Leu Ile Val Gly Leu Lys Ile Ser Thr Lys Ser Val Gly
 420 425 430
 Arg Asp Glu Arg Glu Asp Ile Thr His Thr Tyr Lys Tyr Pro Glu Gly
 435 440 445
 Ser Ser Glu Glu Arg Glu Ala Phe Thr Arg Ala Asn His Leu Asn Lys
 450 455 460
 Leu Ala Glu Lys Glu Glu Thr Gly Met Ala Met Arg Ile Arg Val Gly
 465 470 475 480
 Gln Ser Met Asn Met Gly Ser Asp Phe Asp Val Phe Ala His Ile Thr
 485 490 495
 Asn Asn Thr Ala Glu Glu Tyr Val Cys Arg Leu Leu Leu Cys Ala Arg
 500 505 510
 Thr Val Ser Tyr Asn Gly Ile Leu Gly Pro Glu Cys Gly Thr Lys Tyr
 515 520 525
 Leu Leu Asn Leu Asn Leu Glu Pro Phe Ser Glu Lys Ser Val Pro Leu
 530 535 540
 Cys Ile Leu Tyr Glu Lys Tyr Arg Asp Cys Leu Thr Glu Ser Asn Leu
 545 550 555 560
 Ile Lys Val Arg Ala Leu Leu Val Glu Pro Val Ile Asn Ser Tyr Leu
 565 570 575
 Leu Ala Glu Arg Asp Leu Tyr Leu Glu Asn Pro Glu Ile Lys Ile Arg
 580 585 590
 Ile Leu Gly Glu Pro Lys Gln Lys Arg Lys Leu Val Ala Glu Val Ser
 595 600 605
 Leu Gln Asn Pro Leu Pro Val Ala Leu Glu Gly Cys Thr Phe Thr Val
 610 615 620
 Glu Gly Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Thr Val Glu Ile Pro Asp
 625 630 635 640
 Pro Val Glu Ala Gly Glu Glu Val Lys Val Arg Met Asp Leu Leu Pro
 645 650 655
 Leu His Met Gly Leu His Lys Leu Val Val Asn Phe Glu Ser Asp Lys
 660 665 670
 Leu Lys Ala Val Lys Gly Phe Arg Asn Val Ile Ile Gly Pro Ala
 675 680 685

<210> 3

<211> 2062

<212> ДНК

<213> Rattus

<220>

<221> source

<222> 1..2062

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"

/примітка="Нуклеотидна послідовність ТГ2 пацюка"

/организм="Rattus"

<400> 3

atggccgagg agctgaacct ggagaggtgc gatttggaga tacaggccaa tggccgtgat 60
caccacacgg ccgacctgtg ccaagagaaa ctggtgctgc ggcgaggcca gcgcttccgg 120
ctgacactgt acttcgaggg ccgtggctat gaggccagcg tggacagact tacatttgg 180
gccgtgaccg gccagatcc cagtgaagag gcagggacca agggccgctt ctactgtct 240
gacgatgtgg aggagggatc ctggtcagcc tctgtctgg accaacagga caatgtcctc 300
tcgtgcagc tctgcacccc agccaatgct cctgttggcc agtaccgcct cagcctggag 360
acttctactg gctaccaagg ctccagcttc atgctgggtc acttcatcct gctcttcaat 420
gcctgtgcc cagcggatga cgtgtaccta gattcagagg cggagcgccg ggaatacgtc 480
ctcacacagc agggcttcat ctaccagggc tctgtcaagt tcatcaagag tgtgccttgg 540
aactttgggc agtttgagga tgggatcctg gatgcctgcc tgatgctttt ggatgtgaac 600
ccaagtcc tgaaggaccg tagccgggac tgctcacgac gcagcagtc catctatgtg 660
ggccgcgtgg tgagcggcat ggtcaactgc aatgatgacc aggtgtgtct tctgggtcgc 720
tgggacaaca attatgggga cggtatcagt cccatggcct ggattggcag cgtggacatt 780
ctgcggcgct ggaaggaaca cggctgtcag caagtgaagt atggccagt ctgggtgttt 840
gcggcggtag cctgcacagt gctgcggtgc cttggcatcc ctaccagagt ggtgaccaac 900
tacaactccg cccacgacca gaacagcaac ctgctcatcg agtacttccg aaacgagtac 960
ggggagctgg agagcaacaa gagcgagatg atctggaatt tccactgtg ggtggagtcc 1020
tgatgacca ggccagacct acagccaggc tatgaggggt ggcaggccat tgacccaca 1080
ccgcaggaga agagcgaagg aacatactgt tgtggcccag tctcagtgcg ggccatcaag 1140
gagggtgacc tgagcaccaa gtatgatgcg tccttcgtgt ttgccgaggt caacgctgat 1200
gtgtgggact ggatccggca gtcagatggg tctgtgtca aatccatcaa caattccctg 1260
gtcgtggggc agaagatcag cactaagagc gtgggcccgtg atgaccggga ggacatcacc 1320
tatactaca agtaccaga ggggtcccca gaggagaggg aagtcttcac cagagccaac 1380
cacctgaaca aactggcaga gaaagaggag acaggggtgg ccatgcggat ccgagtgggg 1440
gatggtatga gcttgggcaa tgactttgac gtgtttgcc acatcggcaa cgacacctcg 1500

gagagccgtg agtgccgcct cctgctctgt gccgcactg tcagctacaa cggcgtgctg 1560
 gggcccgagt gtggcactga ggacatcaac ctgaccctgg atccctactc tgagaacagc 1620
 atcccccttc gcatacctcta cgagaagtac agcgggtgcc tgaccgagtc aaacctcatc 1680
 aagggtcgagg gtctcctcgt cgagccagcc gctaacagct acctgctggc tgagagagat 1740
 ctctacctgg agaatcctga aatcaagatc cggatcctgg gggagcccaa gcagaaccgc 1800
 aaactggtgg ctgaggtgtc cctgaagaac ccactttctg attccctgta tgactgtgtc 1860
 ttactgtgg agggggctgg cctgaccaag gaacagaagt ctgtggaggt ctgagacctc 1920
 gtgccagcag gagatgcggt caagggtcgg gttgacctgt tcccgactga tattggcctc 1980
 cacaagttgg tggatgaactt ccagtgtgac aagctgaagt cggtaaggg ttaccggaat 2040
 atcatcatcg gcccgacctg ag 2062

<210> 4

<211> 686

<212> ПРТ

<213> Rattus

<220>

<223> Амінокислотна послідовність ТГ2 паціюка

<400> 4

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

165 170 175
 Ser Val Pro Trp Asn Phe Gly Gln Phe Glu Asp Gly Ile Leu Asp Ala
 180 185 190
 Cys Leu Met Leu Leu Asp Val Asn Pro Lys Phe Leu Lys Asp Arg Ser
 195 200 205
 Arg Asp Cys Ser Arg Arg Ser Ser Pro Ile Tyr Val Gly Arg Val Val
 210 215 220
 Ser Gly Met Val Asn Cys Asn Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gly Arg
 225 230 235 240
 Trp Asp Asn Asn Tyr Gly Asp Gly Ile Ser Pro Met Ala Trp Ile Gly
 245 250 255
 Ser Val Asp Ile Leu Arg Arg Trp Lys Glu His Gly Cys Gln Gln Val
 260 265 270
 Lys Tyr Gly Gln Cys Trp Val Phe Ala Ala Val Ala Cys Thr Val Leu
 275 280 285
 Arg Cys Leu Gly Ile Pro Thr Arg Val Val Thr Asn Tyr Asn Ser Ala
 290 295 300
 His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe Arg Asn Glu Tyr
 305 310 315 320
 Gly Glu Leu Glu Ser Asn Lys Ser Glu Met Ile Trp Asn Phe His Cys
 325 330 335
 Trp Val Glu Ser Trp Met Thr Arg Pro Asp Leu Gln Pro Gly Tyr Glu
 340 345 350
 Gly Trp Gln Ala Ile Asp Pro Thr Pro Gln Glu Lys Ser Glu Gly Thr
 355 360 365
 Tyr Cys Cys Gly Pro Val Ser Val Arg Ala Ile Lys Glu Gly Asp Leu
 370 375 380
 Ser Thr Lys Tyr Asp Ala Ser Phe Val Phe Ala Glu Val Asn Ala Asp
 385 390 395 400
 Val Val Asp Trp Ile Arg Gln Ser Asp Gly Ser Val Leu Lys Ser Ile
 405 410 415
 Asn Asn Ser Leu Val Val Gly Gln Lys Ile Ser Thr Lys Ser Val Gly
 420 425 430
 Arg Asp Asp Arg Glu Asp Ile Thr Tyr Thr Tyr Lys Tyr Pro Glu Gly
 435 440 445
 Ser Pro Glu Glu Arg Glu Val Phe Thr Arg Ala Asn His Leu Asn Lys
 450 455 460
 Leu Ala Glu Lys Glu Glu Thr Gly Val Ala Met Arg Ile Arg Val Gly
 465 470 475 480
 Asp Gly Met Ser Leu Gly Asn Asp Phe Asp Val Phe Ala His Ile Gly
 485 490 495
 Asn Asp Thr Ser Glu Ser Arg Glu Cys Arg Leu Leu Leu Cys Ala Arg
 500 505 510
 Thr Val Ser Tyr Asn Gly Val Leu Gly Pro Glu Cys Gly Thr Glu Asp
 515 520 525
 Ile Asn Leu Thr Leu Asp Pro Tyr Ser Glu Asn Ser Ile Pro Leu Arg
 530 535 540
 Ile Leu Tyr Glu Lys Tyr Ser Gly Cys Leu Thr Glu Ser Asn Leu Ile
 545 550 555 560
 Lys Val Arg Gly Leu Leu Val Glu Pro Ala Ala Asn Ser Tyr Leu Leu
 565 570 575
 Ala Glu Arg Asp Leu Tyr Leu Glu Asn Pro Glu Ile Lys Ile Arg Ile

580	585	590
Leu Gly Glu Pro Lys Gln Asn Arg Lys Leu Val Ala Glu Val Ser Leu		
595	600	605
Lys Asn Pro Leu Ser Asp Ser Leu Tyr Asp Cys Val Phe Thr Val Glu		
610	615	620
Gly Ala Gly Leu Thr Lys Glu Gln Lys Ser Val Glu Val Ser Asp Pro		
625	630	635
Val Pro Ala Gly Asp Ala Val Lys Val Arg Val Asp Leu Phe Pro Thr		
645	650	655
Asp Ile Gly Leu His Lys Leu Val Val Asn Phe Gln Cys Asp Lys Leu		
660	665	670
Lys Ser Val Lys Gly Tyr Arg Asn Ile Ile Ile Gly Pro Ala		
675	680	685

<210> 5
 <211> 2061
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> source
 <222> 1..2061
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="Нуклеотидна послідовність ТГ2 миші"
 /організм="Mus musculus"

<400> 5
 atggcagagg agctgtcctt ggagaggtgt gatttggaga ttcaggccaa tggccgtgac 60
 caccacacgg cgcacctatg ccaagagaaa ctggtgtctg gtcgttgtca gcgcttccgg 120
 ctgactctgt acttcgaggg ccgtggctac gaggccagcg tggacagcct cacgttcggt 180
 gctgtgaccg gccagatcc cagtgaagag gcagggacca aggcccgctt ctactgtct 240
 gacaatgtgg aggagggatc ttgtcagcc tcagtgtctg accaacagga caatgtcctc 300
 tcgtacagc tctgcacccc agccaatgct cctattggcc tgtaccgtct cagcctagag 360
 gcttctactg gctaccaggg ctccagcttt gtgtgtggcc acttcatcct gctctacaat 420
 gcctgtgtgc cagccgatga tgtgtacctg gactcagagg aggagcgacg ggaatatgtc 480
 cttacgcaac agggcttcat ctaccaaggc tctgtcaagt tcatcaagag tgtgccttgg 540
 aactttgggc agttcgagga tggaatcctg gatacctgcc tgatgtctt ggatatgaac 600
 cccaagttcc tgaagaaccg tagtcgggac tgctcacgcc gcagcagtc catctatgtg 660
 ggccgcgtgg tgagcgccat ggtcaactgc aatgatgacc aggtgtgtct tctgggccgc 720
 tgggacaaca actatgggga tggtatcagt cccatggcct ggattggcag tgtggacatt 780

ctgcggcgct ggaaggaaca cggctgtcag caagtgaagt acgggcagtg ctgggtgttt 840
 gcagcgggtgg cctgcacagt gctgcggtgc ctggcatcc ctaccagagt ggtgaccaac 900
 tacaactccg cccacgacca gaacagcaac ctgctcatcg agtactccg aaatgagttc 960
 ggggagctgg agagcaacaa gagcgagatg atctggaact tccactgctg ggtggagtcc 1020
 tggatgacca ggccagacct acagccgggc tatgaggggt ggcaggccat tgaccccaca 1080
 ccacaggaga agagcgaagg gacatactgt tgtggcccag tctcagtgcg agccatcaag 1140
 gagggagacc tgagtaccaa gtatgatgca cccttcgtgt ttgccgaggt caacgctgat 1200
 gtggtggact ggatccggca ggaagatggg tctgtgctca aatccatcaa ccgttccttg 1260
 gtcgtggggc agaagatcag cactaagagt gtgggccgtg atgaccggga ggacatcacc 1320
 catactaca agtaccaga ggggtcacc gaggagaggg aagtcttcac caaggccaac 1380
 cacctgaaca aactggcaga gaaagaggag acaggggtgg ccatgcgcat ccgagtgggg 1440
 gacagtatga gcatgggcaa cgacttcgac gtgttgccc acatcggcaa cgacacctcg 1500
 gagactcgag agtgtcgtct cctgctctgt gccgcactg tcagctaaa cggggtgctg 1560
 gggcccgagt gtggcactga ggacatcaac ctgaccctgg atccctactc tgagaacagc 1620
 atcccacttc gaatcctcta cgagaagtac agcgggtgcc tgacagagtc aaacctcatc 1680
 aagggtcggg gccttctcat cgaaccagct gccaacagct acctgctggc tgagagagat 1740
 ctctacctgg agaatcccga aatcaagatc cgggtcctgg gagaacccaa gcaaaaccgc 1800
 aaactggtgg ctgaggtgtc cctgaagaac ccactttccg atcccctgta tgactgcatc 1860
 ttactgtgg agggggctgg cctgaccaag gagcagaagt ctgtggaagt ctgagaccg 1920
 gtgccagcgg gcgatttgg caaggcacgg gtcgacctgt tccgactga tattggcctc 1980
 cacaagctgg tggtaactt ccagtgtgac aagctgaagt cggtaaggg ttaccggaat 2040
 gttatcatcg gcccgcccta a 2061

<210> 6
 <211> 686
 <212> PPT
 <213> Mus musculus
 <220>

<223> Амінокислотна послідовність ТГ2 паціюка

<400> 6

Met Ala Glu Glu Leu Leu Leu Glu Arg Cys Asp Leu Glu Ile Gln Ala
1 5 10 15
Asn Gly Arg Asp His His Thr Ala Asp Leu Cys Gln Glu Lys Leu Val
20 25 30
Leu Arg Arg Gly Gln Arg Phe Arg Leu Thr Leu Tyr Phe Glu Gly Arg
35 40 45
Gly Tyr Glu Ala Ser Val Asp Ser Leu Thr Phe Gly Ala Val Thr Gly
50 55 60
Pro Asp Pro Ser Glu Glu Ala Gly Thr Lys Ala Arg Phe Ser Leu Ser
65 70 75 80
Asp Asn Val Glu Glu Gly Ser Trp Ser Ala Ser Val Leu Asp Gln Gln
85 90 95
Asp Asn Val Leu Ser Leu Gln Leu Cys Thr Pro Ala Asn Ala Pro Ile
100 105 110
Gly Leu Tyr Arg Leu Ser Leu Glu Ala Ser Thr Gly Tyr Gln Gly Ser
115 120 125
Ser Phe Val Leu Gly His Phe Ile Leu Leu Tyr Asn Ala Trp Cys Pro
130 135 140
Ala Asp Asp Val Tyr Leu Asp Ser Glu Glu Glu Arg Arg Glu Tyr Val
145 150 155 160
Leu Thr Gln Gln Gly Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Val Lys Phe Ile Lys
165 170 175
Ser Val Pro Trp Asn Phe Gly Gln Phe Glu Asp Gly Ile Leu Asp Thr
180 185 190
Cys Leu Met Leu Leu Asp Met Asn Pro Lys Phe Leu Lys Asn Arg Ser
195 200 205
Arg Asp Cys Ser Arg Arg Ser Ser Pro Ile Tyr Val Gly Arg Val Val
210 215 220
Ser Ala Met Val Asn Cys Asn Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gly Arg
225 230 235 240
Trp Asp Asn Asn Tyr Gly Asp Gly Ile Ser Pro Met Ala Trp Ile Gly
245 250 255
Ser Val Asp Ile Leu Arg Arg Trp Lys Glu His Gly Cys Gln Gln Val
260 265 270
Lys Tyr Gly Gln Cys Trp Val Phe Ala Ala Val Ala Cys Thr Val Leu
275 280 285
Arg Cys Leu Gly Ile Pro Thr Arg Val Val Thr Asn Tyr Asn Ser Ala
290 295 300
His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe Arg Asn Glu Phe
305 310 315 320
Gly Glu Leu Glu Ser Asn Lys Ser Glu Met Ile Trp Asn Phe His Cys
325 330 335
Trp Val Glu Ser Trp Met Thr Arg Pro Asp Leu Gln Pro Gly Tyr Glu
340 345 350
Gly Trp Gln Ala Ile Asp Pro Thr Pro Gln Glu Lys Ser Glu Gly Thr
355 360 365
Tyr Cys Cys Gly Pro Val Ser Val Arg Ala Ile Lys Glu Gly Asp Leu
370 375 380
Ser Thr Lys Tyr Asp Ala Pro Phe Val Phe Ala Glu Val Asn Ala Asp

385 390 395 400
 Val Val Asp Trp Ile Arg Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Lys Ser Ile
 405 410 415
 Asn Arg Ser Leu Val Val Gly Gln Lys Ile Ser Thr Lys Ser Val Gly
 420 425 430
 Arg Asp Asp Arg Glu Asp Ile Thr His Thr Tyr Lys Tyr Pro Glu Gly
 435 440 445
 Ser Pro Glu Glu Arg Glu Val Phe Thr Lys Ala Asn His Leu Asn Lys
 450 455 460
 Leu Ala Glu Lys Glu Glu Thr Gly Val Ala Met Arg Ile Arg Val Gly
 465 470 475 480
 Asp Ser Met Ser Met Gly Asn Asp Phe Asp Val Phe Ala His Ile Gly
 485 490 495
 Asn Asp Thr Ser Glu Thr Arg Glu Cys Arg Leu Leu Leu Cys Ala Arg
 500 505 510
 Thr Val Ser Tyr Asn Gly Val Leu Gly Pro Glu Cys Gly Thr Glu Asp
 515 520 525
 Ile Asn Leu Thr Leu Asp Pro Tyr Ser Glu Asn Ser Ile Pro Leu Arg
 530 535 540
 Ile Leu Tyr Glu Lys Tyr Ser Gly Cys Leu Thr Glu Ser Asn Leu Ile
 545 550 555 560
 Lys Val Arg Gly Leu Leu Ile Glu Pro Ala Ala Asn Ser Tyr Leu Leu
 565 570 575
 Ala Glu Arg Asp Leu Tyr Leu Glu Asn Pro Glu Ile Lys Ile Arg Val
 580 585 590
 Leu Gly Glu Pro Lys Gln Asn Arg Lys Leu Val Ala Glu Val Ser Leu
 595 600 605
 Lys Asn Pro Leu Ser Asp Pro Leu Tyr Asp Cys Ile Phe Thr Val Glu
 610 615 620
 Gly Ala Gly Leu Thr Lys Glu Gln Lys Ser Val Glu Val Ser Asp Pro
 625 630 635 640
 Val Pro Ala Gly Asp Leu Val Lys Ala Arg Val Asp Leu Phe Pro Thr
 645 650 655
 Asp Ile Gly Leu His Lys Leu Val Val Asn Phe Gln Cys Asp Lys Leu
 660 665 670
 Lys Ser Val Lys Gly Tyr Arg Asn Val Ile Ile Gly Pro Ala
 675 680 685

<210> 7

<211> 11

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AB-1, BB-7 i DC-1 CDR

<400> 7

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr
 1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AB-1 CDR

<400> 8

Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AB-1 і DC-1 CDR

<400> 9

Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AB-1 і BB-7 CDR

<400> 10

Ser Ser Ala Met Ser

1 5

<210> 11

<211> 17

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AB-1 CDR

<400> 11

Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AB-1 CDR

<400> 12
Leu Ile Ser Leu Tyr
1 5

<210> 13
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> BB-7 CDR - 1

<400> 13
Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> BB-7 CDR - 1

<400> 14
Leu Gln Tyr Val Asp Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 15
<211> 17
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> BB-7 CDR

<400> 15
Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 16
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> BB-7 CDR

<400> 16

Leu Ile Ser Pro Tyr

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DC-1 CDR

<400> 17

Leu Val Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 18

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DC-1 CDR

<400> 18

Thr His Ala Met Ser

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DC-1 CDR

<400> 19

Leu Ile Ser Thr Tyr

1 5

<210> 20

<211> 331

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Амінокислоти 143 - 473 ТГ2 людини

<400> 20

Cys Pro Ala Asp Ala Val Tyr Leu Asp Ser Glu Glu Glu Arg Gln Glu

1 5 10 15
 Tyr Val Leu Thr Gln Gln Gly Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Ala Lys Phe
 20 25 30
 Ile Lys Asn Ile Pro Trp Asn Phe Gly Gln Phe Glu Asp Gly Ile Leu
 35 40 45
 Asp Ile Cys Leu Ile Leu Leu Asp Val Asn Pro Lys Phe Leu Lys Asn
 50 55 60
 Ala Gly Arg Asp Cys Ser Arg Arg Ser Ser Pro Val Tyr Val Gly Arg
 65 70 75 80
 Val Val Ser Gly Met Val Asn Cys Asn Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu
 85 90 95
 Gly Arg Trp Asp Asn Asn Tyr Gly Asp Gly Val Ser Pro Met Ser Trp
 100 105 110
 Ile Gly Ser Val Asp Ile Leu Arg Arg Trp Lys Asn His Gly Cys Gln
 115 120 125
 Arg Val Lys Tyr Gly Gln Cys Trp Val Phe Ala Ala Val Ala Cys Thr
 130 135 140
 Val Leu Arg Cys Leu Gly Ile Pro Thr Arg Val Val Thr Asn Tyr Asn
 145 150 155 160
 Ser Ala His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe Arg Asn
 165 170 175
 Glu Phe Gly Glu Ile Gln Gly Asp Lys Ser Glu Met Ile Trp Asn Phe
 180 185 190
 His Cys Trp Val Glu Ser Trp Met Thr Arg Pro Asp Leu Gln Pro Gly
 195 200 205
 Tyr Glu Gly Trp Gln Ala Leu Asp Pro Thr Pro Gln Glu Lys Ser Glu
 210 215 220
 Gly Thr Tyr Cys Cys Gly Pro Val Pro Val Arg Ala Ile Lys Glu Gly
 225 230 235 240
 Asp Leu Ser Thr Lys Tyr Asp Ala Pro Phe Val Phe Ala Glu Val Asn
 245 250 255
 Ala Asp Val Val Asp Trp Ile Gln Gln Asp Asp Gly Ser Val His Lys
 260 265 270
 Ser Ile Asn Arg Ser Leu Ile Val Gly Leu Lys Ile Ser Thr Lys Ser
 275 280 285
 Val Gly Arg Asp Glu Arg Glu Asp Ile Thr His Thr Tyr Lys Tyr Pro
 290 295 300
 Glu Gly Ser Ser Glu Glu Arg Glu Ala Phe Thr Arg Ala Asn His Leu
 305 310 315 320
 Asn Lys Leu Ala Glu Lys Glu Glu Thr Gly Met
 325 330

<210> 21

<211> 23

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Амінокислоти 304 - 326 ТГ2 людини

<400> 21

Ala His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe Arg Asn Glu

1 5 10 15
Phe Gly Glu Ile Gln Gly Asp
20

<210> 22
<211> 15
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Амінокислоти 351 - 365 ТГ2 людини

<400> 22
Tyr Glu Gly Trp Gln Ala Leu Asp Pro Thr Pro Gln Glu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 23
<211> 18
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Амінокислоти 450 - 467 ТГ2 людини

<400> 23
Ser Glu Glu Arg Glu Ala Phe Thr Arg Ala Asn His Leu Asn Lys Leu
1 5 10 15
Ala Glu

<210> 24
<211> 15
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<400> 24
Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr Trp Phe
1 5 10 15

<210> 25
<211> 14
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<400> 25
Thr Leu Ile Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro

1 5 10

<210> 26
<211> 27
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 15,16
<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 26
Thr Leu Ile Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Xaa Xaa
1 5 10 15
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe
 20 25

<210> 27
<211> 13
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<400> 27
Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr Phe Gly
1 5 10

<210> 28
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<400> 28
Phe Thr Leu Ser Ser Ser Ala Met Ser Trp Val Arg
1 5 10

<210> 29
<211> 17
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 2,4,5

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 29

Cys Xaa Ala Xaa Xaa Phe Thr Leu Ser Ser Ser Ala Met Ser Trp Val

1 5 10 15

Arg

<210> 30

<211> 26

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<400> 30

Trp Val Ala Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp

1 5 10 15

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg

20 25

<210> 31

<211> 33

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 27,29,30,31,32

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 31

Trp Val Ala Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp

1 5 10 15

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Xaa

20 25 30

Leu

<210> 32

<211> 11

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<400> 32

Tyr Cys Ala Lys Leu Ile Ser Leu Tyr Trp Gly
1 5 10

<210> 33

<211> 74

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність антитіла

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222>

12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 33

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Thr Asn Arg Leu Phe
20 25 30

Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr
65 70

<210> 34

<211> 49

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність антитіла

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222>

12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 34

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Phe

<210> 35
 <211> 23
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність антитіла

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22
 <223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 35
 Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe
 20

<210> 36
 <211> 26
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність антитіла

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17
 <223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 36
 Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr
 20 25

<210> 37
 <211> 15
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<400> 37

Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr Trp Tyr
1 5 10 15

<210> 38

<211> 14

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<400> 38

Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro
1 5 10

<210> 39

<211> 14

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<400> 39

Ser Leu Ile Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro
1 5 10

<210> 40

<211> 27

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 15,16

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 40

Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Xaa Xaa
1 5 10 15
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe
 20 25

<210> 41

<211> 27

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 15,16
<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 41
Ser Leu Ile Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Xaa Xaa
1 5 10 15
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe
 20 25

<210> 42
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<400> 42
Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Trp Val Arg
1 5 10

<210> 43
<211> 17
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 2,4,5
<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 43
Cys Xaa Ala Xaa Xaa Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Trp Val
1 5 10 15
Arg

<210> 44
<211> 26
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<400> 44

Trp Val Ser Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 20 25

<210> 45

<211> 33

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 27,29,30,31,32

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 45

Trp Val Ser Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
Leu

<210> 46

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область легкого ланцюга AB-1

<400> 46

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

<210> 47
<211> 107
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область легкого ланцюга AB-1

<400> 47
Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr
 85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 48
<211> 106
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AB-1_VK

<400> 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr
 85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105

<210> 49
<211> 107
<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AB-1_VK1

<400> 49

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

<210> 50

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> hAB-1_RKE

<400> 50

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

<210> 51

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> hAB-1_RKJ

<400> 51

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

<210> 52

<211> 114

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область важкого ланцюга АВ-1

<400> 52

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

<210> 53

<211> 114

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область важкого ланцюга АВ-1

<400> 53

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

<210> 54
 <211> 114
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AB-1_VH

<400> 54
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Arg Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Leu Ile Ser Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 55
 <211> 114
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> hAB-1_RHA

<400> 55

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

<210> 56

<211> 74

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність антитіла

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222>

12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 56

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Thr Asn Arg Leu Met
 20 25 30
 Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Leu Gln Tyr Val Asp Phe Pro Tyr Thr
 65 70

<210> 57

<211> 48

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність антитіла

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222>

12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 57

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe

35 40 45

<210> 58

<211> 22

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність антитіла

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 58

Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe

20

<210> 59

<211> 27

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність антитіла

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 59

Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Leu Gln Tyr Val Asp Phe Pro Tyr Thr

20

25

<210> 60

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область легкого ланцюга BB-7

<400> 60

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Glu Phe Leu Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu His

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 61

<211> 114

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область важкого ланцюга BB-7

<400> 61

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ile Phe Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Leu Ile Ser Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 62
<211> 107
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область легкого ланцюга BB-7 (гуманізована)

<400> 62
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 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30
Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Phe Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Val Asp Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 63
<211> 107
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область легкого ланцюга BB-7 (гуманізована)

<400> 63
Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30
Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45
Tyr Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Gln Glu Phe Leu Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Val Asp Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 64
<211> 114
<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область важкого ланцюга BB-7 (гуманізована)

<400> 64

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

<210> 65

<211> 114

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область важкого ланцюга BB-7 (гуманізована)

<400> 65

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

<210> 66

<211> 74

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність антитіла

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222>

12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 66

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Val Asn Arg Leu Val

20 25 30

Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

35 40 45

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

50 55 60

Xaa Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr

65 70

<210> 67

<211> 49

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність антитіла

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222>

12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 67

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

35 40 45

Ala

<210> 68

<211> 23

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність антитіла

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 68

Leu Val Asn Arg Leu Val Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
20

<210> 69

<211> 26

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність антитіла

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 69

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr
20 25

<210> 70

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область легкого ланцюга DC-1

<400> 70

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ala Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr
 85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 71

<211> 114

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область важкого ланцюга DC-1

<400> 71

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

<210> 72

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область легкого ланцюга DC-1 (гуманізована)

<400> 72

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 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
Tyr Leu Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Phe Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 73

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область легкого ланцюга DC-1 (гуманізована)

<400> 73

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

<210> 74

<211> 114

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область важкого ланцюга DC-1 (гуманізована)

<400> 74

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

Ser Ser

<210> 75

<211> 114

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область важкого ланцюга DC-1 (гуманізована)

<400> 75

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr His

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Ile Ser Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 76

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> 1,2,6

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 76

Xaa Xaa Asn Arg Leu Xaa Asp

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> 4

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 77

Leu Gln Tyr Xaa Asp Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 78

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> 1,2

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 78

Xaa Xaa Ala Met Ser

1 5

<210> 79

<211> 17

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> 4,7,8

<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 79

Thr Ile Ser Xaa Gly Gly Xaa Xaa Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 80

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> 4
<223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 80
Leu Ile Ser Xaa Tyr
1 5

<210> 81
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> 1
<223> Може також бути Gln або Arg.

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> 5
<223> Може також бути Gly.

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> 7
<223> Може також бути Ser або Arg.

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> 8
<223> Може також бути Asn.

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> 11
<223> Може також бути Asn або Ala.

<400> 81
Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr
1 5 10

<210> 82
<211> 7
<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1

<223> Може також бути Leu або Val або Asp або Ala.

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 2

<223> Може також бути Val або Ala.

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 3

<223> Може також бути Ser.

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 4

<223> Може також бути Asn.

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 6

<223> Може також бути Met або, Val, або Glu або Gln.

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 7

<223> Може також бути Thr або Ser.

<400> 82

Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1

<223> Може також бути Gln.

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 3
<223> Може також бути His.

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 4
<223> Може також бути Val або Asn.

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 5
<223> Може також бути Thr.

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 6
<223> Може також бути Tyr.

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 8
<223> Може також бути Leu або Trp.

<400> 83
Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 84
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 1
<223> Може також бути Thr.

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 2
<223> Може також бути His або Tyr.

<400> 84
Ser Ser Ala Met Ser
1 5

<210> 85

<211> 17
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 1
<223> Може також бути Ala.

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 4
<223> Може також бути Ser або Gly.

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 5
<223> Може також бути Ser.

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 7
<223> Може також бути Arg.

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 8
<223> Може також бути Ser.

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 12
<223> Може також бути Ala.

<400> 85
Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 86
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Антитіло або антигенсполучний фрагмент

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1

<223> Може також бути Asp.

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 2

<223> Може також бути Gly.

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 3

<223> Може також бути Gly.

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 4

<223> Може також бути Pro або Thr або Val.

<400> 86

Leu Ile Ser Leu Tyr

1 5

<210> 87

<211> 106

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область легкого ланцюга DD-9

<400> 87

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asp Tyr Met

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Gly Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Ser Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 88

<211> 119

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область важкого ланцюга DD-9

<400> 88

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

<210> 89

<211> 106

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область легкого ланцюга DH-2

<400> 89

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

<210> 90

<211> 119

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область важкого ланцюга DH-2

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

<210> 91
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> source
 <222> 1..321
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="Ізольований полінуклеотид"
 /організм="Штучна послідовність"

<400> 91
 gacatccaga tgacacagac tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
 atcacttgca aggcgagtcg ggacattaat agctatttaa cctgggtcca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt acaaatagat tgtttgatgg ggtcccatcc 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat ttttttca ccatcagcag cctggaatat 240
 gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgact ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaaac tggaataaaa a 321

<210> 92
 <211> 342
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> source

<222> 1..342

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"

/примітка="Ізольований полінуклеотид"

/організм="Штучна послідовність"

<400> 92

gaagtacagc tggaggagtc agggggggggc ttagtgaagc ctggaggggc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactctcagt tcctctgccca tgtctgggt tcgccagact 120

ccggacagga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgttg gtggtggtaa aacctactat 180

ccagacagtg tgaagggctg cttcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctctat 240

ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaaactaatc 300

agtctctact ggggccaaagg caccactctc acagtctcct ca 342

<210> 93

<211> 321

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> source

<222> 1..321

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"

/примітка="Ізольований полінуклеотид"

/організм="Штучна послідовність"

<400> 93

gccatcaaga tgaccagtc tccatcttc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcac 60

atcacttgca aggcgagtc ggacataaat agttatttaa cctgggtcca acagaaacca 120

ggaaagtctc ctaagaccct gatctatctt acaaatagat tgatggatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagaa ttttactca ccatcagcgg cctggaacat 240

gaagatatgg gcatttatta ttgtctccag tatgttgact ttccgtacac gttcggaggg 300

gggaccaagc tggaataaaa a 321

<210> 94

<211> 342

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> source

<222> 1..342

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"

/примітка="Ізольований полінуклеотид"

/організм="Штучна послідовність"

<400> 94

gcagtgcaac tggtagagtc tgggggaggc ttggtgaagc ctggaggggc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggaat catttcagt tcctctgcca tgtctgggt tcgccagact 120

ccggaaaaga gactggagtg ggtcgcaact attagtagtg gtggtcgttc cacctactat 180

ccagacagtg tgaagggctg attcaccgtc tccagagaca gtgccaagaa caccctatac 240

ctgcaaatgg acagtctgag gtctgaggac acggccattt attactgtgc aaaactaatc 300

agtcctact gggggccaagg caccactctc acagtctcct ca 342

<210> 95

<211> 321

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> source

<222> 1..321

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"

/примітка="Ізольований полінуклеотид"

/організм="Штучна послідовність"

<400> 95

gacatcacga tgaccagtc tccatcttc atatatgcat ctctgggaga gagagtcact 60

atcacttgca aggcgagtc ggacattaat agctatttaa cctgggtcca gcagaaacca 120

gggaaatctc ctaagatcct gatctatctt gtaaatagat tggtagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tatgtctca ccatcagcag tctggaatat 240

gaagatatgg gaatttatta ttgtctacaa tatgatgact ttccgtacac gttcggaggg 300

gggaccaagc tggaataaaa a 321

<210> 96

<211> 342

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> source

<222> 1..342

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="Ізольований полінуклеотид"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 96

gaagtgcagt tggaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactctcagt acccatgcc a tgtctgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtcgttc cacctactat 180

ccagacagtg tgaagggctg attcactatc tccagagaca atgtcaagaa caccctatat 240

ctgcaactga gcagtctgag gtctgaggac acggccgtgt atttctgtgc aagactaatc 300

agtacctact ggggccaaagg caccactctc acagtctcct ca 342

<210> 97

<211> 39

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> source

<222> 1..39

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="Прямий праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 97

gcgcgcgcta gctgccagc ggatgctgtg tacctggac 39

<210> 98

<211> 39

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> source

<222> 1..39

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="Зворотний праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 98

gcgcgcaagc ttcatccctg tctcctcctt ctcggccag 39

<210> 99

<211> 25
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="TG2-FL-1 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 99
atggccgagg agctggcttt agaga 25

<210> 100
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..26
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="TG2-FL-2 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 100
ggcggggcca atgatgacat tccgga 26

<210> 101
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..29
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МН1 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<220>
<221> misc_difference
<222> 18
<223> /примітка="Може бути будь-який нуклеотид."

<400> 101
cgcgcgctcg agsargtnma gctgsagtc 29

<210> 102
<211> 32
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..32
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МН2 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<220>
<221> misc_difference
<222> 18
<223> /примітка="Може бути будь-який нуклеотид."

<400> 102
cgcgcgctcg agsargtnma gctgsagsag tc 32

<210> 103
<211> 43
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..43
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="Mouse-G1 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 103
aggcgcgagta ctacaatccc tgggcacaaat tttctgtcc acc 43

<210> 104
<211> 39
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..39
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="Mouse-G2a праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 104
aggcgcgagta ctacagggct tgattgtggg ccctctggg 39

<210> 105
 <211> 40
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> source
 <222> 1..40
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="Mouse-G2b праймер"
 /організм="Штучна послідовність"

 <400> 105
 aggcgcagta ctacaggggt tgattgtga aatgggcccg 40

<210> 106
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> source
 <222> 1..32
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="VK1 праймер"
 /організм="Штучна послідовність"

 <400> 106
 cgctgcgagc tcgatattgt gatgacbcag dc 32

<210> 107
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> source
 <222> 1..32
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="VK2 праймер"
 /організм="Штучна послідовність"

 <400> 107
 cgctgcgagc tcgagrtkt gatgaccar ac 32

<210> 108
 <211> 32
 <212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> source

<222> 1..32

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="VK3 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 108

cgctgcgagc tcgaaaatgt gctcacccag tc

32

<210> 109

<211> 32

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> source

<222> 1..32

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="VK4 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 109

cgctgcgagc tcgayattgt gatgacacag tc

32

<210> 110

<211> 32

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> source

<222> 1..32

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="VK5 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 110

cgctgcgagc tcgacatcca gatgacacag ac

32

<210> 111

<211> 32

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> source

<222> 1..32
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="VK6 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 111
cgctgcgagc tcgayattgt gctsacycar tc 32

<210> 112
<211> 32
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..32
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="VK7 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 112
cgctgcgagc tcgacatcca gatgacycar tc 32

<210> 113
<211> 32
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..32
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="VK8 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 113
cgctgcgagc tccaaattgt tctcaccag tc 32

<210> 114
<211> 34
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="K-CONST праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 114
gcgccgtcta gaattaacac tcattcctgt tga

34

<210> 115
<211> 114
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AB_VHc

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 5
<223> Може бути будь-яка амінокислота.

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

<210> 116
<211> 115
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AF062260

<400> 116
Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
20 25 30
Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

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

<210> 117
 <211> 30
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AB_VHc залишки наближеності 5Å

<400> 117
 Glu Val Gln Leu Cys Ala Phe Thr Leu Ser Trp Val Arg Trp Val Ala
 1 5 10 15
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Leu Tyr Cys Ala Lys Trp Gly
 20 25 30

<210> 118
 <211> 30
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AF062260 залишки наближеності 5Å

<400> 118
 Glu Val Gln Leu Cys Ala Phe Thr Phe Ser Trp Val Arg Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Leu Tyr Cys Ala Lys Trp Gly
 20 25 30

<210> 119
 <211> 98
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Z12347.seq

<400> 119
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

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

<210> 120
 <211> 98
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AF062260.seq

<400> 120
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg

<210> 121
 <211> 107
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AB_VKc

<400> 121
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr

65 70 75 80
 Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 122
 <211> 107
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AY247656

<400> 122
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 123
 <211> 32
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> АВ_VKc залишки наближеності 5Å

<400> 123
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Thr Cys Trp Phe Thr Leu Ile Tyr Gly Val
 1 5 10 15
 Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Tyr Cys Phe Gly
 20 25 30

<210> 124
 <211> 32
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> AY247656 залишки наближеності 5Å

<400> 124

Glu Ile Val Leu Thr Gln Thr Cys Trp Tyr Leu Leu Ile Tyr Gly Val
1 5 10 15
Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Tyr Cys Phe Gly
20 25 30

<210> 125

<211> 96

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> X93620.seq

<400> 125

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

<210> 126

<211> 96

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AY247656.seq

<400> 126

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

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

<210> 127
 <211> 107
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AB_VKc

<400> 127
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
 65 70 75 80
 Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 128
 <211> 107
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AF193851

<400> 128
 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 Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Thr Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 129

<211> 32

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> АВ_VKс залишки наближеності 5Å

<400> 129

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Cys Trp Phe Thr Leu Ile Tyr Gly Val

1 5 10 15

Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Tyr Cys Phe Gly

20 25 30

<210> 130

<211> 32

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AF193851 залишки наближеності 5Å

<400> 130

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Cys Trp Phe Ser Leu Ile Tyr Gly Val

1 5 10 15

Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Tyr Cys Phe Gly

20 25 30

<210> 131

<211> 96

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> J00248.seq

<400> 131

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 Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
 85 90 95

<210> 132
 <211> 96
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AF193851.seq

<400> 132
 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 Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Thr Tyr Pro Trp
 85 90 95

<210> 133
 <211> 114
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AB_VHc

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 5
 <223> Може бути будь-яка амінокислота.

<400> 133
 Glu Val Gln Leu Xaa Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Arg Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

<210> 134
 <211> 114
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AB_RHA

<400> 134
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Leu Ile Ser Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 135
 <211> 107
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AB_VKc

<400> 135
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr
 85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 136
<211> 107
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AB_RKE

<400> 136
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Phe Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr
 85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 137
<211> 107
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AB_RKJ

<400> 137
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 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Phe Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 138
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..36
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="RACE якірний праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<220>
<221> misc_difference
<222> 24,25,29,30,34,35
<223> /примітка="де нуклеотид являє собою дезоксиинозин."

<400> 138
ggccacgcgt cgactagtac gggnnngggnn gggngg 36

<210> 139
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..27
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="MHV1 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 139
atgaaatgca gctggggcat cttcttc 27

<210> 140
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..26
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="MHV2 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 140
atgggatgga gctrtatcat sytctt 26

<210> 141
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..27
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МНВ3 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 141
atgaagwtgt ggtaaactg ggttttt 27

<210> 142
<211> 25
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МНВ4 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 142
atgracttg ggytcagctt grttt 25

<210> 143
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..30
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МНВ5 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 143
atggactcca ggctcaattt agttttcctt 30

<210> 144
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> source
 <222> 1..27
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="МНВ6 праймер"
 /організм="Штучна послідовність"

 <400> 144
 atggctgtcy trsgctctct cttctgc 27

<210> 145
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> source
 <222> 1..26
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="МНВ7 праймер"
 /організм="Штучна послідовність"

 <400> 145
 atggratgga gckggrtctt tmtctt 26

<210> 146
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> source
 <222> 1..23
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="МНВ8 праймер"
 /організм="Штучна послідовність"

 <400> 146
 atgagagtgc tgattctttt gtg 23

<210> 147
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..30
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="MHV9 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 147
atggmttggg tgtggamctt gctattcctg

30

<210> 148
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..27
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="MHV10 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 148
atgggcagac ttacattctc attcctg

27

<210> 149
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..28
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="MHV11 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 149
atggattttg ggctgatttt ttttattg

28

<210> 150
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..27

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="MHV12 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 150
atgatggtgt taagtcttct gtacctg

27

<210> 151
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..21
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="MHCG1 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 151
cagtggatag acagatgggg g

21

<210> 152
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..21
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="MHCG2A праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 152
cagtggatag accgatgggg c

21

<210> 153
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..21
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="MHCG2b праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<p><400> 153 cagtggatag actgatgggg g</p>	21
<p><210> 154 <211> 21 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p>	
<p><220> <221> source <222> 1..21 <223> /мол_тип="невизначена ДНК" /примітка="МНСГ3 праймер" /організм="Штучна послідовність"</p>	
<p><400> 154 caagggatag acagatgggg c</p>	21
<p><210> 155 <211> 30 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p>	
<p><220> <221> source <222> 1..30 <223> /мол_тип="невизначена ДНК" /примітка="МКV1 30-мер" /організм="Штучна послідовність"</p>	
<p><400> 155 atgaagttgv vtgtaggct gttggtgctg</p>	30
<p><210> 156 <211> 30 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p>	
<p><220> <221> source <222> 1..30 <223> /мол_тип="невизначена ДНК" /примітка="МКV2 29-мер" /організм="Штучна послідовність"</p>	
<p><400> 156 atggagwcag acacactcct gytatgggtg</p>	30

<210> 157
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..30
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МКV3 30-мер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 157
atgagtgtgc tcactcaggt cctggsgttg

30

<210> 158
<211> 33
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..33
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МКV4 33-мер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 158
atgaggrccc ctgctcagwt tyttggmwtc ttg

33

<210> 159
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..29
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МКV5 30-мер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 159
atggattwa ggtgcagatt wtcagcttc

29

<210> 160
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..27
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МКV6 27-мер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 160
atgaggtkck ktgktsagst sctgrgg

27

<210> 161
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..31
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МКV7 31-мер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 161
atgggcwtca agatggagtc acakwyucwg g

31

<210> 162
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..31
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МКV8 31-мер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 162
atgtggggay ctktttycmm ttttcaatt g

31

<210> 163
<211> 25
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..25

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МКV9 25-мер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 163
atggrtccw casctcagtt ccttg

25

<210> 164
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..27
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МКV10 27-мер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 164
atgtatatat gtttggtgc tatttct

27

<210> 165
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..28
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МКV11 28-мер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 165
atggaagccc cagctcagct tctcttcc

28

<210> 166
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..26
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="CL12A праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 166
atgragtywc agaccaggt cttyrt 26

<210> 167
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..26
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="CL12В праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 167
atggagacac attctcaggt ctttgt 26

<210> 168
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..26
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="CL13 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 168
atggattcac aggccaggt tcttat 26

<210> 169
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..26
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="CL14 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 169
atgatgagtc ctgccaggt cctgtt 26

<210> 170
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..29
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="CL15 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 170
atgaatttgc ctgtcatct ctggtgct 29

<210> 171
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..29
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="CL16 праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 171
atggattttc aattgctct catctcctt 29

<210> 172
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..26
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="CL17A праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 172
atgagtgcc tarctsagtt cctgrg 26

<210> 173
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..26
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="CL17В праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 173
atgaagtact ctgctcagtt tctagg 26

<210> 174
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..26
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="CL17С праймер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 174
atgaggcatt ctcttcaatt ctggg 26

<210> 175
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="МКС 20-мер"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 175
actggatggt gggaagatgg 20

<210> 176
<211> 114
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> АВ_VHc (mAB001VH)

<400> 176

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

<210> 177

<211> 114

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> BB7_VHc (mbb7001VH)

<400> 177

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

<210> 178

<211> 114

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DC1_VHc (mDC001VH)

<400> 178

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

<210> 179

<211> 115

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AF062260

<400> 179

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

<210> 180

<211> 115

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AF062260

<400> 180

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

<210> 181

<211> 115

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AF062260

<400> 181

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

<210> 182

<211> 30

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> АВ_VHc (mAB001VH) залишки наближеності 5Å

<400> 182

Glu Val Gln Leu Cys Ala Phe Thr Leu Ser Trp Val Arg Trp Val Ala
1 5 10 15
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Leu Tyr Cys Ala Lys Trp Gly
20 25 30

<210> 183

<211> 30

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> BB7_VHc (mbb7001VH) залишки наближеності 5Å

<400> 183

Ala Val Gln Leu Cys Ala Ile Ile Phe Ser Trp Val Arg Trp Val Ala
1 5 10 15
Arg Phe Thr Val Ser Arg Ser Leu Tyr Cys Ala Lys Trp Gly
20 25 30

<210> 184

<211> 30

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DC1_VHc (mDC001VH) залишки наближеності 5Å

<400> 184

Glu Val Gln Leu Cys Ala Phe Thr Leu Ser Trp Val Arg Trp Val Ala
1 5 10 15
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Leu Phe Cys Ala Arg Trp Gly
20 25 30

<210> 185

<211> 30

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AF062260 залишки наближеності 5Å

<400> 185

Glu Val Gln Leu Cys Ala Phe Thr Phe Ser Trp Val Arg Trp Val Ser
1 5 10 15
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Leu Tyr Cys Ala Lys Trp Gly
20 25 30

<210> 186

<211> 30

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AF062260 залишки наближеності 5Å

<400> 186

Ala Val Gln Leu Cys Ala Ile Ile Phe Ser Trp Val Arg Trp Val Ser

1 5 10 15

Arg Phe Thr Val Ser Arg Ser Leu Tyr Cys Ala Lys Trp Gly

20 25 30

<210> 187

<211> 30

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AF062260 залишки наближеності 5Å

<400> 187

Glu Val Gln Leu Cys Ala Phe Thr Phe Ser Trp Val Arg Trp Val Ser

1 5 10 15

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Leu Phe Cys Ala Arg Trp Gly

20 25 30

<210> 188

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AB_VKc (mAB001VK)

<400> 188

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 189

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AY247656

<400> 189

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

<210> 190

<211> 32

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AB_VKc (mAB001VK)

<400> 190

Glu Ile Val Leu Thr Gln Thr Cys Trp Phe Thr Leu Ile Tyr Gly Val
1 5 10 15
Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Tyr Cys Phe Gly
20 25 30

<210> 191

<211> 32

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AY247656 залишки наближеності 5Å

<400> 191

Glu Ile Val Leu Thr Gln Thr Cys Trp Tyr Leu Leu Ile Tyr Gly Val
1 5 10 15
Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Tyr Cys Phe Gly
20 25 30

<210> 192
<211> 107
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AB_VKc1 (mAB002VK)

<400> 192
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr
 85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 193
<211> 107
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AB1_VKc2 (mAB003VK)

<400> 193
Asp Ile Gln Lys Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr
 85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 194
<211> 107
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> BB7_VKc (mBB001VK)

<400> 194

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

<210> 195

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DC1_VKc (mDC001VK)

<400> 195

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

<210> 196

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AF193851

<400> 196

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 Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Asn 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Thr Tyr Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 197

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AF193851

<400> 197

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 Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Asn 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Thr Tyr Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 198

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AF193851

<400> 198

Ala Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr

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

<210> 199
 <211> 107
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AF193851

<400> 199
 Asp Ile Thr 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 Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Thr Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 200
 <211> 32
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AB1_VKc2 (mAB003VK) залишки наближеності 5Å

<400> 200
 Asp Ile Gln Lys Thr Gln Thr Cys Trp Phe Thr Leu Ile Tyr Gly Val
 1 5 10 15
 Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Tyr Cys Phe Gly
 20 25 30

<210> 201
<211> 32
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> BB7_VKc (mBB001VK) залишки наближеності 5Å

<400> 201
Ala Ile Lys Met Thr Gln Thr Cys Trp Phe Thr Leu Ile Tyr Gly Val
1 5 10 15
Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Glu Phe Leu Tyr Cys Phe Gly
 20 25 30

<210> 202
<211> 32
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> DC1_VKc (mDC001VK)

<400> 202
Asp Ile Thr Met Thr Gln Thr Cys Trp Phe Ile Leu Ile Tyr Gly Val
1 5 10 15
Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ala Tyr Cys Phe Gly
 20 25 30

<210> 203
<211> 32
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AF193851

<400> 203
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Cys Trp Phe Ser Leu Ile Tyr Gly Val
1 5 10 15
Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Tyr Cys Phe Gly
 20 25 30

<210> 204
<211> 32
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AF193851

<400> 204
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Cys Trp Phe Ser Leu Ile Tyr Gly Val
1 5 10 15
Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Tyr Cys Phe Gly
 20 25 30

<210> 205
<211> 32
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AF193851

<400> 205
Ala Ile Lys Met Thr Gln Thr Cys Trp Phe Ser Leu Ile Tyr Gly Val
1 5 10 15
Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Tyr Cys Phe Gly
 20 25 30

<210> 206
<211> 32
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AF193851

<400> 206
Asp Ile Thr Met Thr Gln Thr Cys Trp Phe Ser Leu Ile Tyr Gly Val
1 5 10 15
Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Tyr Cys Phe Gly
 20 25 30

<210> 207
<211> 17
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR1 важкого ланцюга АВ

<400> 207

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Trp Val

1 5 10 15

Arg

<210> 208

<211> 17

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR 1 важкого ланцюга BB7 RHA

<400> 208

Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ile Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Trp Val

1 5 10 15

Arg

<210> 209

<211> 12

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR 1 важкого ланцюга BB7 RHA

<400> 209

Ile Ile Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Trp Val Arg

1 5 10

<210> 210

<211> 17

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга DC1 RHA

<400> 210

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr His Ala Met Ser Trp Val

1 5 10 15

Arg

<210> 211

<211> 12

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга DC1 RHA

<400> 211

Phe Thr Phe Ser Thr His Ala Met Ser Trp Val Arg
1 5 10

<210> 212

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга DC1 RHA/DC1 RHB

<400> 212

Thr His Ala Met Ser
1 5

<210> 213

<211> 17

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга DC1 RHB

<400> 213

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr His Ala Met Ser Trp Val
1 5 10 15
Arg

<210> 214

<211> 12

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга DC1 RHB

<400> 214

Phe Thr Leu Ser Thr His Ala Met Ser Trp Val Arg
1 5 10

<210> 215

<211> 33

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга AB

<400> 215

Trp Val Ser Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 20 25 30
Leu

<210> 216

<211> 28

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR1 важкого ланцюга АВ

<400> 216

Trp Val Ser Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 20 25

<210> 217

<211> 33

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 важкого ланцюга BB7 RHB

<400> 217

Trp Val Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 20 25 30
Leu

<210> 218

<211> 28

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 важкого ланцюга BB7 RHB

<400> 218

Trp Val Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 20 25

<210> 219
<211> 26
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 важкого ланцюга BB7 RHB/DC1 RHA

<400> 219
Trp Val Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 20 25

<210> 220
<211> 33
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 важкого ланцюга BB7 RHA

<400> 220
Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr
 20 25 30
Leu

<210> 221
<211> 28
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 важкого ланцюга BB7 RHA

<400> 221
Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ser
 20 25

<210> 222
<211> 26
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 важкого ланцюга BB7 RHA

<400> 222

Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg
 20 25

<210> 223

<211> 33

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 важкого ланцюга DC1 RHB

<400> 223

Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 20 25 30
Leu

<210> 224

<211> 28

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 важкого ланцюга DC1 RHB

<400> 224

Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 20 25

<210> 225

<211> 26

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 важкого ланцюга DC1 RHB

<400> 225

Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 20 25

<210> 226

<211> 11

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR3 важкого ланцюга BB7 RHB/BB7 RHA

<400> 226

Tyr Cys Ala Lys Leu Ile Ser Pro Tyr Trp Gly

1 5 10

<210> 227

<211> 11

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR3 важкого ланцюга DC1 RHA

<400> 227

Tyr Cys Ala Lys Leu Ile Ser Thr Tyr Trp Gly

1 5 10

<210> 228

<211> 11

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR3 важкого ланцюга DC1 RHB

<400> 228

Phe Cys Ala Arg Leu Ile Ser Thr Tyr Trp Gly

1 5 10

<210> 229

<211> 27

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 легкого ланцюга AB RKE

<400> 229

Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Ser Arg

1 5 10 15

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Phe

20 25

<210> 230

<211> 27

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 легкого ланцюга AB RJK

<400> 230

Ser Leu Ile Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Ser Arg

1 5 10 15

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Phe

20 25

<210> 231

<211> 27

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 легкого ланцюга BB7 RKB

<400> 231

Ser Leu Ile Tyr Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp Gly Val Pro Ser Arg

1 5 10 15

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Phe

20 25

<210> 232

<211> 14

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 легкого ланцюга BB7 RKB

<400> 232

Ser Leu Ile Tyr Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp Gly Val Pro

1 5 10

<210> 233

<211> 27

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 легкого ланцюга BB7 RKA

<400> 233

Thr Leu Ile Tyr Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp Gly Val Pro Ser Arg

1 5 10 15

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Glu Phe Leu

20 25

<210> 234

<211> 14

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 легкого ланцюга BB7 RKA

<400> 234

Thr Leu Ile Tyr Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp Gly Val Pro

1 5 10

<210> 235

<211> 27

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 легкого ланцюга DC1 RKA

<400> 235

Ser Leu Ile Tyr Leu Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg

1 5 10 15

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Phe

20 25

<210> 236

<211> 14

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 легкого ланцюга DC1 RKA

<400> 236

Ser Leu Ile Tyr Leu Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro

1 5 10

<210> 237

<211> 27

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 легкого ланцюга DC1 RKB

<400> 237

Ile Leu Ile Tyr Leu Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg

1 5 10 15

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ala

20 25

<210> 238

<211> 14

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR2 легкого ланцюга DC1 RKB

<400> 238

Ile Leu Ile Tyr Leu Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro

1 5 10

<210> 239

<211> 13

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR3 легкого ланцюга BB7 RKB

<400> 239

Tyr Cys Leu Gln Tyr Val Asp Phe Pro Tyr Thr Phe Gly

1 5 10

<210> 240

<211> 31

<212> ПРТ

<213> Mus musculus

<220>

<223> Мишачий субстрат-єднальна кишеня

<400> 240

Tyr Asn Ser Ala His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe

1 5 10 15

Arg Asn Glu Phe Gly Glu Leu Glu Ser Asn Lys Ser Glu Met Ile

20 25 30

<210> 241

<211> 31

<212> ПРТ

<213> Rattus

<220>

<223> Щурячий субстрат-єднальна кишеня

<400> 241

Tyr Asn Ser Ala His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe

1 5 10 15

Arg Asn Glu Tyr Gly Glu Leu Glu Ser Asn Lys Ser Glu Met Ile

20 25 30

<210> 242

<211> 31

<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Людський субстрат-єднальна кишеня

<400> 242
Tyr Asn Ser Ala His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe
1 5 10 15
Arg Asn Glu Phe Gly Glu Ile Gln Gly Asp Lys Ser Glu Met Ile
20 25 30

<210> 243
<211> 48
<212> ПРТ
<213> Mus musculus

<220>
<223> Задня частина центральної ділянки за активним центром у миші

<400> 243
Ser Glu Met Ile Trp Asn Phe His Cys Trp Val Glu Ser Trp Met Thr
1 5 10 15
Arg Pro Asp Leu Gln Pro Gly Tyr Glu Gly Trp Gln Ala Ile Asp Pro
20 25 30
Thr Pro Gln Glu Lys Ser Glu Gly Thr Tyr Cys Cys Gly Pro Val Ser
35 40 45

<210> 244
<211> 48
<212> ПРТ
<213> Rattus

<220>
<223> Задня частина центральної ділянки за активним центром у пацюка

<400> 244
Ser Glu Met Ile Trp Asn Phe His Cys Trp Val Glu Ser Trp Met Thr
1 5 10 15
Arg Pro Asp Leu Gln Pro Gly Tyr Glu Gly Trp Gln Ala Ile Asp Pro
20 25 30
Thr Pro Gln Glu Lys Ser Glu Gly Thr Tyr Cys Cys Gly Pro Val Ser
35 40 45

<210> 245
<211> 48
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Задня частина центральної ділянки за активним центром у людини

<400> 245

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

<210> 246

<211> 39

<212> ПРТ

<213> Mus musculus

<220>

<223> Задня частина сполуки центральної ділянки з бета-складчастим доменом 1 у миші

<400> 246

```
Thr Tyr Lys Tyr Pro Glu Gly Ser Pro Glu Glu Arg Glu Val Phe Thr
1      5      10     15
Lys Ala Asn His Leu Asn Lys Leu Ala Glu Lys Glu Glu Thr Gly Val
      20     25     30
Ala Met Arg Ile Arg Val Gly
      35
```

<210> 247

<211> 39

<212> ПРТ

<213> Rattus

<220>

<223> Задня частина сполуки центральної ділянки з бета-складчастим доменом 1 у пацюка

<400> 247

```
Thr Tyr Lys Tyr Pro Glu Gly Ser Pro Glu Glu Arg Glu Val Phe Thr
1      5      10     15
Arg Ala Asn His Leu Asn Lys Leu Ala Glu Lys Glu Glu Thr Gly Val
      20     25     30
Ala Met Arg Ile Arg Val Gly
      35
```

<210> 248

<211> 39

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Задня частина сполуки центральної ділянки з бета-складчастим доменом 1 у людини

<400> 248

Thr Tyr Lys Tyr Pro Glu Gly Ser Ser Glu Glu Arg Glu Ala Phe Thr
1 5 10 15
Arg Ala Asn His Leu Asn Lys Leu Ala Glu Lys Glu Glu Thr Gly Met
20 25 30
Ala Met Arg Ile Arg Val Gly
35

<210> 249

<211> 342

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> source

<222> 1..342

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="AB VH1"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 249

gaagtacagc tggaggagtc aggggggggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactctcagt tcctctgcc a tgtctgggt tcgccagact 120
ccggacagga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgttg gtggtggtaa aaccactat 180
ccagacagtg tgaagggtcg cttcaccatc tccagagaca atgccaagaa cacccttat 240
ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaaactaatc 300
agtctctact ggggcccaagg caccactctc acagtctcct ca 342

<210> 250

<211> 114

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> AB VH1

<400> 250

Glu Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Ser
20 25 30

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

<210> 251
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> source
 <222> 1..321
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="AB1 VK"
 /організм="Штучна послідовність"

<400> 251
 gacatccaga tgacacagac tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
 atcacttgca aggcgagtca ggacattaat agctatttaa cctgggtcca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt acaaatagat tgttgatgg ggtcccatcc 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tttttctca ccatcagcag cctggaatat 240
 gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgact ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaaac tggaaataaa a 321

<210> 252
 <211> 107
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AB1 VK

<400> 252
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30

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

<210> 253
 <211> 342
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> source
 <222> 1..342
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="AB1 VH "
 /організм="Штучна послідовність"

<400> 253
 gaagtcgagc tggaggagtc tggggggggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactctcagt tcctctgcc tgtcttggt tcgccagact 120
 ccggacagga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgtg gtggtggtaa aacctactat 180
 ccagacagtg tgaagggctg cttcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctctat 240
 ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaaactaatc 300
 agtctctact ggggccaaagg caccactctc acagtctct ca 342

<210> 254
 <211> 114
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AB1 VH

<400> 254
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Arg Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

<210> 255
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> source
 <222> 1..321
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="AB1 VK "
 /організм="Штучна послідовність"

<400> 255
 gacatcaaga tgaccagtc tccatcttc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
 atcacttgca aggcgagtca ggacattaat agctatttaa cctgggtcca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt acaaatagat tgttgatgg ggtcccatcc 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tttttctca ccatcagcag cctggaatat 240
 gaagatatgg gaattatta ttgtctacag tatgatgact ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaaac tggaaataaa a 321

<210> 256
 <211> 107
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AB1 VK

<400> 256
 Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

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

<210> 257

<211> 342

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> source

<222> 1..342

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"

/примітка="BB7 VH "

/організм="Штучна послідовність"

<400> 257

gcagtgcaac tggtagagtc tgggggaggc ttggtgaagc ctggaggggc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggaat cattttcagt tcctctgccca tgtcttgggt togccagact 120

ccggaaaaga gactggagtg ggtcgcaact attagtagtg gtggtcggtc cacctactat 180

ccagacagtg tgaagggtcg attcacccgtc tccagagaca gtgccaagaa caccctatac 240

ctgcaaatgg acagtctgag gtctgaggac acggccattt attactgtgc aaaactaatc 300

agtcctact ggggccaagg caccactctc acagtctcct ca 342

<210> 258

<211> 114

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> BB7 VH

<400> 258

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ile Phe Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Glu Phe Leu Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu His
65 70 75 80
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Val Asp Phe Pro Tyr
 85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 261
<211> 342
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..342
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="DC1 VH"
 /організм="Штучна послідовність"

<400> 261
gaagtgcagt tggaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tctgtgcag cctctggatt cactctcagt acccatgcc a tgtctgggt tcgccagact 120
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtcgttc cacctactat 180
ccagacagtg tgaagggtcg attcactatc tccagagaca atgtcaagaa caccctatat 240
ctgcaactga gcagtctgag gtctgaggac acggccgtgt atttctgtgc aagactaatc 300
agtacctact ggggccaaagg caccactctc acagtctcct ca 342

<210> 262
<211> 114
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> DC1 VH

<400> 262
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr His
 20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

<210> 263
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> source
 <222> 1..321
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="DC1 VK "
 /організм="Штучна послідовність"

<400> 263
 gacatcacga tgaccagtc tccatctcc atatatgcat ctctgggaga gagagtcact 60
 atcacttgca aggcgagtc ggacattaat agctatttaa cctgggtcca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctaagatcct gatctatctt gtaaatagat tggtagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tatgctctca ccatcagcag tctggaatat 240
 gaagatatgg gaatttatta ttgtctacaa tatgatgact ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaataaaa a 321

<210> 264
 <211> 107
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> DC1 VK

<400> 264
 Asp Ile Thr Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ile Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Ile Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Leu Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ala Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
 65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 265
 <211> 342
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> source
 <222> 1..342
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="JE12 VH "
 /організм="Штучна послідовність"

<400> 265
 gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggata cagattcact agctatgtta tgcactgggt gaaacagaag 120
 tctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tgctaagtac 180
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagactatct 300
 agtgactatt ggggccaaagg caccactctc acagtctcct ca 342

<210> 266
 <211> 114
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> JE12 VH

<400> 266
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

<210> 267
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> source
 <222> 1..336
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="JE12 VK "
 /організм="Штучна послідовність"

<400> 267
 gatgtttga tgacccaaaa tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60
 atctcttga gatctagtca gagcattgaa catattaatg gaaacaccta ttagaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ttctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaggatc 240
 agcagagtgg aggctgaaga tctgggaatt tattactgct ttcaagggtc acatgttccg 300
 ttacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 268
 <211> 112
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> JE12 VK

<400> 268
 Asp Val Leu Met Thr Gln Asn Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Glu His Ile
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 269
<211> 342
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..342
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="EH6 VH "
/організм="Штучна послідовність"

<400> 269
gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tctgcaagg cttctggata cacattcact agttatgtta tgcactgggt gaagcagaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggattt attaatcctt acaatgatgg tactaagtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acctcagaca aagcctccac cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagattctcc 300
tctgggtact ggggccaaagg caccactctc acagtctcct ca 342

<210> 270
<211> 114
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> EH6 VH

<400> 270
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ala Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

<210> 271
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> source
 <222> 1..336
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="ЕН6 VK "
 /організм="Штучна послідовність"

<400> 271
 gatgtttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagtattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caatcgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg gggctgagga tctgggagtt tattactgcc ttcaagtttc acatgttctt 300
 ttacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa 336

<210> 272
 <211> 112
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> EN6 VK

<400> 272
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Gly Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Val
 85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 273
<211> 342
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..342
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="AG9 VH "
/організм="Штучна послідовність"

<400> 273
gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ttggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tctgcaggg cttctggata cacattcact acctatgtta ttcactgggt gaagcagaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tgctaggtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccac cacagcctac 240
atggaactca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagactttct 300
agtgactact ggggccaaagg caccactctc acagtctcct ca 342

<210> 274
<211> 114
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AG9 VH

<400> 274
Glu Val Gln Leu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Arg Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

<210> 275
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> source
 <222> 1..336
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="AG9 VK "
 /організм="Штучна послідовність"

<400> 275
 gatgtttga tgacccaaaa tccactctcc ctgcctgtca gtcttggcga tcaggcctcc 60
 atctcttgca gatctagtcg gagcattgaa catagtaatg gaaacaccta ttggaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ttctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaggatc 240
 agcagtgtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttccg 300
 ttacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 276
 <211> 112
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AG9 VK

<400> 276
 Asp Val Leu Met Thr Gln Asn Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Ile Glu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 277
<211> 342
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..342
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="АН3 VH"
/організм="Штучна послідовність"

<400> 277
gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tctgcaggg cttctggata cacattcact acctatgtta ttcactgggt gaagcagaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tgctaggtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccac cacagcctac 240
atggaactca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagactatct 300
agtgactact ggggccaaagg caccactctc acagtctcct ca 342

<210> 278
<211> 114
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> АН3 VH

<400> 278
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Arg Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

<210> 279
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> source
 <222> 1..336
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="АНЗ VK "
 /організм="Штучна послідовність"

<400> 279
 gatgtttga tgacccaaaa tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaggcctcc 60
 atctcttga gatctagtcg gagcattgaa catagtaatg gaaacaccta ttggaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ttctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaggatc 240
 agcagtgtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttccg 300
 ttacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 280
 <211> 112
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> АНЗ VK

<400> 280
 Asp Val Leu Met Thr Gln Asn Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Ile Glu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 281
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> source
 <222> 1..357
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="DD9 VH "
 /організм="Штучна послідовність"

<400> 281
 cagggtactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60
 actgtgtctt ttctgggtt ttactgagc acttcgggta tgggtgtgag ttggattcgt 120
 cagtcctcag gaaagggctt ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc 180
 tataacccat ccctgaagag ccgcatcaca atctccaagg attcctcaag caaccaggta 240
 ttctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gatactgcca catattactg tgctcgaagt 300
 tggactacgg ccccgtttgc ttctggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357

<210> 282
 <211> 119
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> DD9 VH

<400> 282
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Ser Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Ser Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ser Trp Thr Thr Ala Pro Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 283
 <211> 318
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> source
 <222> 1..318
 <223> /мол_тип="невизначена ДНК"
 /примітка="DD9 VK "
 /організм="Штучна послідовність"

<400> 283
 caaattgttc tccccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
 atgacctgca gtgccagctc aagtgtagat tacatgtact ggtaccagca gaagccagga 120
 tcctcccca gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc 180
 ttcagtgga gtgggtctgg gacctcttac tcttcacaa tcagccgaat gggggctgaa 240
 gatgctgcca cttattactg ccaacagtgg aatagttccc cgctcacgtt cgggtgctggg 300
 accaagctgg agctgaaa 318

<210> 284
 <211> 106
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> DD9 VK

<400> 284
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asp Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Gly Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Ser Pro Leu Thr
 85 90 95

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

<210> 285
<211> 357
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..357
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="DH2 VH "
/організм="Штучна послідовність"

<400> 285
cagggtactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtcgt 60
actgttctt tctctgggtt ttactgagc acttctggta tgggtgtgag ctggattcgt 120
cagcctcag gaaaggtct ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc 180
tataacccat cctgaagag cgggtcaca atctcaagg atacctccag caaccaggta 240
ttctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gatactgcc catactactg tgctcgaagt 300
gggactacgg ccccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357

<210> 286
<211> 119
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> DH2 VH

<400> 286
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val
65 70 75 80
Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ser Gly Thr Thr Ala Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 287

<211> 318

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> source

<222> 1..318

<223> /мол_тип="невизначена ДНК"

/примітка="DH2 VK "

/організм="Штучна послідовність"

<400> 287

caaattgttc tcaactcagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgtaatg tacatgtact ggtaccagca gaagccagga 120

tcctcccca gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctttac tcttcacaa tcagccgaat ggaggctgaa 240

gatgctgcca cttttactg ccagcagtg agtagtccc cgctcacgtt cgggtctggg 300

accaagctgg agctgaaa 318

<210> 288

<211> 106

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DH2 VK

<400> 288

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Phe Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Ser Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 289
<211> 339
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..339
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="DD6 VH "
/організм="Штучна послідовність"

<400> 289
gaggtccagc tgcaacagtc tgggcctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggata cagattcact gactacaaca tgcactgggt gaagcagaac 120
cttgaaaga gccttgagt gattggatat attaacccta aaaatggtgt tatttactac 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg acagtgaaca ggtcctcaa cacagcctac 240
atggagatcc gcagcctgac atcggaagat tctgcagtct attactgtgc aacagctctg 300
acttactggg gacaagggac tctggtcact gtctctgca 339

<210> 290
<211> 113
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> DD6 VH

<400> 290
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Asn Met His Trp Val Lys Gln Asn Leu Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Lys Asn Gly Val Ile Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asn Arg Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Ile Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ala

<210> 291
<211> 330
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..330
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="DD6 VL "
/організм="Штучна послідовність"

<400> 291
caggctgttg tgactcagga atctgcactc accacatcac ctggtgaaac agtcacactc 60
actgtcgcct caagtactgg ggctgttgca gctaataact atgccaactg gatccaagaa 120
aaaccagatc atttattcac tggctcgata gctggtagca acaagcgagc tccaggtgtt 180
cctgccagat tctcaggctc cctgatagga gacaaggctg ccctcacat cacaggggca 240
cagactgagg atgaggcaat atattctgt gctctatggt acagcaacta ttgggtgttc 300
ggtaggagaa ccaaagtgc tgcctaggc 330

<210> 292
<211> 110
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> DD6 VL

<400> 292
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Ala Ala Asn
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Ile Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45
Leu Ile Ala Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Tyr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 293

<211> 342
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..342
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="IA12 VH "
/організм="Штучна послідовність"

<400> 293
cagatccagt tggtagctgac tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
tctgcaagg cttctgggta taccttcaca acctatggaa tgacctgggt gaaacaggct 120
ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct cctctggagt gccaacatat 180
gctgatgact tcaagggacg gttgccttc tcttggaag cctctgccag cactgcctat 240
ttgcagatca acaacctcaa aagtgaggac acggctacat atttctgtgc aagaccggaa 300
gttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctg ca 342

<210> 294
<211> 114
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IA12 VH

<400> 294
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Gly Met Thr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Ser Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Pro Glu Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ala

<210> 295

<211> 336
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> source
<222> 1..336
<223> /мол_тип="невизначена ДНК"
/примітка="IA12 VK "
/організм="Штучна послідовність"

<400> 295
gatgttgta tgacccagac tccactcact ttgtcggta ccttggaca accagcctct 60
atctcttgca agtcaagtca gagcctcta tatgataatg gaaagactta ttgcattgg 120
ttatttcaga ggccaggcca gtctccaagg cgcctaactct atctggtgtc taaactggac 180
tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga ttgggagtt tattactgcg tgcaaggtag acattttccg 300
tacacgttcg gaggggggac caaactggaa ataaaa 336

<210> 296
<211> 112
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність

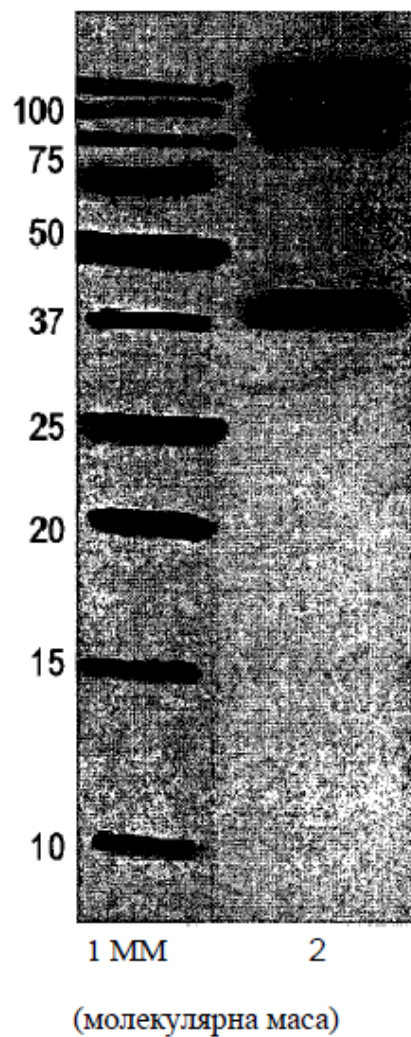
<220>
<223> IA12 VK

<400> 296
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Phe Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Asp
20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Leu Phe Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly
85 90 95
Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

А: Продукт

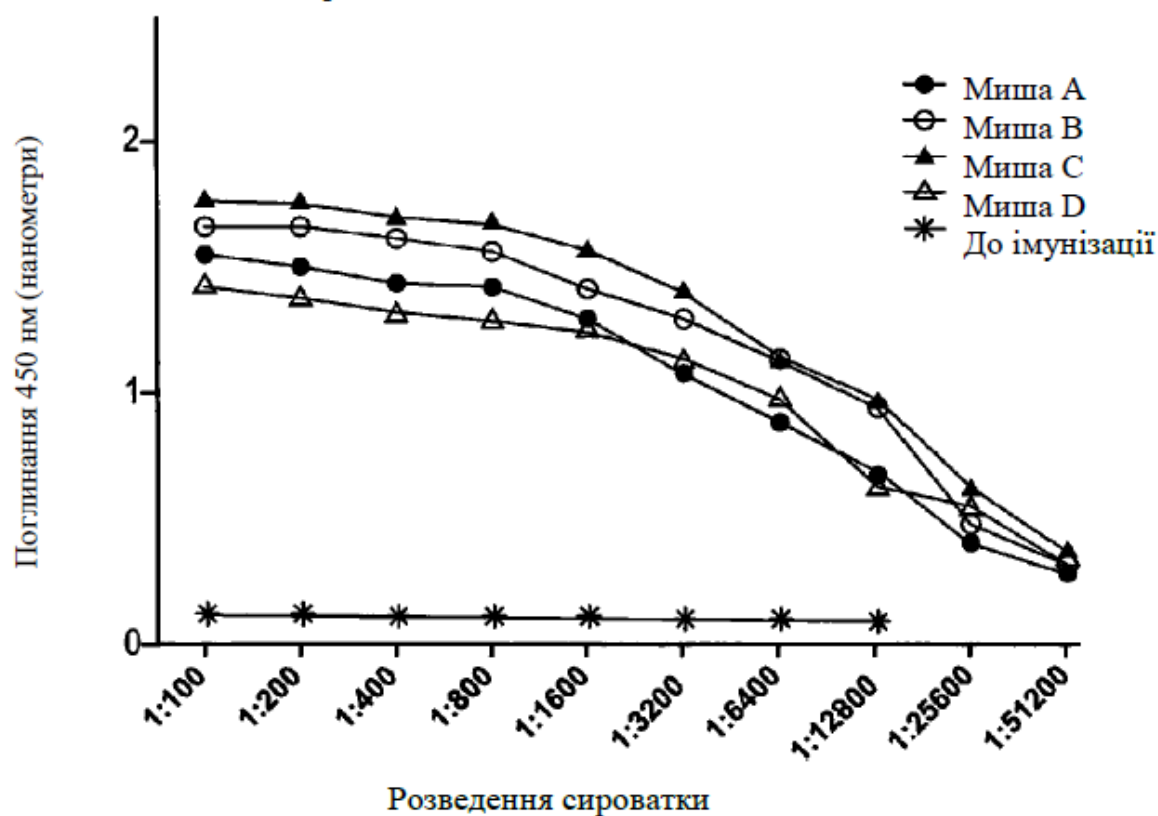


В: Рекомбінантний білок



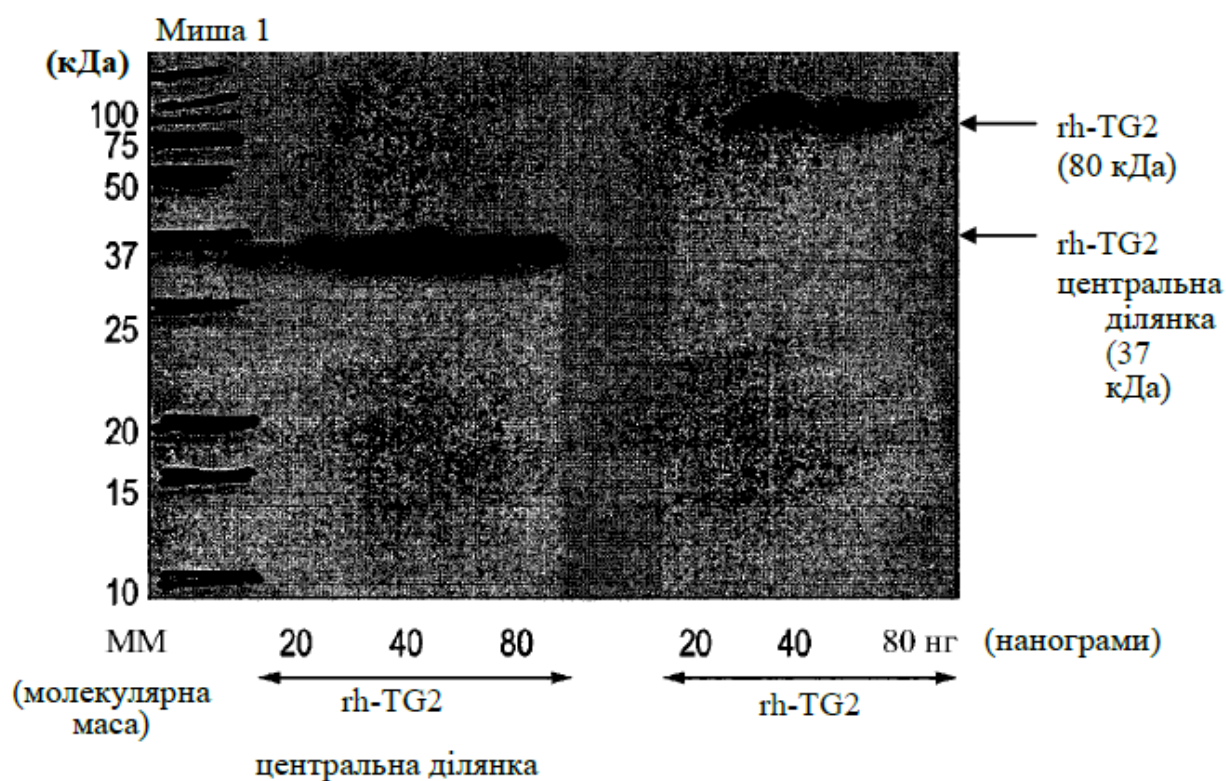
ФІГ.1

А: Аналіз ELISA сироватки



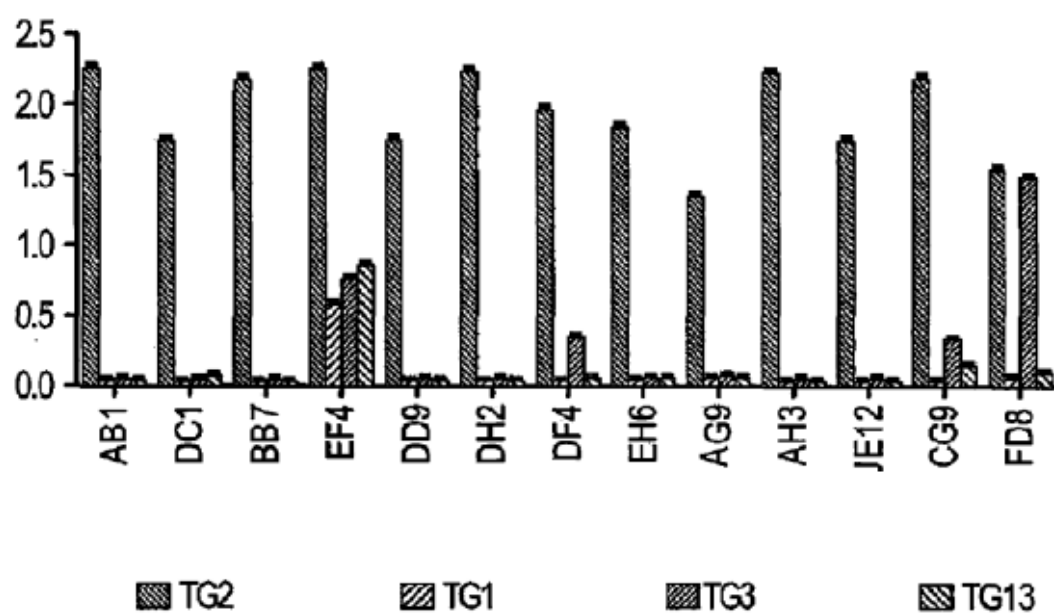
В: Вестерн-блоттінг сироватки

Миша С

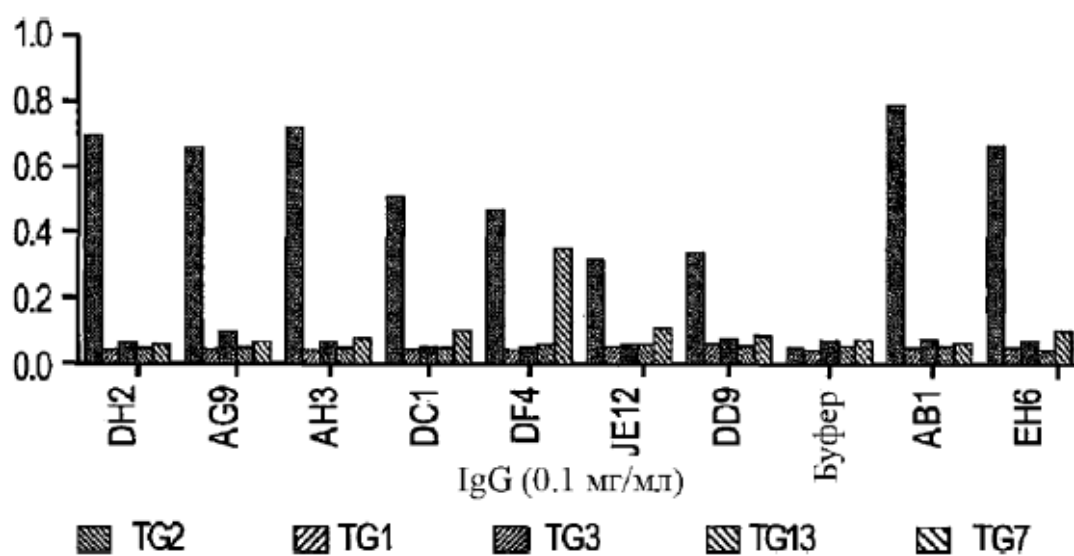


ФІГ.2

А: Початковий скрінінг кондиціонованого середовища

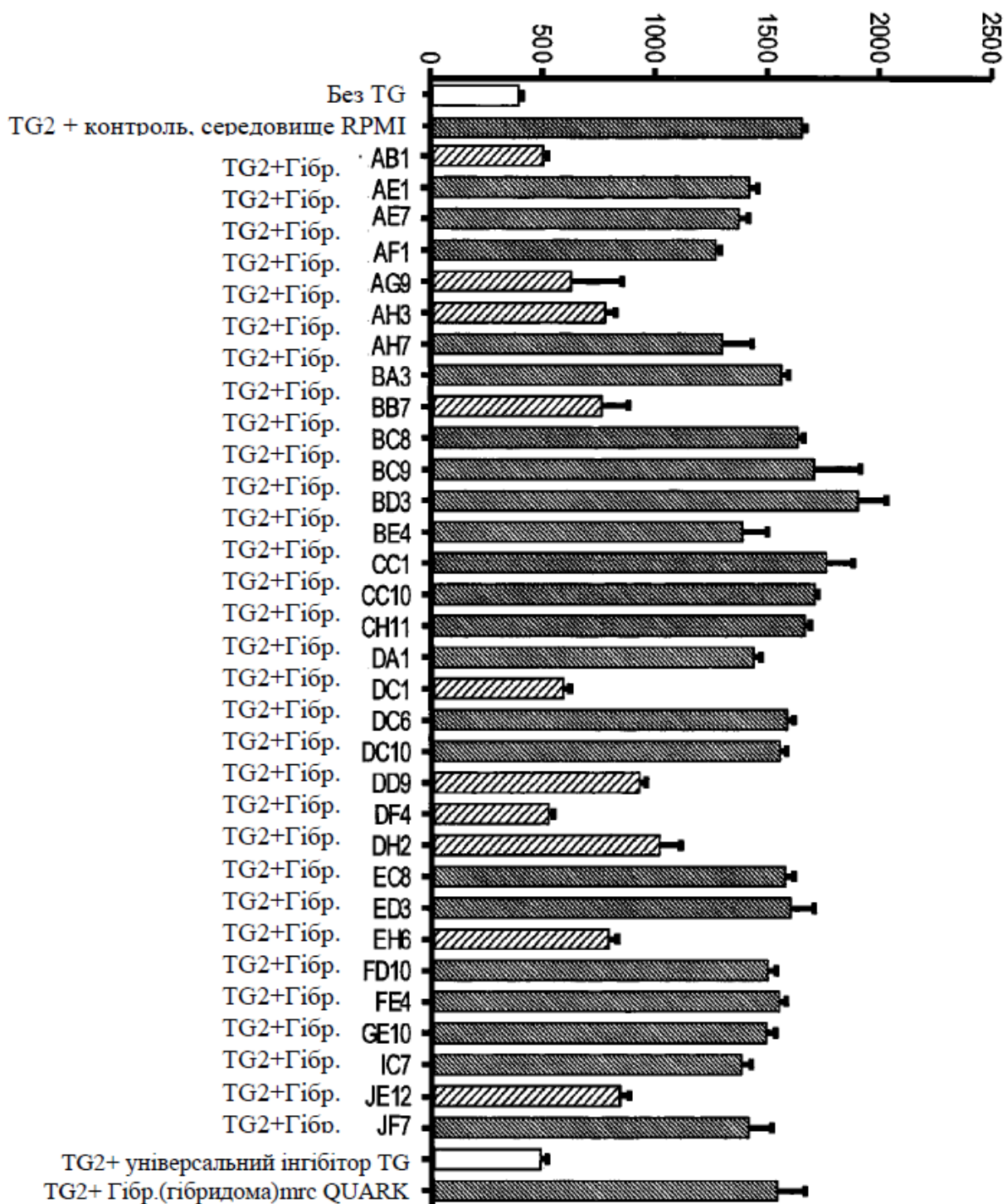


В: Реактивність клонально очищених mAb



ФІГ. 3

Включення ^3H -путресцину (срм)



ФІГ.4

Група 1: Положення - перед активним центром - кишень зв'язування субстрату

AB-1 AG-1, AH-1, BB-7, DC-1, EH-6, JE-12

Миша TG2 YNSAHDQNSKLLIEYFRNEFGELESNKSEMI

Пацюк YNSAHDQNSKLLIEYFRNEYGELESNKSEMI

Людина YNSAHDQNSKLLIEYFRNEFGEIQGDKSEMI
*****.*****

Група 2: Положення - за центральною ділянкою за активним центром

DF-4

Миша TG2 SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQAIDPTPQEKSEGTYCCGPVS

Пацюк SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQAIDPTPQEKSEGTYCCGPVS

Людина SEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQALDPTPQEKSEGTYCCGPVP
*****:*****.

Група 3: Положення - позаду від сполучення центральної ділянки з доменом бета-барель-1

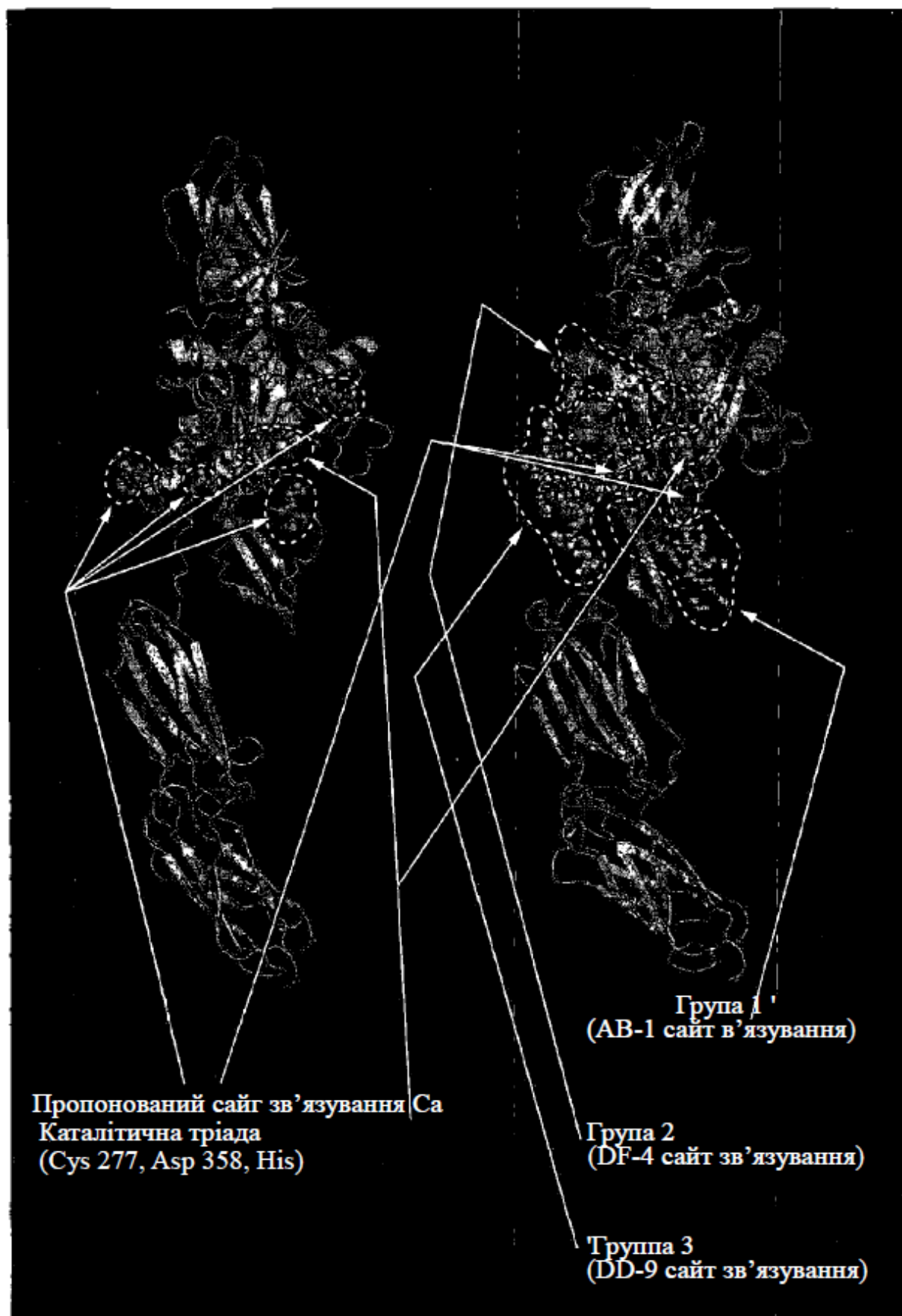
Включає сайт зв'язування кальцію

DD-9 and DH-2

Миша TG2 TYKYPEGSPEEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG

Пацюк TYKYPEGSPEEREVFTTRANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG

Людина TYKYPEGSSEEREAFTRANHLNKLAEKEETGMAMRIRVG
*****.*****.***:*****:*****.



ФІГ.6

AB1 VH

GAAGTACAGCTGGAGGAGTCAGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCGC
CAGACTCCGGACAGGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGTTGGTGGTGGTAAA
ACCCACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAG
AACACCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTAC
TGTGCAAACTAATCAGTCTCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AB1 VH

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSQVRQTPDRRLEWVATISVGGGK
THYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRSEDTAMYCAKLISLYWGQGTTLTVSS

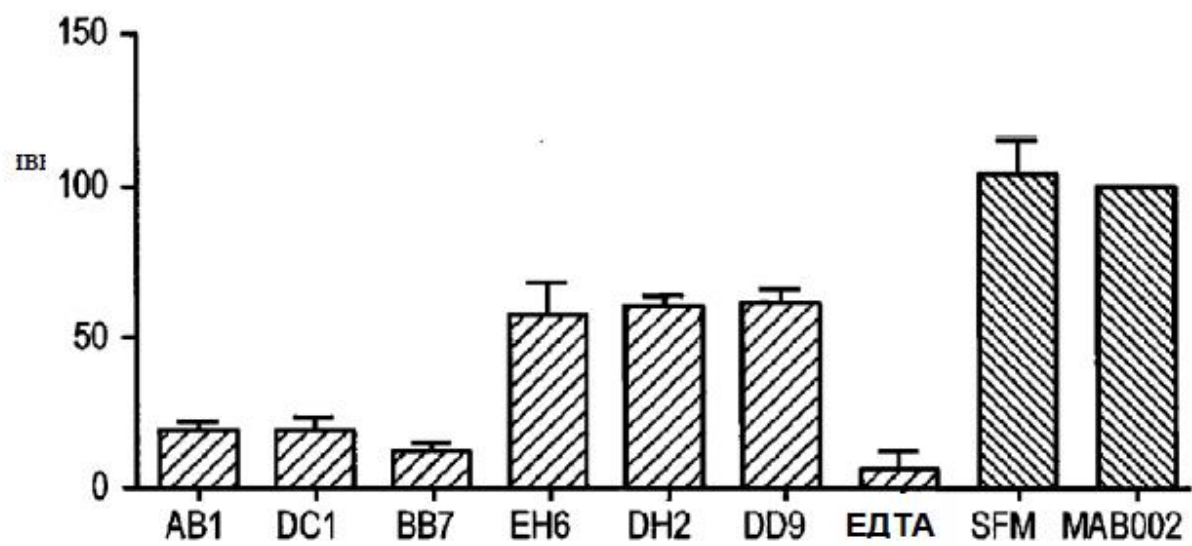
AB1 VK

GACATCCAGATGACACAGACTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTC
ACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCCAGCAG
AAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGTTTGATGGG
GTCCCATCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTTTCTCACCATCAGC
AGCCTGGAATATGAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGACTTTCCG
TACACGTTCGGAGGGGGGACCAAACTGGAAATAAAA

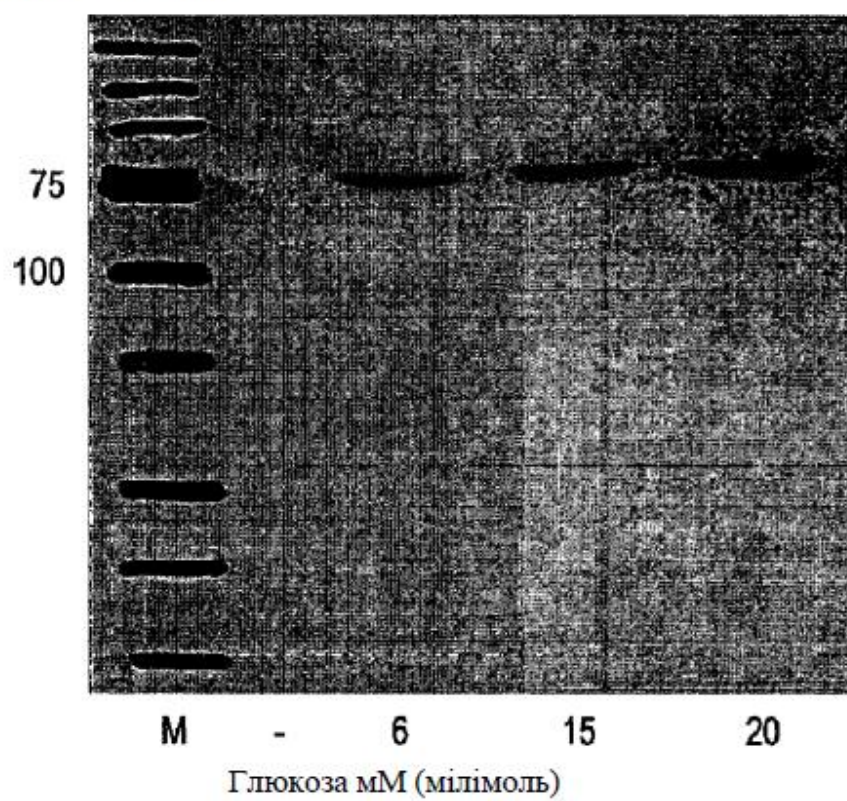
AB1 VK

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK

А: інгібування TG



В: Вестерн-блоттінг

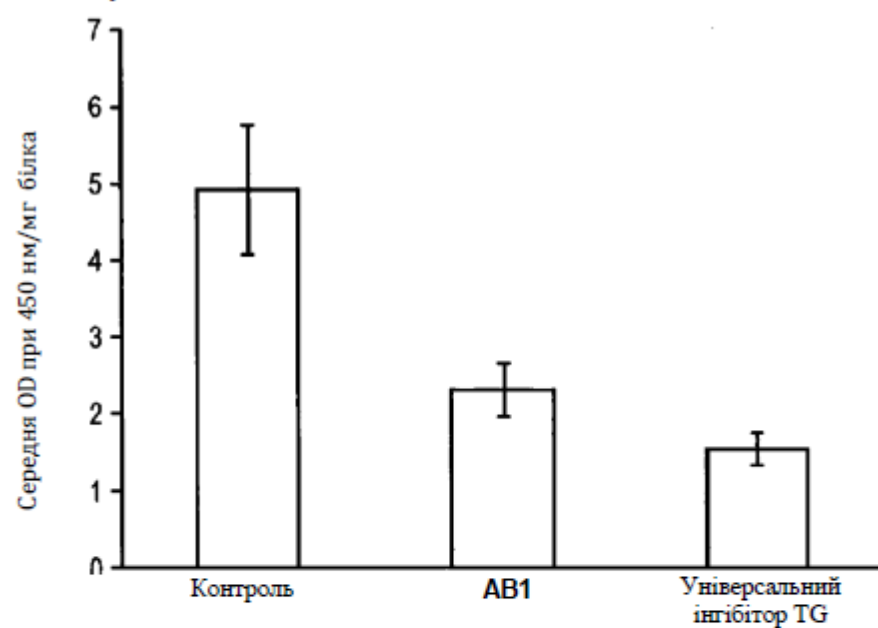


ФІГ.8

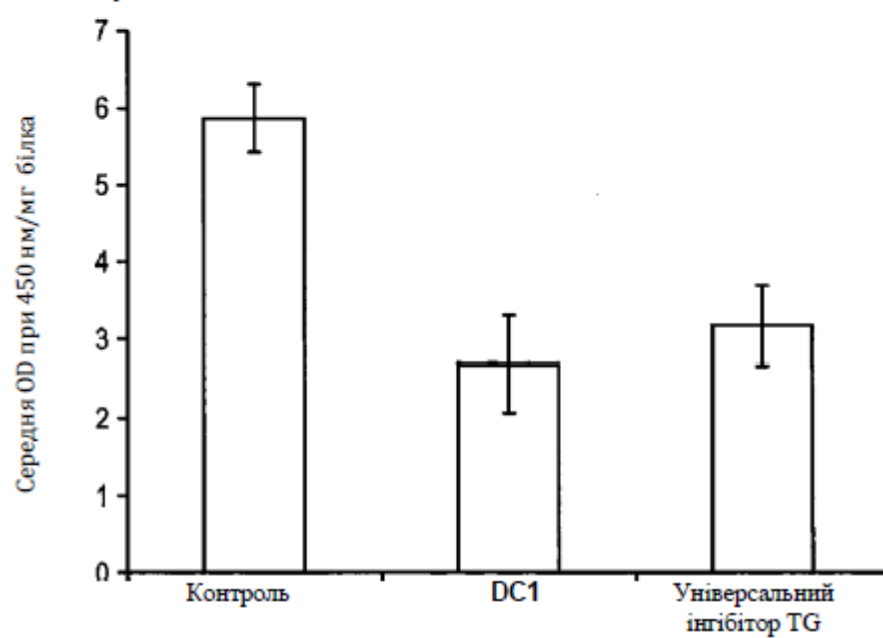
	IC50 hTG2 (мг/мл IgG на нг TG2)	IC50 rTG2 (мг/мл IgG на нг TG2)	IC50 mTG2 (мг/мл IgG на нг TG2)	Відношення Людина/Пацюк	hTG2 IC50 Відношення для кращого інгібітора людина	rTG2 IC50 Відношення для кращого інгібітора людина
AB1	1.09x10 ⁻⁵	HI (не інгібує)	HI (не інгібує)	-	1	-
DC1	1.23x10 ⁻⁵	HI (не інгібує)	HI (не інгібує)	-	1.1	-
BB7	1.59x10 ⁻⁵	3.2x10 ⁻⁴	HI (не інгібує)	20	1.47	29.4
AG9	4.87x10 ⁻⁵	HI (не інгібує)	HI (не інгібує)	-	4.47	-
DD9	5.24x10 ⁻⁵	3.03x10 ⁻⁴	HI (не інгібує)	6	4.87	29.22
DH2	6.7x10 ⁻⁵	2.23x10 ⁻⁴	HI (не інгібує)	-	6.2	38.13
EH6	6.9x10 ⁻⁵	4.03x10 ⁻⁴	HI (не інгібує)	5.8	6.33	36.714
АН3	7.8x10 ⁻⁵	HI (не інгібує)	HI (не інгібує)	-	7.1	-
JE12	12.3x10 ⁻⁶	HI (не інгібує)	HI (не інгібує)	-	11.3	-

ФІГ.9

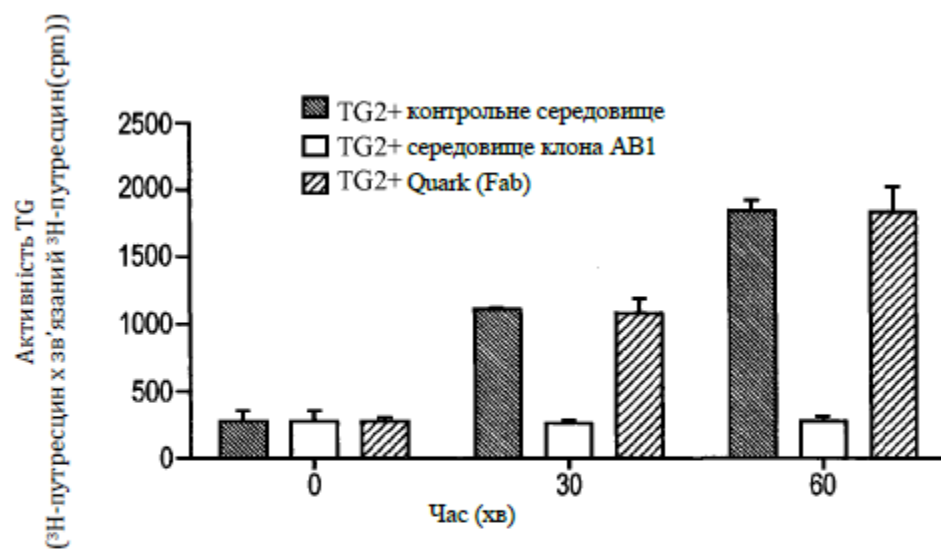
А: Інгибування антитілом АВ1



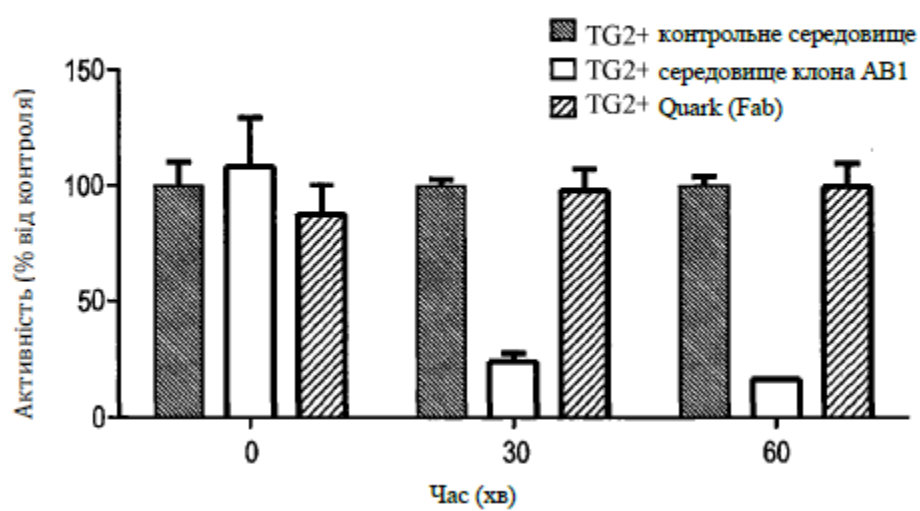
В: Інгибування антитілом DC1



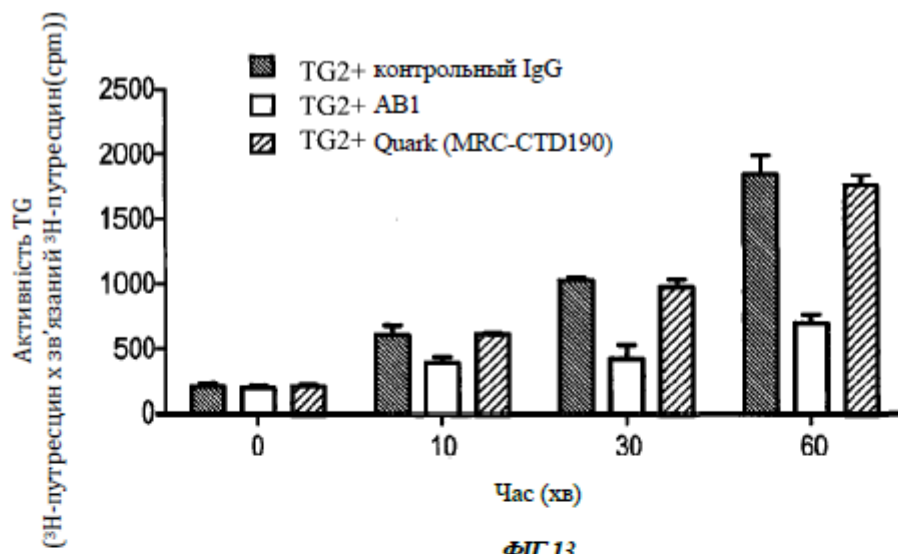
ФІГ.10



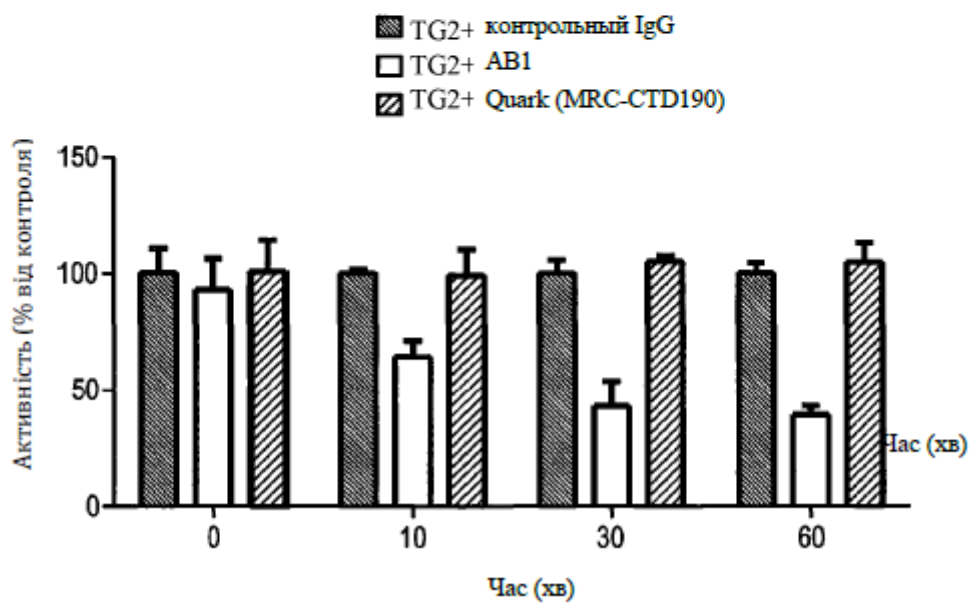
ФІГ.11



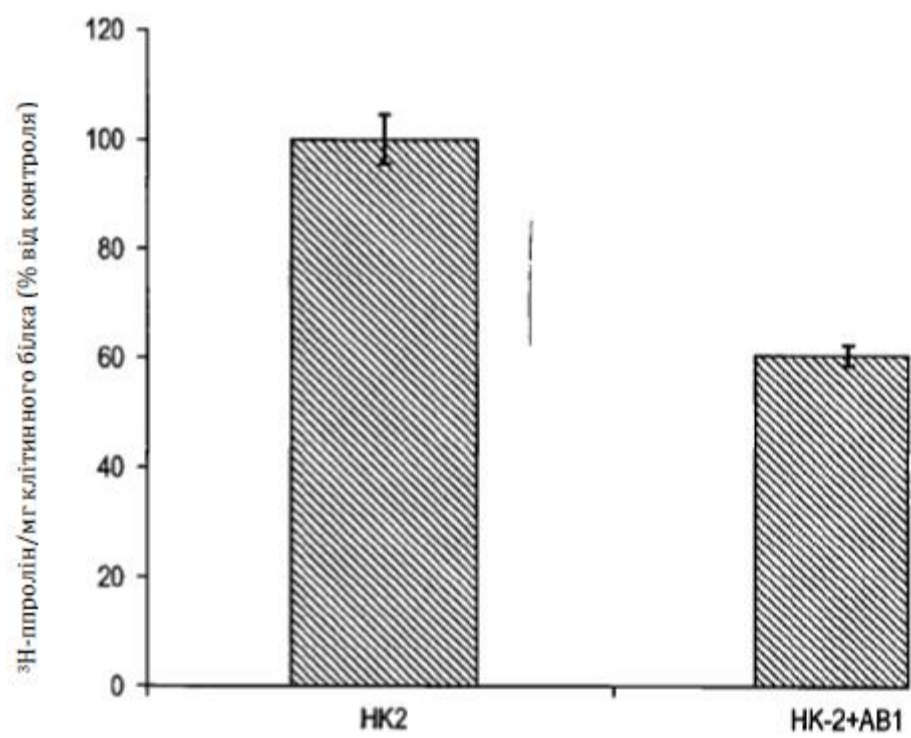
ФІГ.12



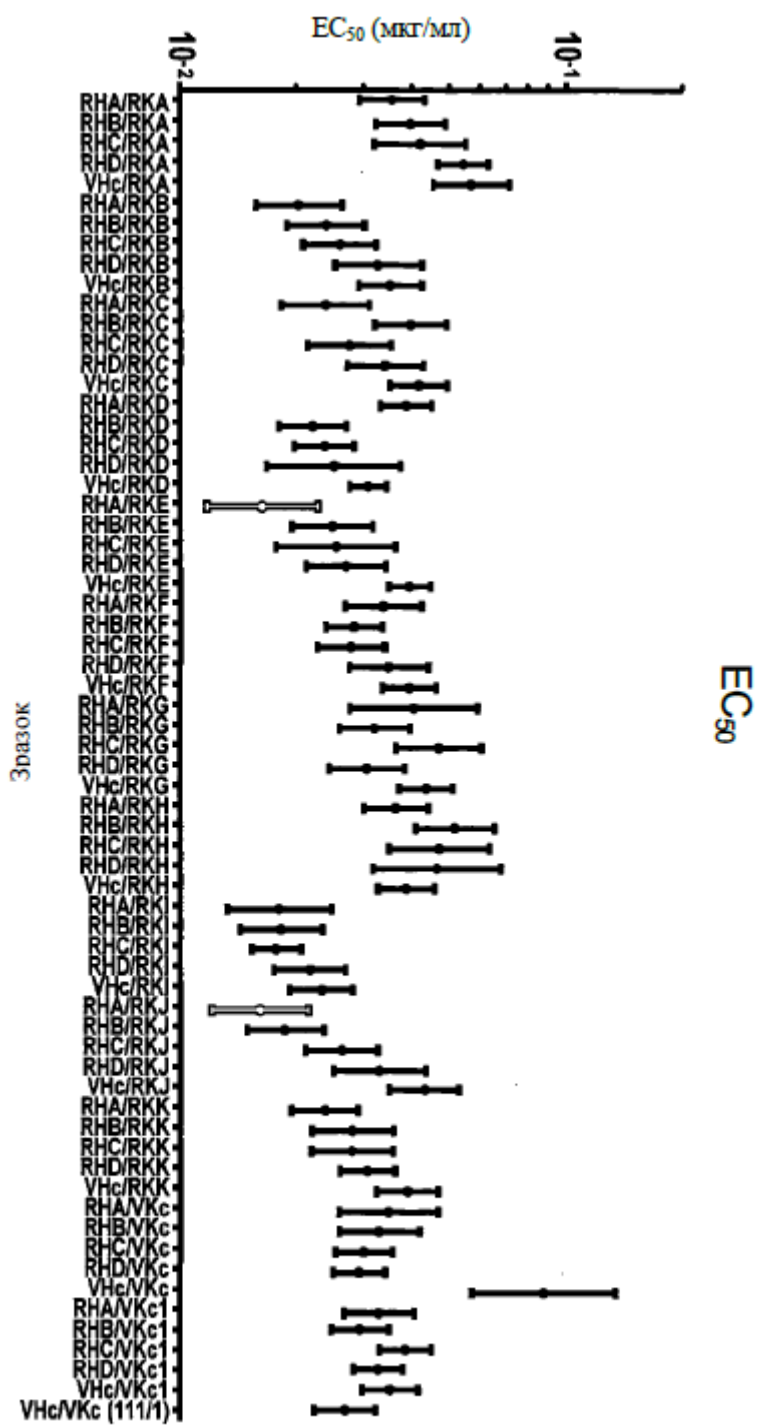
ФІГ.13



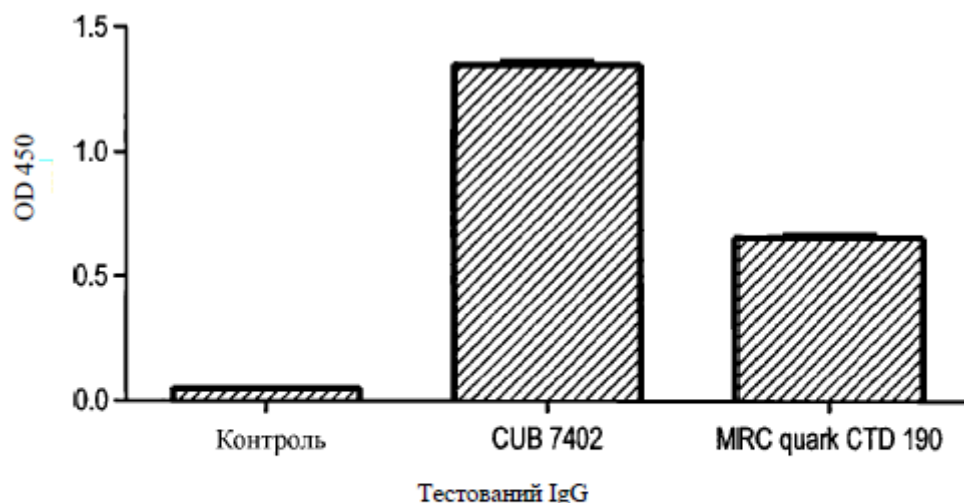
ФІГ.14



ФІГ.15



Фиг.16



Фиг.17

Антибіло AB-1

AB1_VH

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCGG
ACAGGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGTGGTGGTGGTAAAACCTACTATCCAGAC
AGTGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTCTATCTGCAAAT
GAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAACTAATCAGTCTCTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AB1_VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMSFWRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS

AB1_VK

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTAT
CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCAGCAGAAACCAGGGA
AATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGTTGATGGGGTCCCATCCAGGTTT
AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTTTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATATGAAGATAT
GGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGACTTTCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAAC
TGGAATAAAA

AB1_VK

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRF
SGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK

Фиг.18

BB7 VH

GCAGTGCAACTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGAATCATTTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGG
AAAAGAGACTGGAGTGGGTGCAACTATTAGTAGTGGTGGTCGTTCCACCTACTATCCAGAC
AGTGTGAAGGGTCGATTCACCGTCTCCAGAGACAGTGCCAAGAACACCCATACCTGCAAAT
GGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCAAACTAATCAGTCCCTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

BB7 VH

AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGIIFSSSAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPD
SVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMSLRSEDTAIYYCAKLISPYWGQGTTTLTVSS

BB7 VK

GCCATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCATCAT
CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATAAATAGTTATTTAACCTGGTTCACAGAAACCAGGAA
AGTCTCCTAAGACCCTGATCTATCTTACAAATAGATTGATGGATGGGGTCCCATCAAGGTTT
AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGAATTTTACTCACCATCAGCGGCCTGGAACATGAAGATAT
GGGCATTTATTATTGTCTCCAGTATGTTGACTTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGC
TGGAATAAAA

BB7 VK

AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLMDGVPSRF
SGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGTKLEIK

DC1_VH

GAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTACCCATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGG
AGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCAACCATTAGTAGTGGTGGTCGTTCCACCTACTATCCAGAC
AGTGTGAAGGGTCGATTCACTATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACACCCTATATCTGCAACT
GAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCAAGACTAATCAGTACCTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

DC1_VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSTHAMSWMVROTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPD
SVKGRFTISRDNVKNLTLYQLSSLRSEDVAVYFCARLISTYWGQGTTLTVSS

DC1_VK

GACATCACGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATATATGCATCTCTGGGAGAGAGAGTCACTAT
CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCAGCAGAAACCAGGGA
AATCTCCTAAGATCCTGATCTATCTTGTAATAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTT
AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATGCTCTCACCATCAGCAGTCTGGAATATGAAGATAT
GGGAATTTATTATTGTCTACAATATGATGACTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGC
TGGAATAAAA

DC1_VK

DITMTQSPSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIYLVNRLVDGVPSRF
SGSGSGQDYALTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK

JE12_VH

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAAGGCTTCTGGATACAGATTCACTAGCTATGTTATGCACTGGGTGAAACAGAAGTCTG
GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAAGTACAATGAG
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCT
CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTATCTAGTGACTATT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

JE12_VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTSYVMHWVKQKSGQGLEWIGYINPYNDGAKYNE
KPKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTLTVSS

JE12_VK

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCAT
CTCTTGCAAGATCTAGTCAGAGCATTGAACATATTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACC
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG
GTCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGAGT
GGAGGCTGAAGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTTACATGTTCCGTTTACGTTTCG
GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

JE12_VK

DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIEHINGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPTTFGGGTKLEIK

EH6_VH

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGTTATGTTATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTG
GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATTTATTAATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAG
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACCTCAGACAAAGCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCT
CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATTCTCCTCTGGGTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

EH6_VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGFINPYNDGTKYNE
KFKGKATLTSDKASTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARFSSGYWGQGTTLTVSS

EH6_VK

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCAT
CTCTTGCAAGTCTAGTCAGAGTATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACC
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAATCGATTTTCTGGG
GTCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGT
GGGGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCCTTCAAGTTTCAATGTTCTTTTACGTTTCG
GCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA

EH6_VK

DVLTMTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVAEDLG VYYCLQVSHVPFTFGSGTKLEIK

AG9_VH

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAGGGCTTCTGGATACACATTCACTACCTATGTTATTCAGTGGGTGAAGCAGAAGCCTG
GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAGGTACAATGAG
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAAC
CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTTTCTAGTGACTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AG9_VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGARYNE
KFKGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTTLTVSS

AG9_VK

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGCGATCAGGCCTCCAT
CTCTTGACAGATCTAGTCGGAGCATTGAACATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAATGGTACC
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG
GTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGTGT
GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTTACGTTTCG
GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

AG9_VK

DVLMTONPLSLPVS LGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVS NRFG
VPDRFGSGSGTDFTLRISSEAEADLG VYYCFQGSHVPFTFGGGTKLEIK

AH3 VH

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAGGGCTTCTGGATACACATTCACCTACCTATGTTATTCAGTGGGTGAAGCAGAAGCCTG
GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAGGTACAATGAG
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAAC
CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTATCTAGTGACTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AH3 VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGARYNE
KFKGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTTLTVSS

AH3 VK

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAGGCCTCCAT
CTCTTGCAATCTAGTCGGAGCATTGAACATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAATGGTACC
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTCTGGG
GTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGTGT
GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTTACGTTTCG
GAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

AH3 VK

DVLMTONFLSLPVSLGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLRISSEAEEDLGVIYCFQGSHPFTFGGGTKLEIK

DD9_VH

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGAC
TTGTTCTTTTTCTGGGTTTTCTACTGAGCACTTCGGGTATGGGTGTGAGTTGGATTCGTCAGT
CCTCAGGAAAAGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAAC
CCATCCCTGAAGAGCCGGATCACAACTCTCCAAGGATTCCTCAAGCAACCAGGTATTCCTCAA
GATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATATTACTGTGCTCGAAGTTGGACTACGG
CCCCGTTTGCTTTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

DD9_VH

QVTLKESGPGILQPSQTLSTLTCFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYN
PSLKSRTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPFAFWGQGLVTVSA

DD9_VK

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCAT
GACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAGATTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT
CCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCAGT
GGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGGGGCTGAAGATGCTGC
CACTTATTACTGCCAACAGTGGAATAGTTCCCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGG
AGCTGAAA

DD9_VK

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVDYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRES
GSGSGTSYSLTISRMGAEDAATYYCQQWNSSPLTFGAGTKLELK

DH2_VH

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGAC
TTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTTCGTCAGC
CTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAAC
CCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGCAACCAGGTATTCCTCAA
GATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGAAGTGGGACTACGG
CCCCGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

DH2_VH

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYN
PSLKSRILTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYWGQGLVTVSA

DH2_VK

CAAATTGTTCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCAT
GACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT
CCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCAGT
GGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGC
CACTTTTTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTTCCCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGG
AGCTGAAA

DH2_VK

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFS
GSGSGTSYSLTISRMEAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK

DD6_VH

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGGCCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAAGGCTTCTGGATACAGATTCAGTACTACAACATGCACTGGGTGAAGCAGAACCTTG
GAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAACCCTAAAAATGGTGTATTACTACAACCAG
AAGTTC AAGGGCAAGGCCACATTGACAGTGAACAGGTCTCCAACACAGCCTACATGGAGAT
CCGCAGCCTGACATCGGAAGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAACAGCTCTGACTTACTGGG
GACAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

DD6_VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTDYNMHWVKQNLGKSLEWIGYINPKNGVIYYNQ
KFKGKATLTVNRSSNTAYMEIRSLTSEDSAVYYCATALTYWGQGLVTVSA

DD6_VL

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCAC
TTGTGCTCAAGTACTGGGGCTGTTGCAGCTAATAACTATGCCAACTGGATCCAAGAAAAAC
CAGATCATTTATTCAGTGGTCTGATAGCTGGTACCAACAAGCGAGCTCCAGGTGTTCTGCC
AGATTCTCAGGCTCCCTGATAGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGA
GGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACTATTGGGTGTTCCGGTGGAGGAA
CCAAAGTGACTGTCCTAGGC

DD6_VL

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVAANNYANWIQEKPDHLFTGLIAGTNKRAPGVPA
RFGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFEGGTKVTVLG

IA12 VH

CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTC
CTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACCTATGGAATGACCTGGGTGAAACAGGCTCCAG
GAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTCCTCTGGAGTGCCAACATATGCTGAT
GACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGAT
CAACAACCTCAAAAGTGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGACCGGAAGTTGCTTACT
GGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

IA12 VH

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMTWVKQAPGKGLKWMGWINTSSGVPTYAD
DFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKSEDTATYFCARPEVAYWGQGLVTVSA

IA12 VK

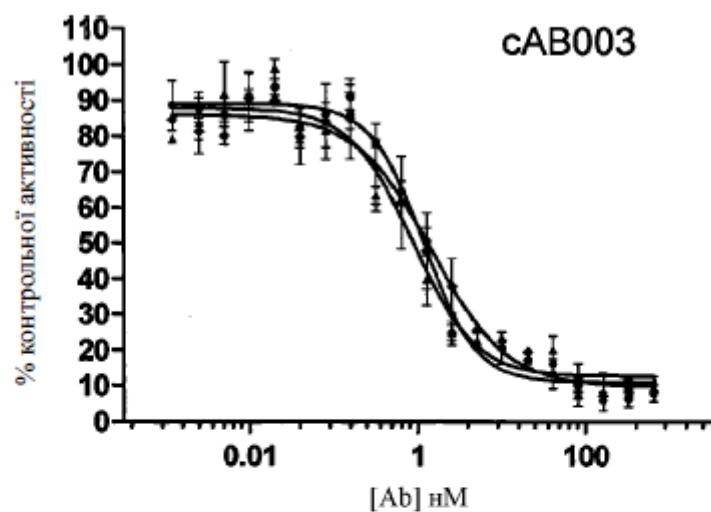
GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTGCGTTACCTTTGGACAACCAGCCTCTAT
CTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATGATAATGGAAAGACTTATTTGCATTGGTTAT
TTCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGA
GTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT
GGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTTTCCGTACACGTTTCG
GAGGGGGGACCAAACCTGGAAATAAAA

IA12 VK

DVVMQTPLTSLVTFGQPASISCKSSQSLLYDNGKTYLHWLFQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG
VPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCVQGTDFPYTFGGGKLEIK

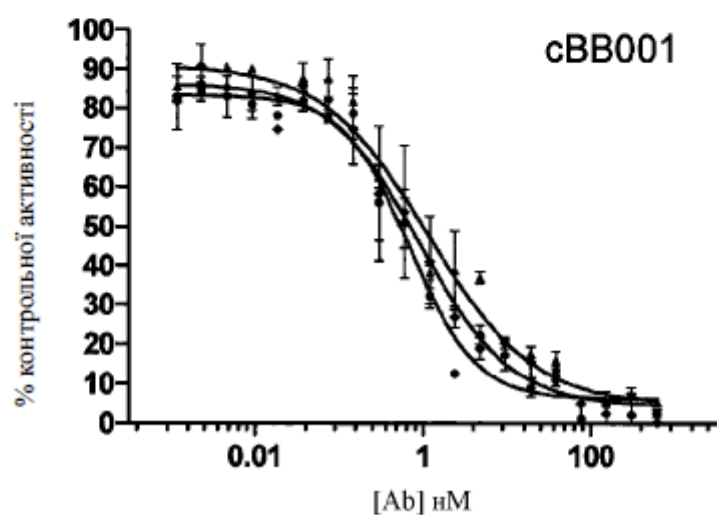
A

	IC_{50} нМ(SD)
cAB003	1.172(0.297)



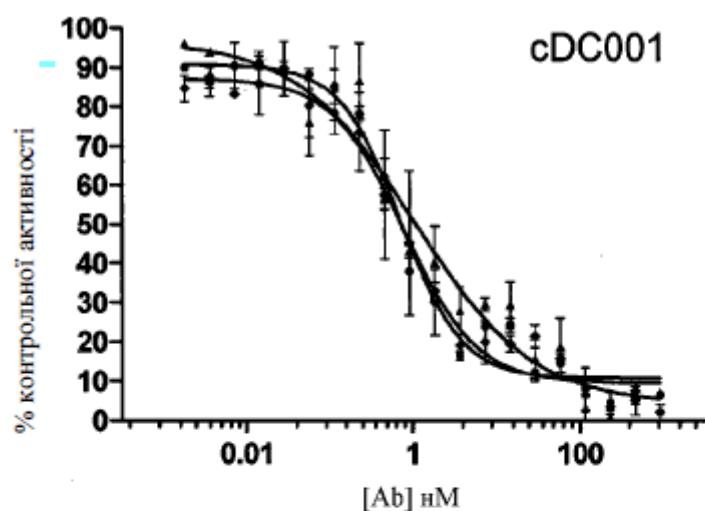
B

	IC_{50} нМ(SD)
CBB001	0.925 (0.228)



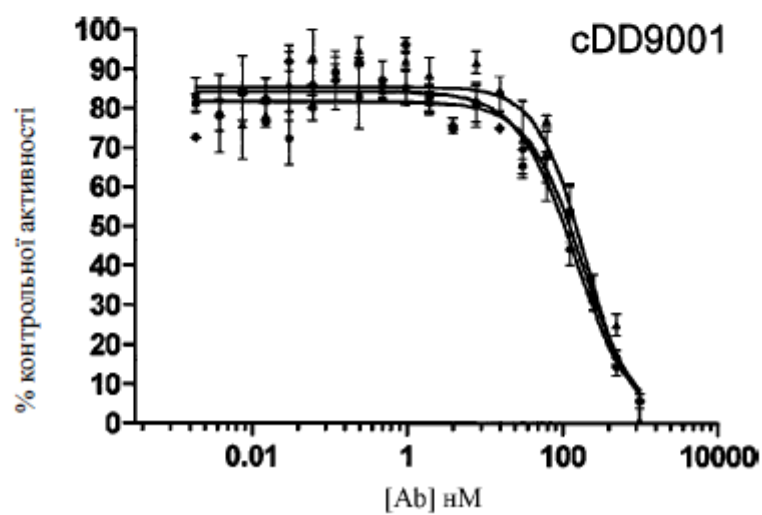
C

	IC50 нМ (SD)
cDC001	0.851 (0.177)



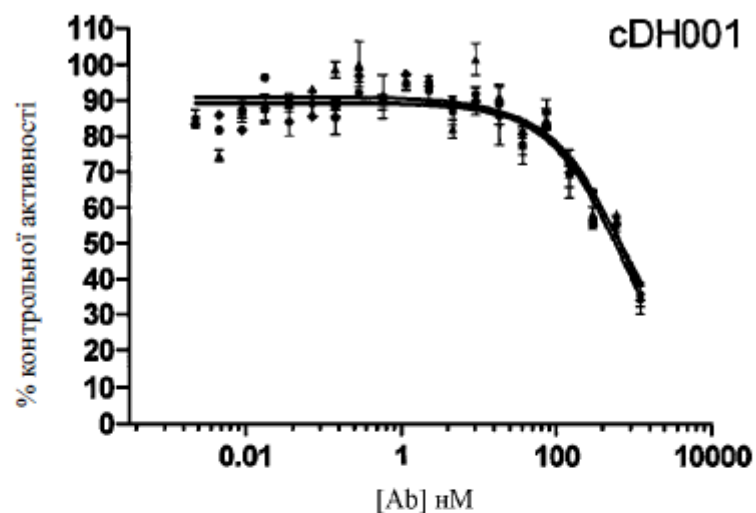
D

	IC50 нМ (SD)
cDD9001	172.033 (23.353)



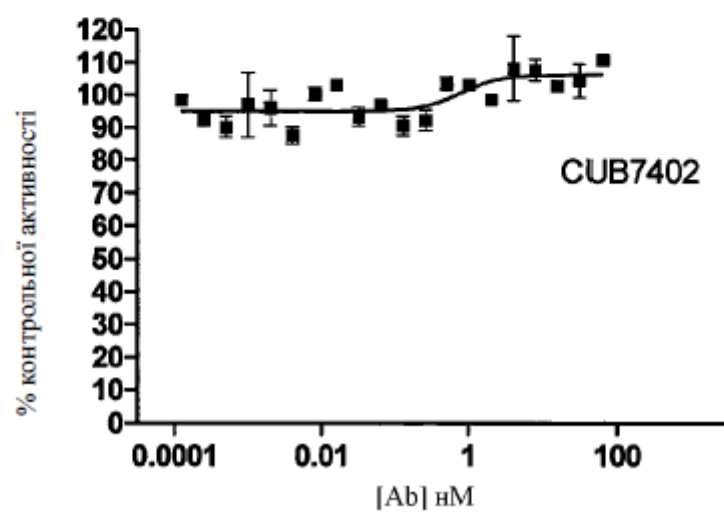
E

	IC50 нМ (SD)
cDH001	829.233 (59.923)



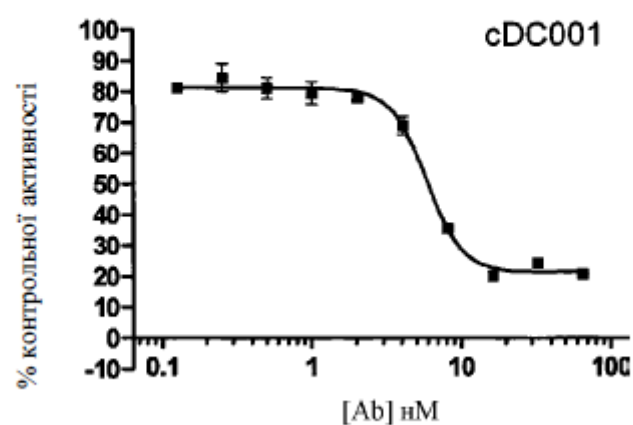
F

	IC50 нМ
CUB7402	>100



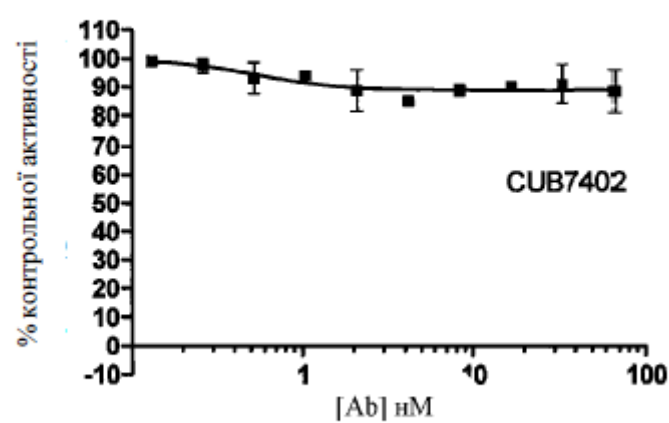
A

	IC50 нМ
cDC001	5.862



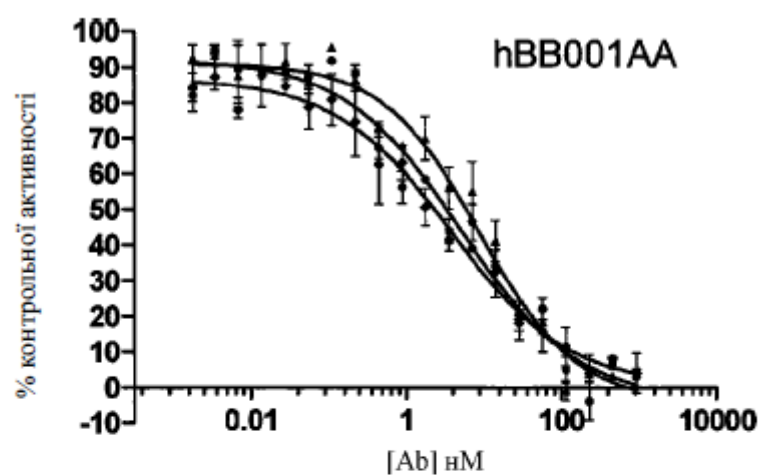
B

	IC50 нМ
CUB7402	>100



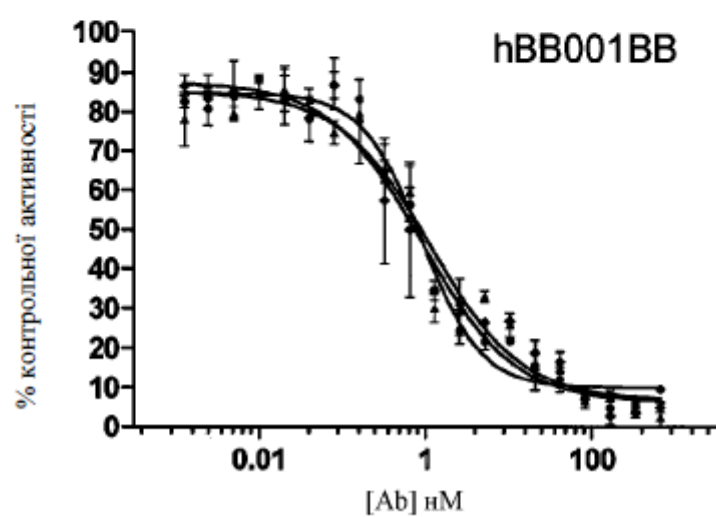
A

	IC50 нМ (SD)
hBB001AA	5.987 (2.643)



B

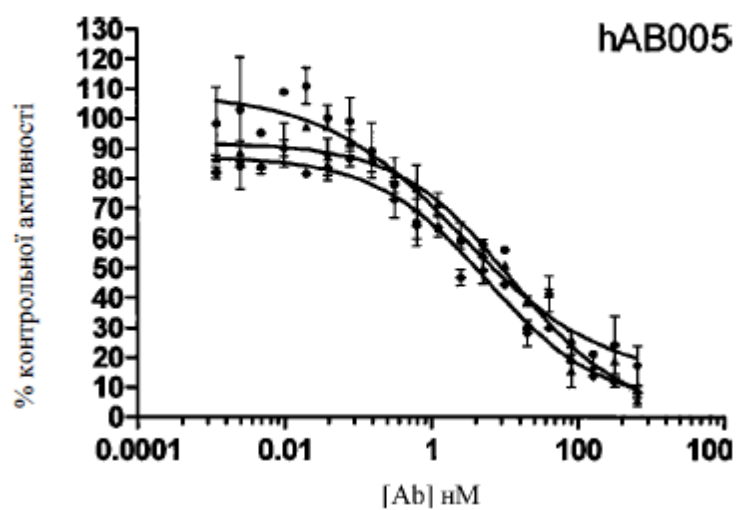
	IC50 нМ (SD)
hBB001BB	0.985 (0.140)



C

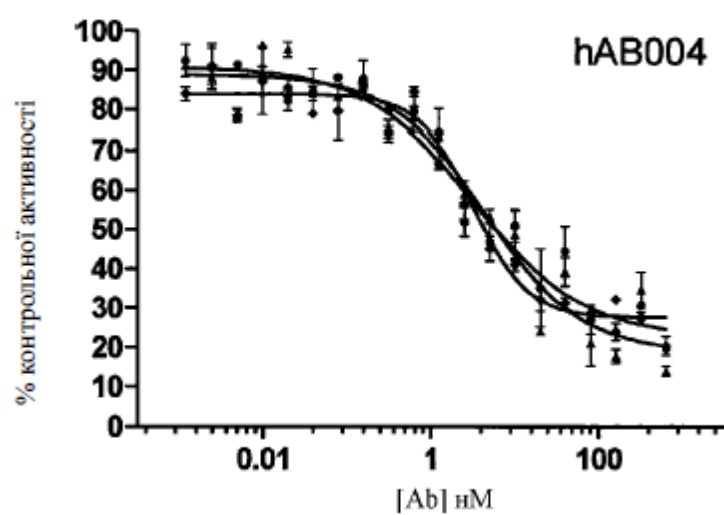
	IC50 нМ (SD)
hAB005	6.868 (4.895)

показано 2 партії

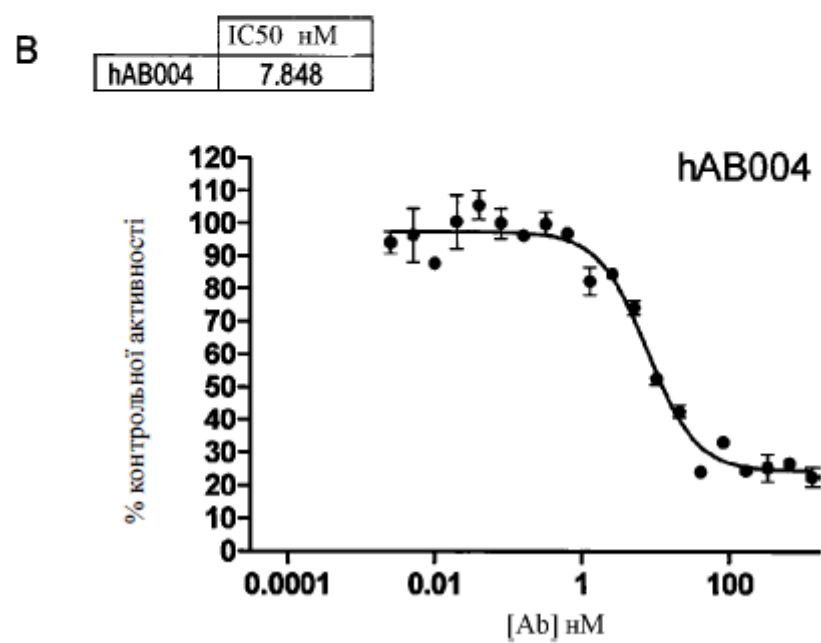
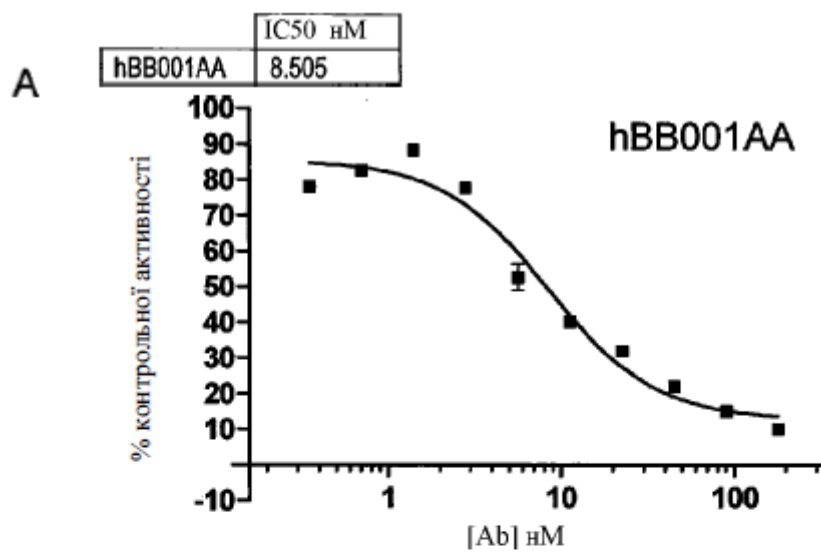


D

	IC50 нМ (SD)
hAB004	3.854 (0.886)

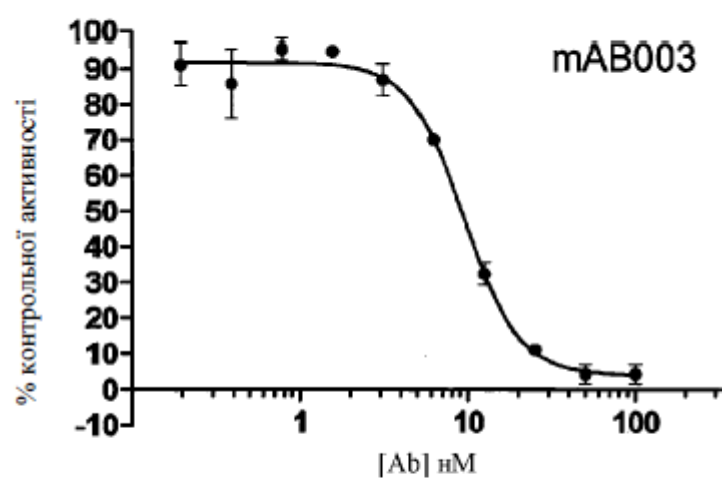


ФІГ.31



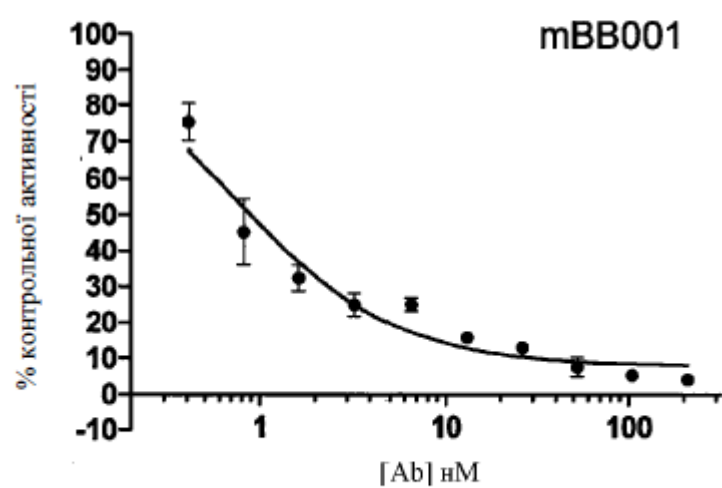
A

	EC50 нМ
mAB003	9.501



B

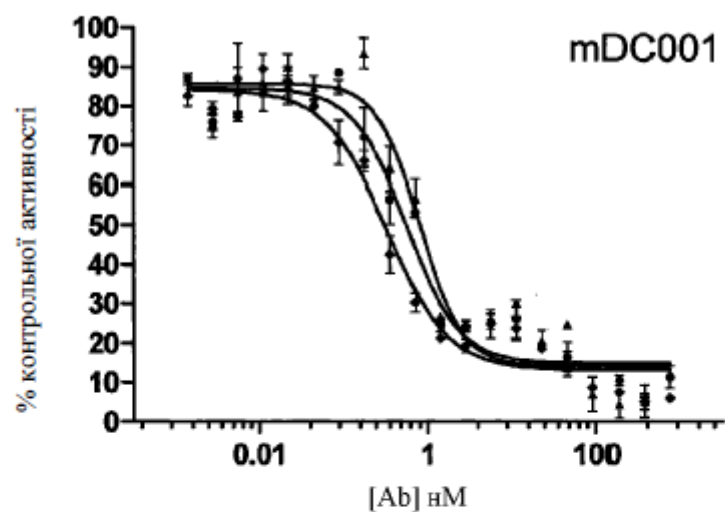
	EC50 нМ
mBB001	0.752



ФИГ. 33

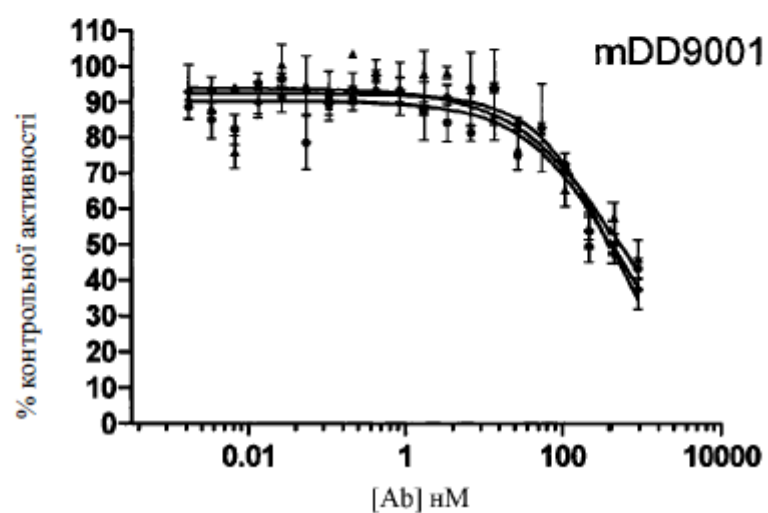
C

	EC50 нМ (SD)
mDC001	0.5712 (0.2409)



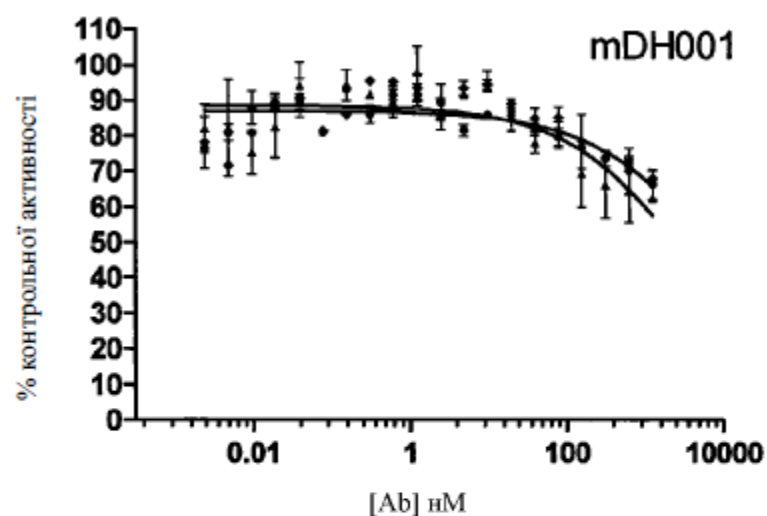
D

	EC50 нМ (SD)
mDD9001	564.233 (83.996)



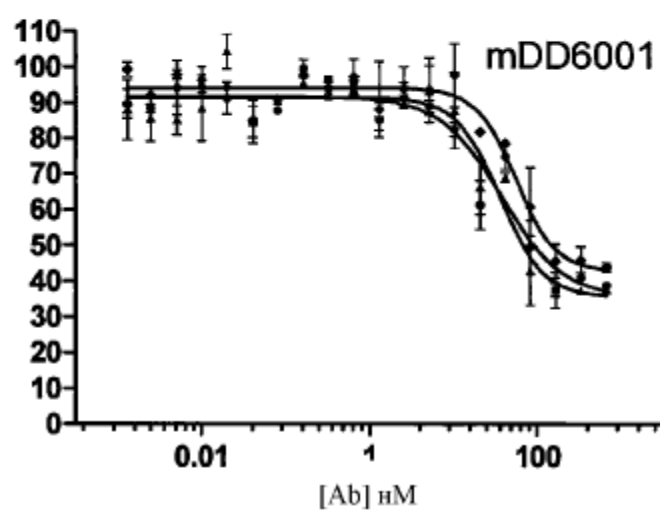
E

	EC50 нМ (SD)
mDH001	~7000



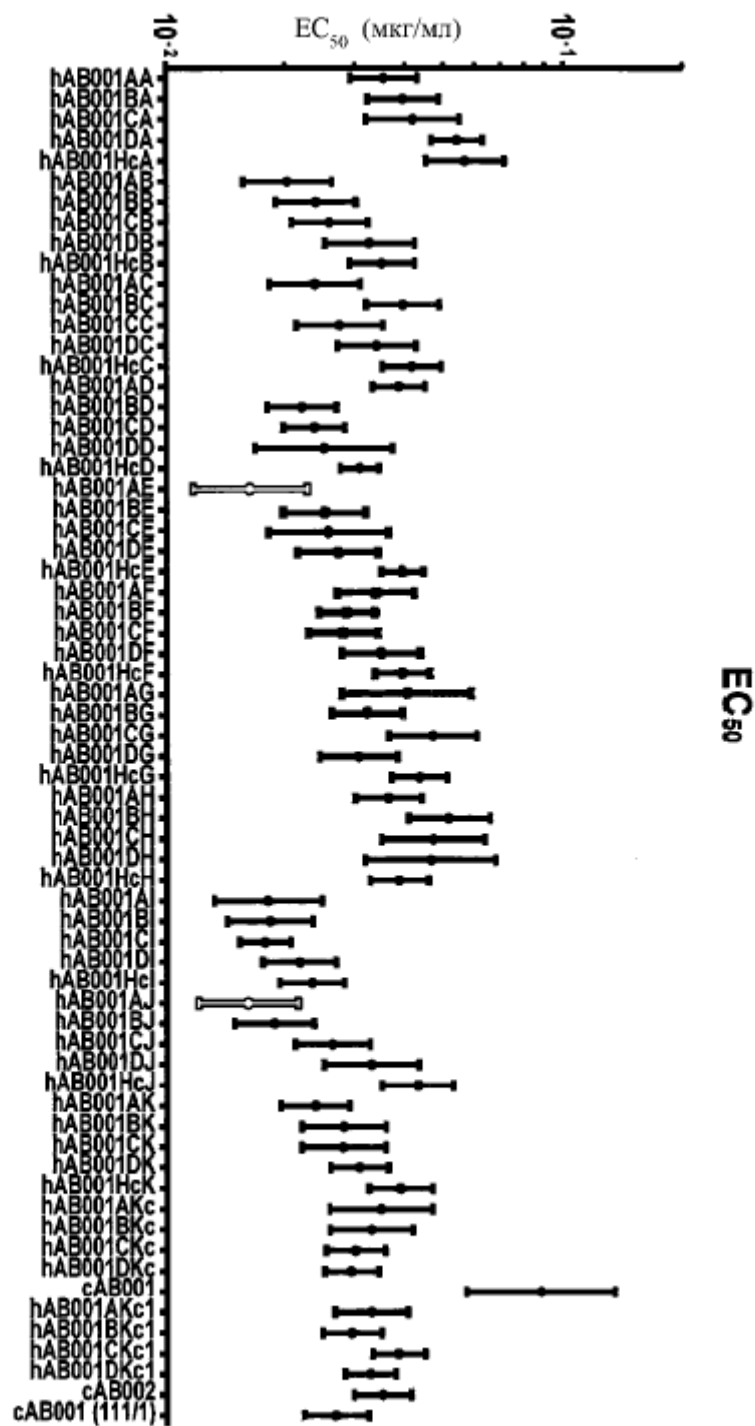
F

	EC50 нМ (SD)
mDD6001	43.196 (10.948)



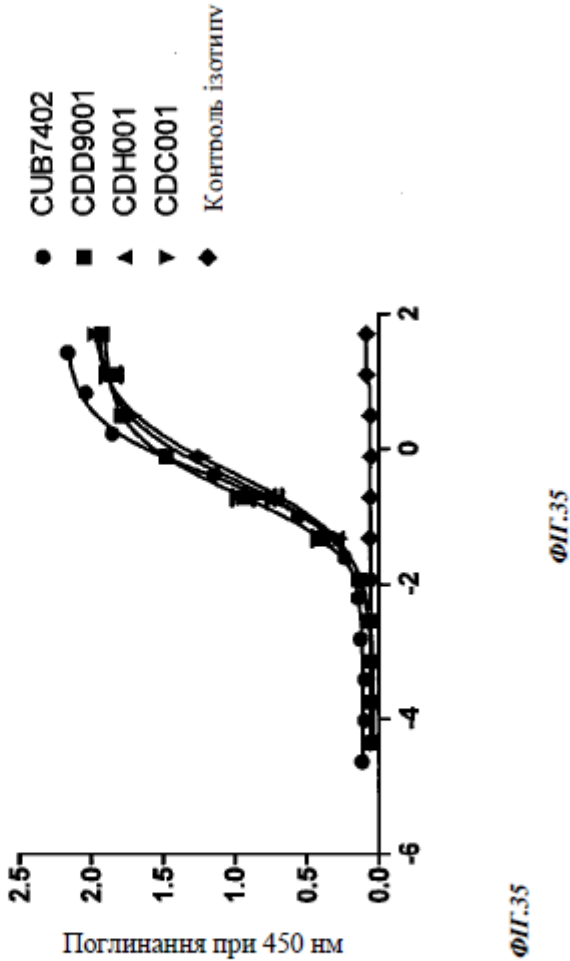
Зразок

Зразок



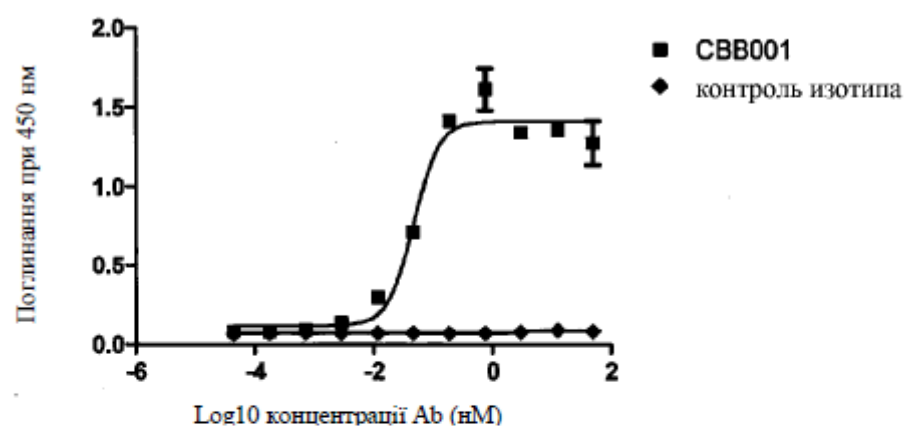
A

	CUB7402	CDD9001	CDH001	CDC001
EC50 (nM)	0.3804	0.2099	0.3401	0.4418
r ²	0.9991	0.998	0.9968	0.9985
EC50 (95% довірчий інтервал)	0.3291 to 0.4396	0.1860 to 0.2368	0.2890 to 0.4002	0.3927 to 0.4971



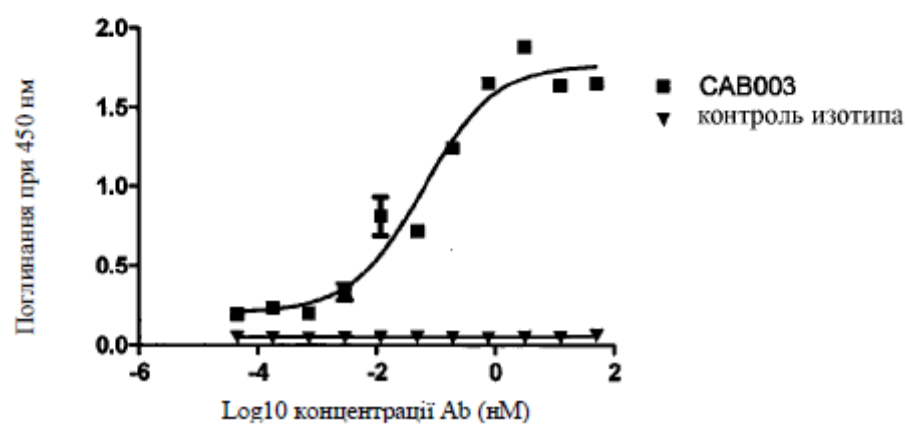
B

	CBV001
EC50 (нМ)	0.04811
r2	0.9682
EC50 (95% Довірчий інтервал)	0.03611 to 0.06410

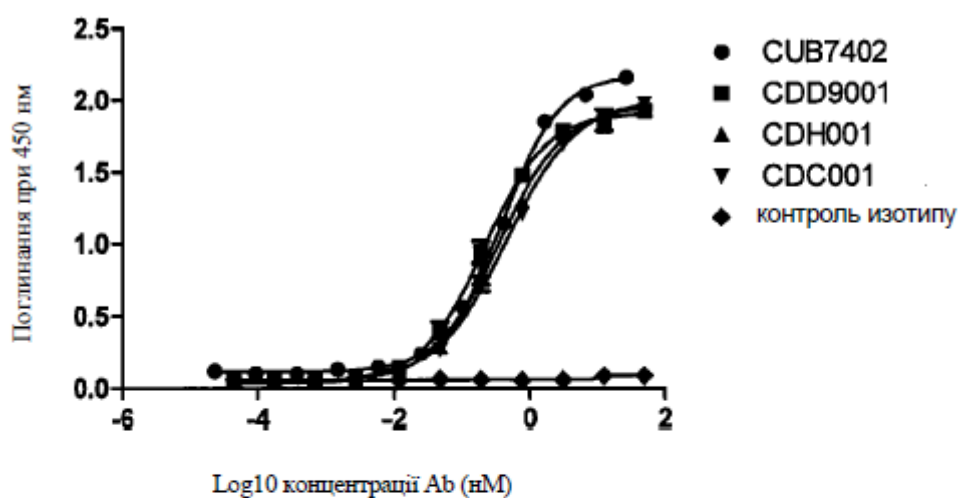


C

	CAB003
EC50 (нМ)	0.06141
r2	0.9568
EC50 (95% Довірчий інтервал)	0.03066 to 0.1230



A	CUB7402	CDD9001	CDH001	CDC001
EC50 (нМ)	0.3804	0.2099	0.3401	0.4418
r ²	0.9991	0.998	0.9968	0.9985
EC50 (95% довірчий інтервал)	0.3291 to 0.4396	0.1860 to 0.2368	0.2890 to 0.4002	0.3927 to 0.4971

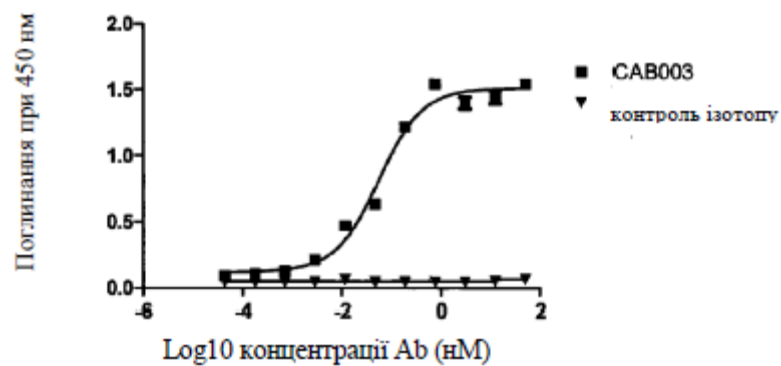


B	CBV001
EC50 (нМ)	0.05166
r ²	0.9383
EC50 (95% довірчий інтервал)	0.03303 to 0.08079



ФІГ. 36

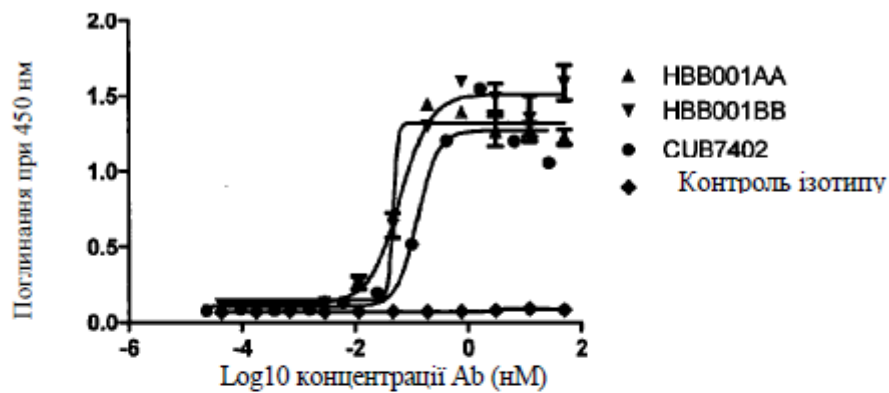
C	CAB003
EC50 (нМ)	0.05682
r2	0.9837
EC50 (95% доверительный интервал)	0.03066 to 0.1230



ФІГ. 36

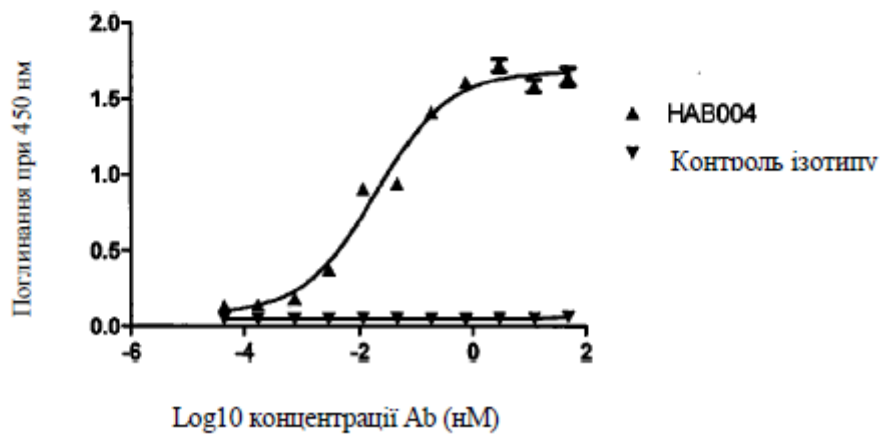
A

	CUB7402	HBB001AA	HBB001BB
EC50 (нМ)	0.1277	~ 0.04739	0.06274
r ²	0.9588	0.9792	0.9771
EC50 (95% Довірчий інтервал)	0.06801 to 0.2396	ND	0.04636 to 0.08491



B

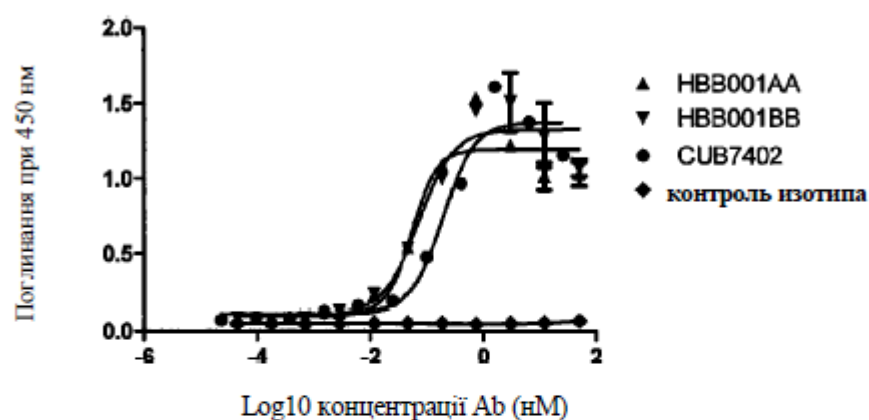
	HAВ004
EC50 (нМ)	0.02001
r ²	0.9794
EC50 (95% довірчий інтервал)	0.01199 to 0.03342



ФІГ. 37

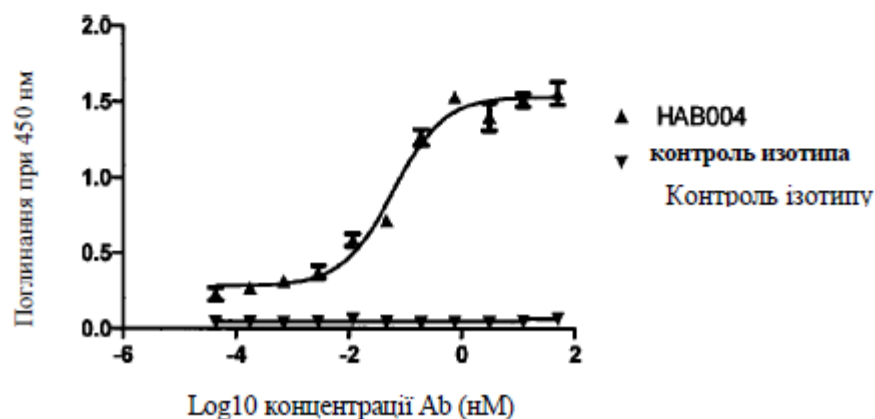
A

	CUB7402	HBB001AA	HBB001BB
EC50 (нМ)	0.1982	0.0561	0.07377
r2	0.9586	0.9329	0.9361
EC50 (95% Довірчий інтервал)	0.09303 to 0.4223	0.03522 to 0.08934	0.04198 to 0.1296



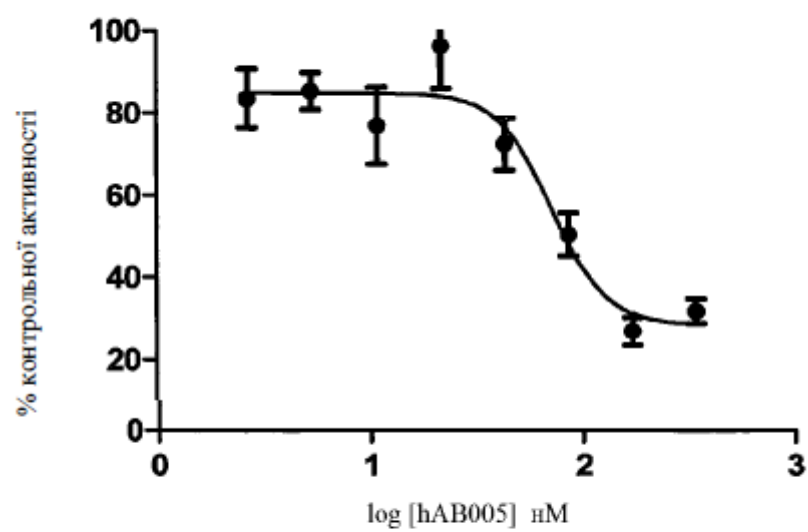
B

	HA004
EC50 (нМ)	0.06117
r2	0.9766
EC50 (95% Довірчий інтервал)	0.04047 to 0.09246



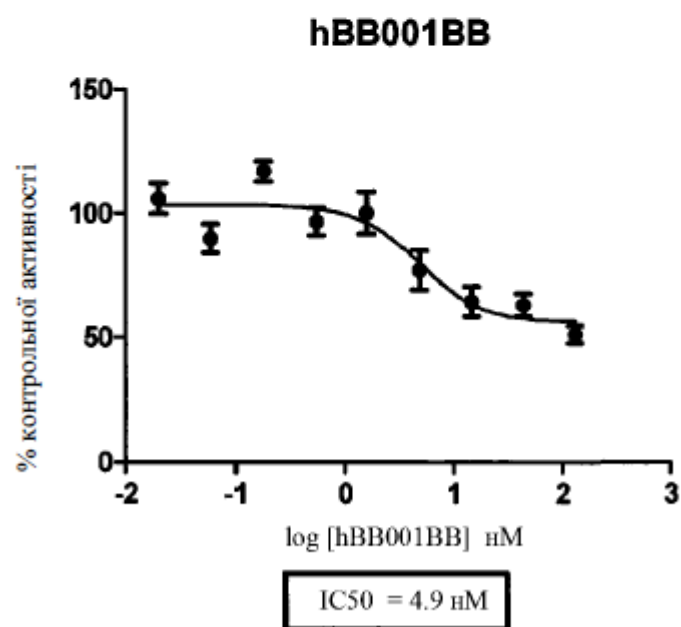
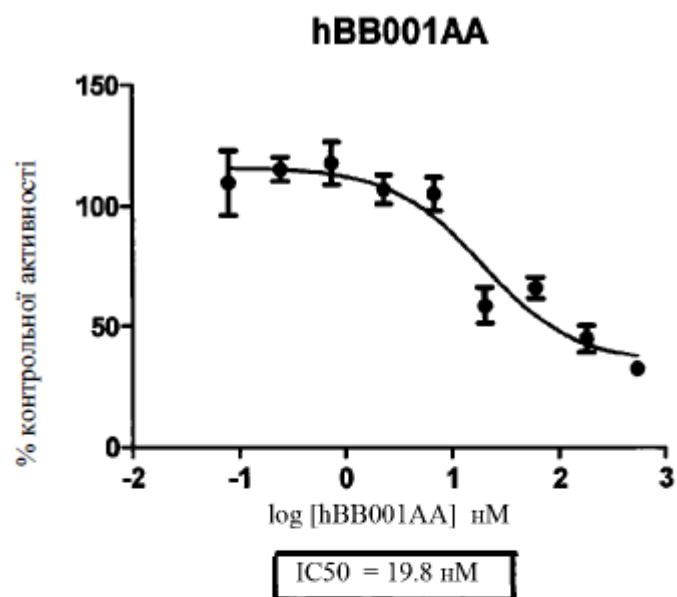
ФІГ. 38

hAB005



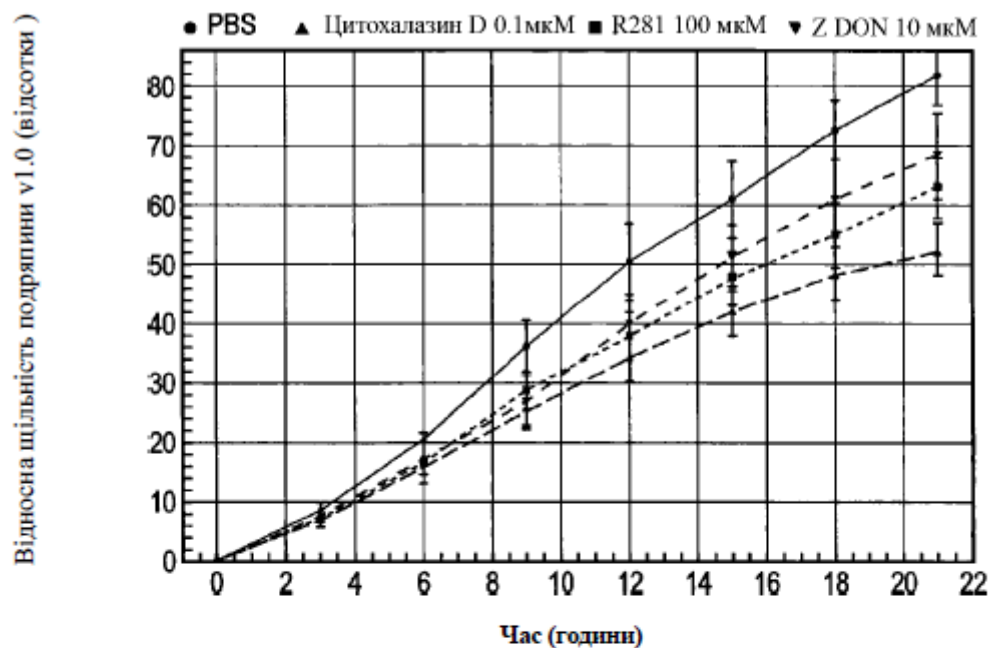
IC₅₀ = 71.85 нМ

ФІГ. 39

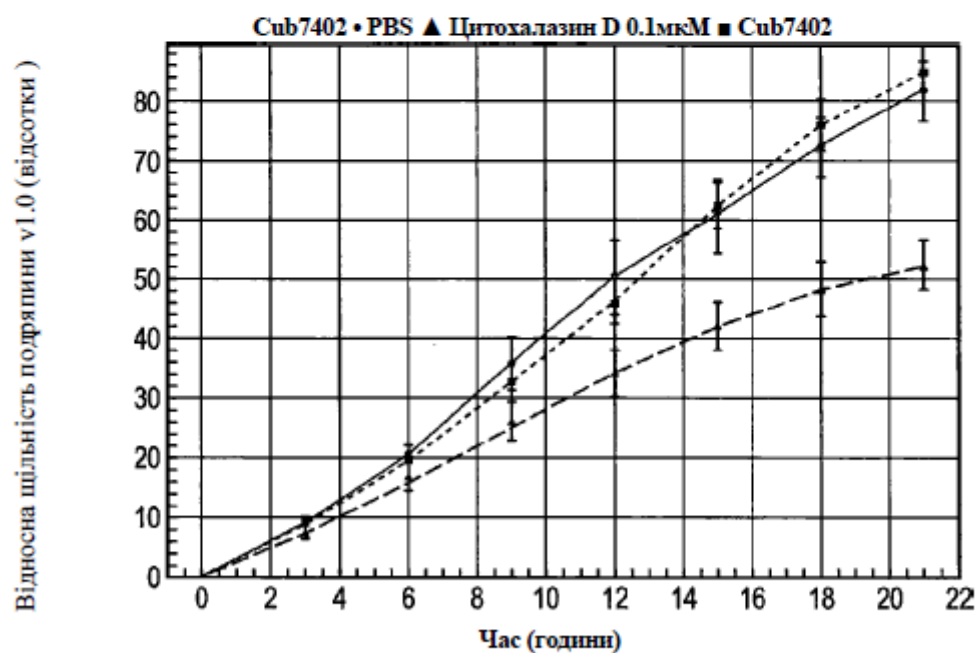


Фиг. 40

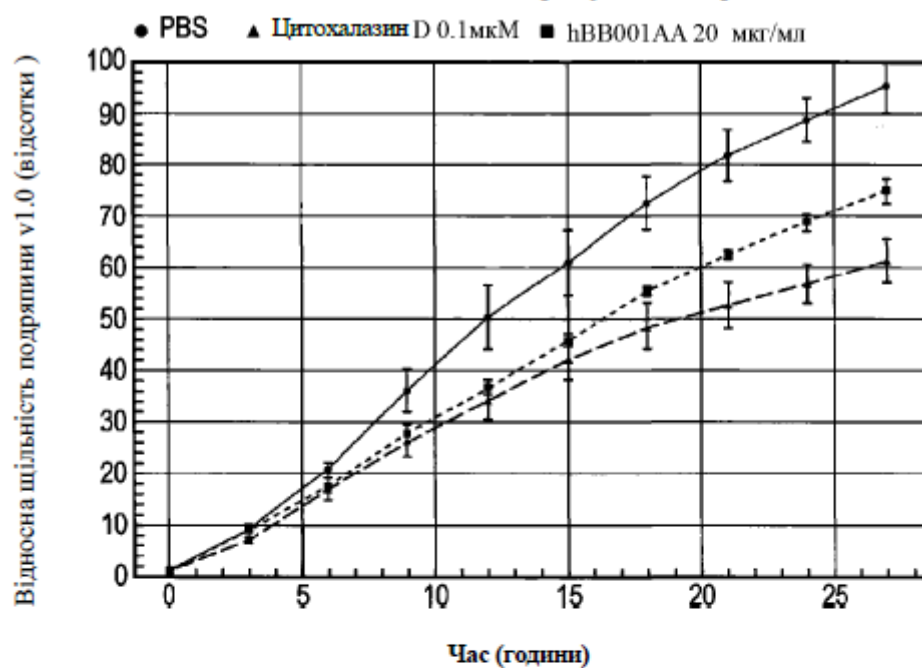
07.02.13 Аналіз методом зарощування подряпини WI-38 Контролі



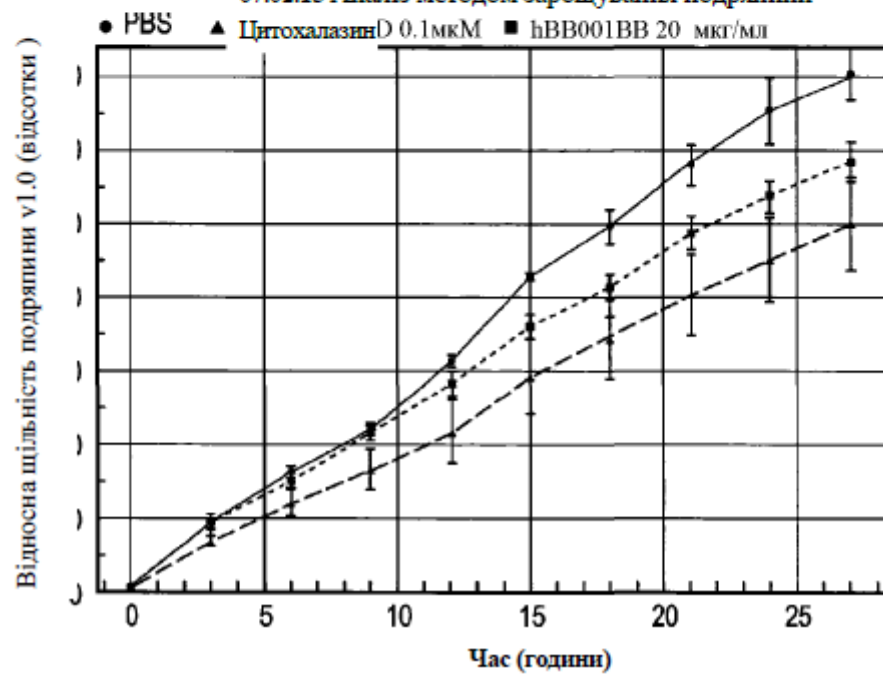
07.02.13 Аналіз методом зарощування подряпини WI-38



07.02.13 Аналіз методом зарощування подряпини

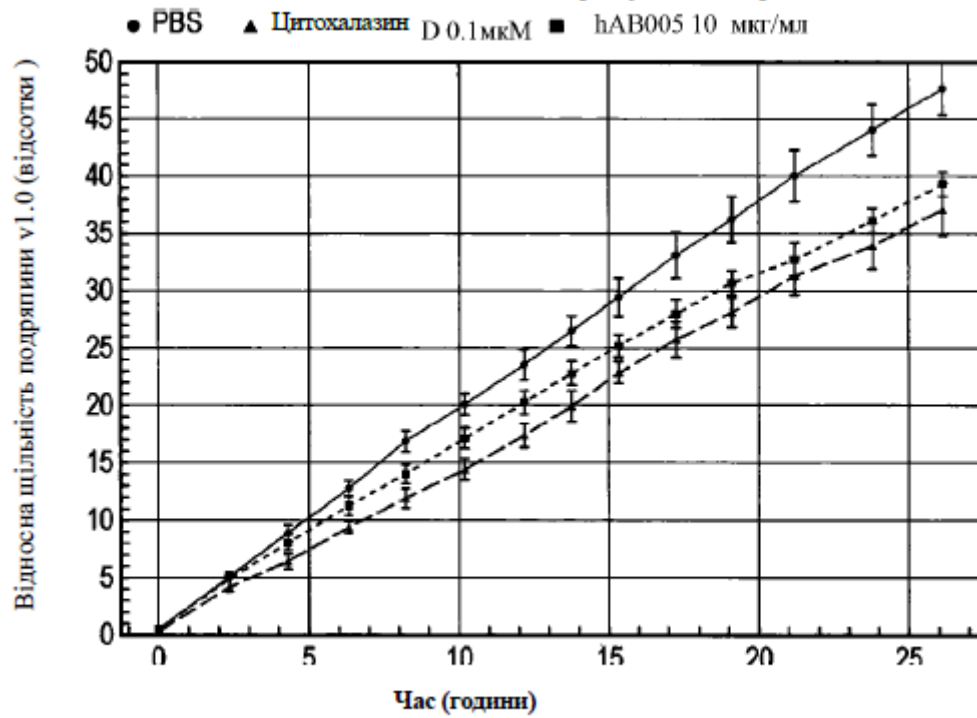


07.02.13 Аналіз методом зарощування подряпини



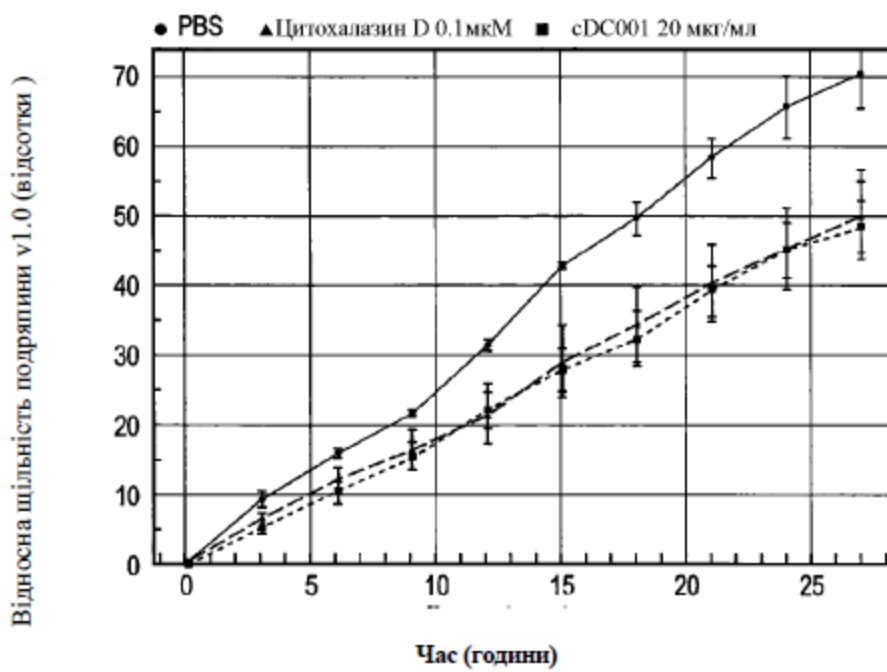
ФІГ. 42

24.04.13 Аналіз методом зарощування подряпин

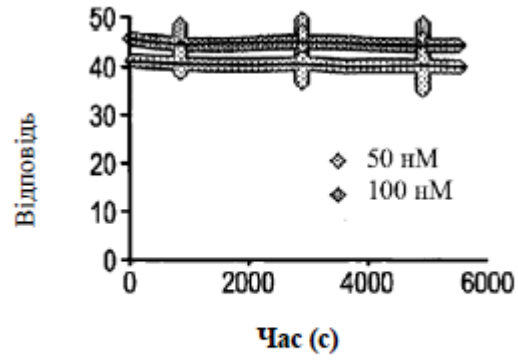
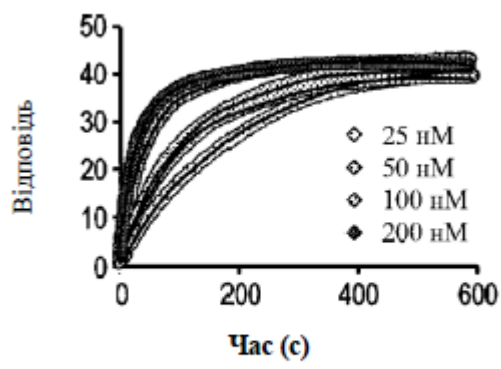


ФІГ. 43

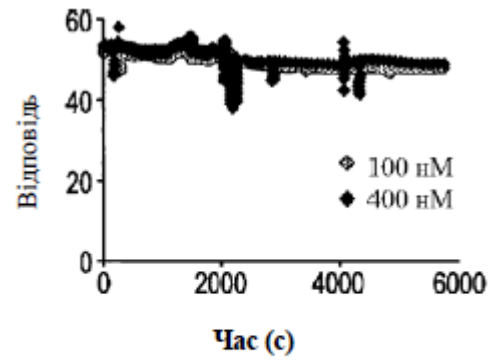
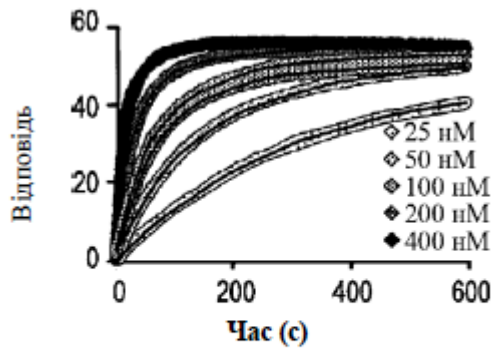
07.03.13 Аналіз методом зарощування подряпин



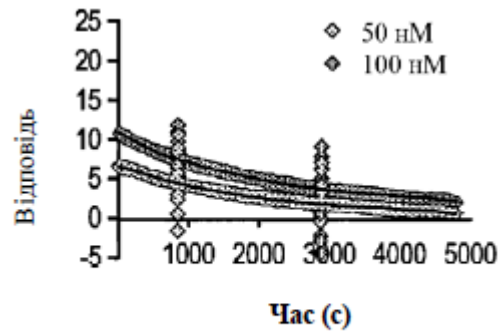
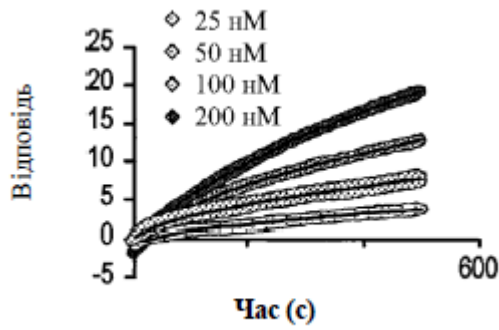
ФІГ. 44



ФІГ. 45



ФІГ. 46



ФІГ. 47