УКРАЇНА

(19) UA (11) 119235 (13) C2

(51) МПК (2019.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/00

МІНІСТЕРСТВО ЕКОНОМІЧНОГО РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2015 12536**

(22) Дата подання заявки: **20.05.2014**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **27.05.2019**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/825,477**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **20.05.2013**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**

(41) Публікація відомостей про заявку: **11.04.2016, Бюл.№ 7**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.05.2019, Бюл.№ 10**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT **PCT/US2014/038847, 20.05.2014**

(72) Винахідник(и):
Чжан Їнь (US),
Зучеро Джой Ю (US),
Етвол Джасвіндер (US),
Коуч Джесіка (US),
Деніс Марк (US),
Ернст Джеймс (US),
Вотс Райан (US),
Лазар Грегорі А. (US)

(73) Власник(и):
ДЖЕНЕНТЕК, ІНК.,
1 Dna Way, South San Francisco, California 94080, United States of America (US)

(74) Представник:
Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
HOREJSI V. et al. Monoclonal antibodies against human leukocyte antigens II. Antibodies against CD45 T200 CD3 T3 CD43 CD10 calla transferrin receptor T9 a novel broadly expressed 18-KDA antigeN MEM-43 and a novel antigen of restricted expression MEM-74. Folia biologica (Prague), 1988, Vol. 34, no. 1, P. 23 – 34
POLÄKOVÄ K. ET AL. Characterization of a new monoclonal antibody (TR-19) against human transferrin receptor and its application in topographic study. NEOPLASMA 1991, 1991,Vol. 38, no. 1, P. 21 – 31
Biocompare. Anti-Transferrin Receptor (p90, CD71) (TFRC) antibody (APC) ABIN238474 from antibodies-online. Biocompare.com, 2014 Retrieved from the Internet: URL:http://www.biocompare.com/9776-Antibodies/4144935-anti- Transferrin-Receptor-p90-CD71-TFRC-antibody-APC/[retrieved on 2014-08-04]
LSbio. CD71 / Transferrin receptor mouse anti-human monoclonal (APC) (MEM-75) Antibody -LS- C46200 –LSBio. 2014, Retrieved from the Internet: URL:http://www.lsbio.com/Documents/PDF/Antibodies/46016 [retrieved on 2014-08-05]
WO 2012075037 A1, 07.06.2012

(54) АНТИТІЛО АНТИ-РЕЦЕПТОР ТРАНСФЕРИНУ І СПОСОБИ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіла анти-рецептор трансферину і способів його застосування.

UA 119235 C2

Галузь техніки, до якої належить винахід

Даний винахід стосується антитіл анти-рецептор трансферину і способів їхнього використання.

Споріднені заявки

Дана заявка просить пріоритет Тимчасової заявки на патент США № 61/825477, поданої 20 травня 2013 року, що включається в даний документ як посилання у всій своїй повноті.

Список послідовностей

Список послідовностей подається паралельно з описом як текстовий файл у форматі ASCII через EFS-Web, з ім'ям файлу "P5641RI-WO_SL.txt", час створення - 16 травня 2014 року, і розмір - 154599 байт. Список послідовностей, поданий через EFS-Web, являє собою частину опису і тим самим включається в даний документ як посилання у всій своїй повноті.

Рівень техніки

Проникнення в головний мозок великих молекул лікарських засобів сильно обмежено за допомогою в основному непроникного гематоенцефалічного бар'єра (BBB). Серед багатьох стратегій для подолання цієї перешкоди необхідно використовувати шляхи трансцитозу ендогенних рецепторів, експресованих у капілярному ендотелії головного мозку. Конструюються рекомбінантні білки, такі як моноклональні антитіла для цих рецепторів, щоб уможливити опосередковувану рецепторами доставку великих молекул у головний мозок. Стратегії доведення до максимуму споживання головного мозку, при цьому зводячи до мінімуму зворотний трансцитоз назад у кров, а також доведення до максимуму ступеня акумуляції після дозування терапевтичного препарату, здійснюються за допомогою таких даних, що антитіла з низькою спорідненістю до рецепторів BBB пропонують потенційну можливість істотного збільшення перенесення через BBB і утримання в CNS (центральній нервовій системі) асоційованих терапевтичних залишків/молекул, порівняно з типовими антитілами з високою спорідненістю до таких рецепторів (Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3, 84ra43 (2011); Yu et al., Sci. Transl. Med. 25 May 2011:Vol. 3, Issue 84, p. 84ra44). Однак ці антитіла не зв'язуються специфічно з TfR людини і приматів.

Суть винаходу

Моноклональні антитіла мають величезний терапевтичний потенціал для лікування неврологічних захворювань або захворювань центральної нервової системи (CNS), але їхнє проходження в головний мозок обмежено гематоенцефалічним бар'єром (BBB). У минулому дослідження показали, що дуже малий відсоток (приблизно 0,1 %) IgG, що циркулюють у кровотоці, проходять через BBB у CNS (Felgenhauer, Klin. Wschr. 52:1158-1164 (1974)), при цьому концентрація антитіл у CNS може бути недостатньою, щоб уможливити стійкий вплив. Раніше було виявлено, що відсоток антитіл, які розподіляються в CNS, міг би бути поліпшений з використанням рецепторів BBB (тобто рецептора трансферину, рецептора інсуліну тощо) (дивися, наприклад, WO 9502421). Наприклад, антитіло анти-рецептор BBB може бути зроблено мультиспецифічним для націлювання на один або кілька бажаних антигенів CNS, або одна або декілька гетерологічних молекул можуть зв'язуватися з антитілом анти-рецептор BBB, у будь-якому випадку, антитіло анти-рецептор BBB може допомогти в доставці терапевтичної молекули в CNS через BBB.

Однак націлювання на рецептор BBB традиційного специфічного антитіла з високою спорідненістю, як правило, дає в результаті обмежене збільшення перенесення через BBB. Пізніше автори знайшли, що величина споживання антитіла і розподіл антитіл у CNS серед досліджуваних антитіл анти-рецептор BBB зворотно пропорційна до його спорідненості зв'язування з рецептором BBB. Наприклад, антитіло з низькою спорідненістю до рецептора трансферину (TfR), дозоване при терапевтичних рівнях дози, сильно поліпшує перенесення через BBB і утримання в CNS антитіла анти-TfR відносно антитіла анти-TfR з більш високою спорідненістю, й уможливлює більш легке одержання терапевтичних концентрацій у CNS (Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3, 84ra43 (2011)). Доказ такого перенесення через BBB досягають із використанням біспецифічного антитіла, яке зв'язує як TfR, так і фермент, що розщеплює білок-попередник амілоїду (APP), β-секретазу (BACE1). Одна системна доза біспецифічного антитіла анти-TfR/BACE1, отриманого за допомогою генної інженерії з використанням методології цього винаходу, не тільки дає в результаті значне споживання антитіла в головному мозку, а також кардинально знижує рівні $A\beta_{1-40}$ у головному мозку порівняно з одним тільки моноспецифічним анти-BACE1, говорячи про те, що проникність BBB залежить від сильнодії анти-BACE1. (Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3, 84ra43 (2011); Yu et al., Sci. Transl. Med. 3, 84ra44 (2011)).

Ці дані й експерименти висвітлюють кілька можливих механізмів, що стоять за збільшенням споживання антитіла в CNS, з використанням підходу з антитілами з більш низькою спорідненістю. По-перше, антитіла анти-рецептор BBB (BBB-R) з високою спорідненістю

(наприклад, анти-TfR[A] із Atwal et al. and Yu et al., вище) обмежують споживання в головному мозку через швидке насичення BBB-R у судинній системі головного мозку, зменшуючи, таким чином, загальну кількість антитіла, споживаного в головному мозку, а також обмежуючи його розподіл у судинній системі. Суворо кажучи, зниження спорідненості до BBB-R поліпшує споживання і розподіл у головному мозку, зі стійким зсувом, що спостерігається при локалізації від судинної системи до нейронів і асоційованих нейропілів, розподілених у CNS. По-друге, більш низька спорідненість антитіл до BBB-R, як передбачається, ослаблює здатність антитіла до повернення на судинну сторону BBB за допомогою BBB-R з боку CNS мембрани, оскільки загальна спорідненість антитіла до BBB-R є низькою і локальною концентрацією антитіла на стороні CNS BBB є ненасичувальною через швидке диспергування антитіла у відділі CNS. По-третє, in vivo, і як спостерігається для системи TfR, антитіла з більш низькою спорідненістю до BBB-R не виводяться із системи так само ефективно, як і антитіла з більш високою спорідненістю до BBB-R, і таким чином, вони залишаються при більш високих циркулюючих концентраціях, ніж їхні аналоги з більш високою спорідненістю. Це є переважним, оскільки рівні циркулюючих антитіл підтримуються при терапевтичних рівнях протягом більш тривалого періоду часу для антитіла з більш низькою спорідненістю, ніж для антитіла з більш високою спорідненістю, що, як наслідок, поліпшує споживання антитіла в головному мозку протягом більш тривалого періоду часу. Крім того, це поліпшення експонування, як для плазми крові, так і для головного мозку, може зменшити частоту дозування в клініці, що мало б потенційну перевагу не тільки для сприйнятливості і зручності пацієнта, але також і для полегшення будь-яких можливих побічних впливів або нецільових впливів антитіла і/або терапевтичної сполуки, зв'язаної з ним.

Антитіла BBB-R з низькою спорідненістю, описані в роботі, що вище згадується, вибирають/одержують за допомогою генної інженерії, щоб виключити негативний вплив на природне зв'язування між трансферином і TfR, і таким чином, усунути потенційні побічні впливи, пов'язані з перенесенням заліза. Проте, при уведенні визначених таких антитіл мишам спостерігаються деякі помітні побічні впливи. Миші демонструють первинну реакцію стійкого збідніння популяції ретикулоцитів, супроводжувану швидким настанням гострих клінічних симптомів. Хоча миші відновлюються, як після гострих клінічних симптомів, так і після зменшення рівнів ретикулоцитів, по ходу справи, усунення або інше ослаблення цього впливу на ретикулоцити є, мабуть, бажаним для антитіла анти-TfR, щоб його можна було використовувати безпечно як терапевтичну молекулу. Виявлено, що первинна реакція на введення анти-TfR (стійке збідніння ретикулоцитів і гострі клінічні ознаки) викликається здебільшого активністю антитіло-залежної опосередковуваної клітинами цитотоксичності (ADCC) антитіла, при цьому залишковий вплив збідніння ретикулоцитів опосередковується за допомогою шляху комплементу.

Ці попередні дослідження використовували антитіла миші, які специфічно зв'язуються з TfR миші, але які не розпізнають специфічно TfR приматів або людини., відповідно, даний винахід пропонує антитіла і їхні функціональні частини, які розпізнають специфічно TfR, як приматів, так і людини, щоб спростити дослідження безпеки й ефективності на приматах за допомогою антитіл перед терапевтичним або діагностичним застосуванням на людях. Дослідження in vitro з використанням лінії клітин еритробластів людини і первинних клітин кісткового мозку, оброблених антитілами анти-TfR людини, за даним винаходом, демонструє, що стійке збідніння TfR-позитивних еритроїдних клітин може так само спостерігатися в клітинних системах людини/приматів, як і на мишах (дивися, наприклад, Приклад 4).

Відповідно, у даному документі пропонуються також модифікації антитіл за даним винаходом для значного зниження або усунення небажаного зменшення популяції TfR-експресуючих ретикулоцитів при введенні антитіл анти-TfR, при цьому як і раніше роблячи можливим збільшення перенесення через BBB, збільшення розподілу в CNS і утримання в CNS, забезпечуваного антитілами анти-TfR людини/приматів, уведених при терапевтичних концентраціях. У даному документі пропонуються кілька загальних підходів для ослаблення впливу, що спостерігається, антитіл анти-TfR за даним винаходом, як на первинне, так і на залишкове збідніння ретикулоцитів, і вони можуть використовуватися окремо або в сполученні.

В одному з підходів, ефекторна функція антитіла анти-TfR людини/цино (мавп циномолгус) зменшується або усувається для зменшення або усунення активності ADCC. В іншому підході, спорідненість антитіла анти-TfR людини/цино до TfR людини або приматів додатково зменшується таким чином, що взаємодії антитіла з популяцією ретикулоцитів є менш шкідливими для цієї популяції. Третій підхід спрямований на зменшення кількості антитіла анти-TfR людини/цино, що є присутньою у плазмі крові, для зменшення експонування популяції ретикулоцитів для потенційно шкідливих концентрацій антитіла. Четвертий підхід намагається

захистити, стабілізувати і/або заповнити популяції ретикулоцитів таким чином, що будь-яке потенційне збідніння популяції ретикулоцитів у циркуляції або в кістковому мозку за допомогою введення антитіла анти-TfR людини/цино запобігається, зменшується або ослаблюється.

Зменшення або усунення ефекторної функції, як описано в даному документі, може здійснюватися за допомогою: (i) зменшення або усунення глікозилування антитіла ссавців дикого типу (наприклад, за допомогою продукування антитіла в навколишньому середовищі, де таке глікозилування не може здійснюватися, за допомогою мутації в одній або декількох точках приєднання вуглеводів таким чином, що антитіло не може глікозилуватися, або за допомогою хімічного або ферментативного видалення одного або декількох вуглеводів з антитіла після того, як воно глікозилується); (ii) за допомогою зменшення або усунення здатності антитіла анти-TfR людини/цино до зв'язування з Fc-рецептором (наприклад, за допомогою мутації Fc-області, за допомогою делеції в Fc-області або усунення Fc-області); або (iii) за допомогою використання ізотипу антитіла, про яке відомо, що воно має мінімальну ефекторну функцію або не має її (тобто, включаючи але не обмежуючись цим, IgG4).

Зменшення активування комплементу антитілом, як описано в даному документі, може здійснюватися за допомогою зменшення або усунення здатності антитіла анти-TfR людини/цино до зв'язування C1q (наприклад, за допомогою мутації, делеції в Fc-області або усунення Fc-області, або за допомогою модифікації частини антитіла анти-TfR людини/цино іншої, ніж Fc частина), або за допомогою пригнічення іншим способом активування або активності системи комплементу (наприклад, за допомогою спільного введення одного або декількох інгібіторів активування шляху комплементу або активності шляху комплементу).

При зв'язуванні антитіла анти-TfR людини/цино з TfR людини або цино на ретикулоцитах або на інших типах клітин, які експресують високі рівні TfR, запускається їхнє збідніння, як для антитіл анти-TfR людини/цино, ілюстрованих у даному документі, зменшення зв'язування антитіл з TfR людини або цино на ретикулоцитах або на інших типах клітин повинно, у свою чергу, зменшити величину збідніння ретикулоцитів або інших типів клітин у циркуляції або в кістковому мозку, що спостерігається при введенні антитіла. Спорідненість антитіла анти-TfR людини/цино до TfR приматів або людини може модифікуватися з використанням будь-якого зі способів, описаних у даному документі, і як показано в Прикладах.

Зменшення кількості антитіла анти-TfR людини/цино, що присутнє у плазмі крові, для зменшення експонування популяції ретикулоцитів для потенційно шкідливих концентрацій антитіла, може здійснюватися декількома способами. Один зі способів полягає просто в зменшенні кількості антитіла, що дозується, потенційно, у цей же час, збільшуючи також частоту дозування, так що максимальна концентрація в плазмі знижується, але підтримується рівень у сироватці, достатній для ефективності, що у той же час, як і раніше, знаходиться нижче порогу побічного впливу збідніння клітин. Інший спосіб, що може поєднуватися з модифікаціями дозування, полягає у виборі або одержанні за допомогою генної інженерії антитіла анти-TfR, що має pH-чутливе зв'язування з TfR, так що воно зв'язується з TfR на поверхні клітин у плазмі крові при pH 7,4 при бажаній низькій спорідненості, як описано в даному документі, але при інтерналізації в ендосомальному компартменті, таке зв'язування з TfR швидко і значно зменшується при відносно більш низькому pH цього компартмента (pH 5,5-6,0). Така дисоціація може захистити антитіло від виведення, опосередковуваного антигеном, або підвищити кількість антитіла, що або доставляється в CNS, або рециклюється назад через BBB, - у будь-якому випадку, ефективна концентрація антитіла збільшується порівняно з антитілом анти-TfR, що не має такої pH-чутливості, без збільшення дози антитіла, що вводиться, і у свою чергу, потенційно дозволяє понизити дозу антитіла при одночасному зниженні ризику побічних впливів.

Захист, стабілізація і/або заповнення популяції ретикулоцитів може здійснюватися з використанням фармацевтичних або фізичних способів. На додаток до антитіла анти-TfR людини/цино разом з ним може вводитися щонайменше один додатковий терапевтичний агент (одночасно або послідовно), що ослаблює негативні побічні впливи антитіла на популяції ретикулоцитів. Приклади таких терапевтичних агентів включають, але не обмежуючись цим, еритропоетин (EPO), добавки, що містять залізо, вітамін C, фолієву кислоту і вітамін B12. Фізична заміна еритроцитів (тобто ретикулоцитів) є також можливою, наприклад, за допомогою трансфузії за допомогою подібних клітин, що можуть походити від іншого індивідуума з подібним типом крові або можуть попередньо витягатися із суб'єкта, якому вводили антитіло анти-TfR людини/цино.

Фахівець у даній галузі побачить, що будь-яке сполучення згаданих вище способів можна використовувати для одержання за допомогою генної інженерії антитіла (і/або режиму його дозування) з оптимальним балансом між (i) бажаною низькою спорідненістю до TfR приматів або людини, що буде доводити до максимуму перенесення антитіла і будь-яких кон'югованих

сполук у CNS; (ii) спорідненістю кон'югованої сполуки (включаючи, як необмежувальний приклад, другу або додаткову специфічність зв'язування антигену в антитіла анти-TfR людини/цино) до його антигену в CNS, оскільки це важливо для тієї кількості сполуки, що повинна бути присутньою у CNS для одержання терапевтичного впливу; (iii) швидкістю виведення антитіла анти-TfR людини/цино; (iv) лабільністю анти-TfR/кон'югованої сполуки при низьких pH для полегшення вивільнення кон'югованої сполуки на стороні CNS/головного мозку BBB і (v) впливом на популяції ретикулоцитів.

Також буде ясно, що вплив збідніння ретикулоцитів, що спостерігається в даному документі, для введення антитіла анти-TfR, може бути корисним при лікуванні будь-якого захворювання або розладу, де проблема полягає у надпроліферації ретикулоцитів. Наприклад, при уродженій поліцитемії або при справжній неопластичній поліцитемії підвищені кількості еритроцитів через гіперпроліферацію, наприклад, ретикулоцитів, дають у результаті загущення крові і супутні фізіологічні симптоми. Введення антитіла анти-TfR людини/цино за даним винаходом, де ефекторна функція антитіла консервується щонайменше частково, зробило б можливим селективне видалення популяції незрілих ретикулоцитів без впливу на нормальне перенесення трансферину в CNS. Дозування такого антитіла може модулюватися таким чином, що гострі клінічні симптоми могли б зводитися до мінімуму (наприклад, за допомогою дозування при дуже низькій дозі або через великі часові інтервали), як добре розуміють у даній галузі.

Антитіла анти-TfR/BACE1 і анти-TfR/Abeta, кожне, являють собою обіцяючі і нові терапевтичні кандидати для лікування хвороби Альцгеймера. Крім того, технологія біспецифічного націлювання на основі перенесення, опосередковуваного рецепторами (RMT), відкриває двері для широкого діапазону потенційних терапевтичних препаратів проти захворювань CNS. Даний винахід пропонує способи одержання за допомогою генної інженерії терапевтичних препаратів, які проникають через BBB, що значно поліпшують перенесення через BBB і розподіл у CNS терапевтичних препаратів без збідніння ретикулоцитів.

Відповідно, у першому варіанті здійснення, даний винахід пропонує ізольоване антитіло, яке зв'язується з рецептором трансферину людини (TfR) і TfR приматів, де антитіло не інгібує зв'язування трансферину з TfR. В одному з аспектів, зв'язування являє собою специфічне зв'язування. В іншому аспекті, антитіло, крім того, не інгібує зв'язування білка гемахроматозу людини ("HFE") з TfR. В одному з аспектів, зв'язування являє собою специфічне зв'язування. В одному з аспектів, антитіло являє собою моноклональне антитіло. В іншому аспекті, антитіло являє собою антитіло людини. В іншому аспекті, антитіло являє собою гуманізоване антитіло. В іншому аспекті, антитіло являє собою химерне антитіло. В іншому аспекті, антитіло являє собою фрагмент антитіла, який зв'язує TfR людини і TfR приматів. В іншому аспекті, TfR приматів походить від мавп циномолгус.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:31, 33 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:36, 38 і 39. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:36, 40 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:42, 43 і 44. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:31, 33 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:46, 48 і 49. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:52, 54 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:52, 58 і 59. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:62, 63 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:52, 65 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:68, 69 і 70. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:73, 75 і 76. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:79, 81 і 82. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить

HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:79, 83 і 84. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:87, 89 і 90. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:93, 95 і 96 в іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:99, 101 і 102. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:127, 33 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:52, 156 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:52, 157 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:155, 54 і 55.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:32, 33 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:37, 38 і 39. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:32, 40 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:37, 43 і 44. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:32, 33 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:47, 48 і 49. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 54 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 58 і 59. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 63 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 65 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 69 і 70. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:74, 75 і 76. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:80, 81 і 82. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:80, 83 і 84. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:88, 89 і 90. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:94, 95 і 96. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:100, 101 і 102. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 156 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 157 і 55.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:29, 30 і 31. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:35, 30 і 36. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:41, 30 і 42. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:29, 30 і 31. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності

амінокислот SEQ ID NO:45, 30 і 46. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:50, 51 і 52. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:56, 57 і 52. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:60, 61 і 62. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:60, 64 і 52. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:66, 67 і 68. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:71, 72 і 73. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:77, 78 і 79. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:85, 86 і 87. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:91, 92 і 93. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:97, 98 і 99. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:29, 30 і 127. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:50, 51 і 155.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:29, 30 і 31 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:32, 33 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:35, 30 і 36 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:37, 38 і 39. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:35, 30 і 36 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:32, 40 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:41, 30 і 42 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:37, 43 і 44. В іншому аспекті розглянутого вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:29, 30 і 31 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:32, 33 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:45, 30 і 46 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:47, 48 і 49. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:50, 51 і 52 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 54 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:56, 57 і 52 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 58 і 59. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:60, 61 і 62 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 63 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:60, 64 і 52 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 65 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:66, 67 і 68 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 69 і 70. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:71, 72 і 73 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:74, 75 і 76. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3,

відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:77, 78 і 79 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:80, 81 і 82. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:77, 78 і 79, і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:80, 83 і 84. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:85, 86 і 87 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:88, 89 і 90. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:91, 92 і 93 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:94, 95 і 96. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:97, 98 і 99 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:100, 101 і 102. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:29, 30 і 127 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:32, 33 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:50, 51 і 52 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 156 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:50, 51 і 52 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 157 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:50, 51 і 155 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 54 і 55.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить щонайменше одну послідовність HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 або HVR-L3, вибрану з групи послідовностей, що складається з послідовності HVR-H1, SEQ ID NO:47, 53 або 100; послідовності HVR-H2, SEQ ID NO:48, 69, 101, 156 або 157; послідовності HVR-H3, SEQ ID NO:49, 76 або 102; послідовності HVR-L1, SEQ ID NO:45, 66 або 97; послідовності HVR-L2, SEQ ID NO:30, 67 або 98; і послідовності HVR-L3, SEQ ID NO:46, 68 або 102.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить (a) послідовність VH, що має щонайменше 95 % ідентичність послідовностей амінокислот з SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 15, 16, 17, 18, 20, 25, 26, 27, 28, 108, 114, 120, 126, 153 або 154; (b) послідовність VL, що має, щонайменше, 95 % ідентичність послідовностей амінокислот з SEQ ID NO:4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 19, 21, 22, 23, 24, 105, 111, 117, 123 або 151; або (c) послідовність VH як у (a) і послідовність VL як у (b). В одному з таких аспектів, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:4 і послідовність VH, SEQ ID NO:7. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:5 і послідовність VH, SEQ ID NO:8. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:5 і послідовність VH, SEQ ID NO:9. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:6 і послідовність VH, SEQ ID NO:10. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:11 і послідовність VH, SEQ ID NO:15. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:12 і послідовність VH, SEQ ID NO:16. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:13 і послідовність VH, SEQ ID NO:17. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:14 і послідовність VH, SEQ ID NO:18. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:19 і послідовність VH, SEQ ID NO:20, В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:21 і послідовність VH, SEQ ID NO:25. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:22 і послідовність VH, SEQ ID NO:26. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:23 і послідовність VH, SEQ ID NO:27. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:24 і послідовність VH, SEQ ID NO:28. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:105 і послідовність VH, SEQ ID NO:108. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:111 і послідовність VH, SEQ ID NO:114. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:117 і послідовність VH, SEQ ID NO:120. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:123 і послідовність VH, SEQ ID NO:126. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:105 і послідовність VH, SEQ ID NO:153. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:105 і послідовність VH, SEQ ID NO:154. В іншому

такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:151 і послідовність VH, SEQ ID NO:108. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VH (a) SEQ ID NO:108, (b) SEQ ID NO:114, (c) SEQ ID NO:120 або (d) SEQ ID NO:126. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL (a) SEQ ID NO:105, (b) SEQ ID NO:111, (c) SEQ ID NO:117 або (d) SEQ ID NO:123.

В одному з аспектів варіанта здійснення розглянутого вище, антитіло вибирають із групи, яка складається з антитіла 7A4, 8A2, 15D2, 10D11, 7B10, 15G11, 16G5, 13C3, 16G4, 16F6, 7G7, 4C2, 1B12 і 13D4. В одному з таких аспектів, антитіло являє собою 7A4. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 8A2. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15D2. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 10D11. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7B10. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16G5. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 13C3. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16G4. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16F6. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7G7. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 4C2. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 1B12. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 13D4.

В одному аспекті з будь-яких аспектів, згаданих вище, антитіло крім того, має дозрілу спорідненість. В одному з таких аспектів, антитіло вибирають із групи, яка складається з 15G11.v1, 15G11.v2, 15G11.V3, 15G11.V4, 15G11.v5, 7A4.v1; 7A4.v2, 7A4.v3, 7A4.v4, 7A4.v5, 7A4.v6, 7A4.v7, 7A4.v8, 7A4.v9, 7A4.v10, 7A4.v11, 7A4.v12, 7A4.v13, 7A4.v14, 7A4.v15, 7G7.v1, 16F6.v1, 16F6.v2, 16F6.v3, 16F6.v4, 15G11.N52A, 15G11.T53A і 15G11.W92A. В одному з таких аспектів, антитіло являє собою 15G11.v1. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11.v2. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11.v3. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11.v4. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11.v5. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v1. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v2. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v3. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v4. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v5. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v6. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v7. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v8. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v9. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v10, В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v11. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v12. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v13. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v14. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v15. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7G7.v1. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16F6.v1. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16F6.v2. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16F6.v3. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16F6.v4. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11.N52A. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11.T53A. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11.W92A.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло модифікується в одному або декількох положеннях амінокислот у VH або VL до амінокислоти, показаної для цього положення на Фігурах 4E-1 і 4E-2. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить послідовність або одну або кілька послідовностей HVR, що відповідають послідовностям однієї або декількох HVR, наведених для будь-якого з клонів на Фігурах 3 і 4 і на Фігурах 4E-1 і 4E-2. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить послідовність VH або VL, що відповідає послідовності, наведеній для будь-якого з клонів на Фігурах 3 і 4 і Фігурах 4E-1 і 4E-2. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить одну або кілька послідовностей HVR, що відповідають одній або декільком послідовностям, наведеним вище, для будь-якого з клонів на Фігурах 3 і 4 і Фігурах 4E-1 і 4E-2.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло зв'язане з терапевтичною сполукою. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло зв'язане з агентом для одержання зображень або міткою. В одному з таких аспектів, антитіло являє собою мультиспецифічне антитіло, і терапевтична сполука необов'язкова утворює одну з частин мультиспецифічного антитіла. В одному з таких аспектів, мультиспецифічне антитіло містить перший сайт зв'язування антигену, що зв'язує TfR, і другий сайт зв'язування антигену, що зв'язує антиген головного мозку. В одному з таких аспектів, антиген головного мозку вибирається з групи, яка складається з: бета-секретази 1 (BACE1), Abeta, рецептора епідермального фактора росту (EGFR), рецептора 2 епідермального фактора росту людини (HER2), тау, аполіпопротеїну E (ApoE), альфа-синуклеїну, CD20, хантингтину, пріонного білка (PrP), збагаченої лейциновими повторами кінази 2 (LRRK2), паркіну, презеніліну 1, презеніліну

2, гамма-секретази, рецептора загибелі 6 (DR6), білка-попередника амілоїду (APP), рецептора p75 нейротрофіну (p75NTR) і каспази 6. В іншому такому аспекті, мультиспецифічне антитіло зв'язується як з TfR, так і з BACE1. В іншому такому аспекті, мультиспецифічне антитіло зв'язується як з TfR, так і з Abeta. В іншому такому аспекті, терапевтична сполука являє собою лікарський засіб проти неврологічного розладу.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, даний винахід пропонує ізольовану нуклеїнову кислоту, що кодує будь-яке зі згаданих вище антитіл. В іншому аспекті, даний винахід пропонує клітину-хазяїна, що містить таку нуклеїнову кислоту. В іншому аспекті, даний винахід пропонує спосіб продукування будь-якого зі згаданих вище антитіл, який включає культивування такої клітини-хазяїна, що продукує антитіло, і який необов'язково додатково включає витягнення антитіла з клітини-хазяїна.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, даний винахід пропонує фармацевтичний препарат, який містить будь-яке зі згаданих вище антитіл і фармацевтично прийнятний носій.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, даний винахід пропонує будь-яке зі згаданих вище антитіл для застосування як лікарського препарату. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, даний винахід пропонує застосування будь-якого зі згаданих вище антитіл при виробництві лікарського препарату для лікування неврологічного розладу. В одному з таких аспектів, неврологічний розлад вибирається з групи, яка складається з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, розладу очного захворювання, епілептичного розладу, лізосомної хвороби нагромадження, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, розладу поведінки і запалення CNS.

В іншому аспекті розглянутого вище варіанта здійснення, даний винахід пропонує будь-яке зі згаданих вище антитіл для застосування при лікуванні неврологічного розладу. В одному з таких аспектів, неврологічний розлад вибирається з групи, яка складається з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, розладу очного захворювання, епілептичного розладу, лізосомної хвороби нагромадження, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, розладу поведінки і запалення CNS.

В іншому аспекті розглянутого вище варіанта здійснення, даний винахід пропонує будь-яке зі згаданих вище антитіл для застосування при перенесенні однієї або декількох сполук через BBB. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, пропонується застосування будь-якого зі згаданих вище антитіл при виробництві лікарського препарату для перенесення однієї або декількох сполук через BBB.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, пропонується спосіб перенесення сполуки через BBB суб'єкта, що включає експонування будь-якого зі згаданих вище антитіл для BBB таким чином, що антитіло переносить сполуку, зв’язану з ним, через BBB. В іншому такому аспекті, BBB стосується суб’єкта-людини. В іншому такому аспекті, величина дози і/або частота введення модулюється для зменшення концентрації антитіл, для якої експонуються еритроцити. В іншому такому аспекті, спосіб додатково включає стадію моніторингу суб'єкта відносно збідніння еритроцитів. В іншому такому аспекті, антитіло, зв'язане зі сполукою, вводиться в терапевтичній дозі. В одному з таких аспектів, терапевтична доза є TfR-насичувальною. В іншому такому аспекті, введення антитіла здійснюється в дозі і/або частоті дозування, каліброваній для зведення до мінімуму гострих клінічних симптомів від введення антитіла.

В іншому аспекті розглянутого вище варіанта здійснення, пропонується спосіб збільшення експонування CNS суб'єкта для сполуки, що включає експонування будь-якого зі згаданих вище антитіл для BBB таким чином, що антитіло переносить сполуку, зв'язану з ним, через BBB. В іншому такому аспекті, BBB стосується суб'єкта-людини. В іншому такому аспекті, величина дози і/або частота введення модулюється для зменшення концентрації антитіла, для якого експонуються еритроцити. В іншому такому аспекті, спосіб додатково включає стадію моніторингу суб'єкта відносно збідніння еритроцитів. В іншому такому аспекті, антитіло, зв'язане зі сполукою, вводиться в терапевтичній дозі. В одному з таких аспектів, терапевтична доза є TfR-насичувальною. В іншому такому аспекті, введення антитіла здійснюється в дозі і/або частоті дози, каліброваній для зведення до мінімуму гострих клінічних симптомів від введення антитіла.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, пропонується спосіб підвищення утримання в CNS сполуки, що вводиться суб'єкту, що включає експонування будь-якого зі згаданих вище антитіл для BBB таким чином, що утримання сполуки в CNS збільшується. В іншому такому аспекті, BBB стосується суб’єкта-людини. В іншому такому аспекті, величина дози і/або частота введення модулюється для зменшення концентрації антитіла, для якого

експонуються еритроцити. В іншому такому аспекті, спосіб додатково включає стадію моніторингу суб'єкта відносно збідніння еритроцитів. В іншому такому аспекті, антитіло, зв'язане зі сполукою, вводиться в терапевтичній дозі. В одному з таких аспектів, терапевтична доза є TfR-насичувальною. В іншому такому аспекті, введення антитіла здійснюється в дозі і/або частоті дози, каліброваній для зведення до мінімуму гострих клінічних симптомів від введення антитіла.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, пропонується спосіб лікування неврологічного розладу в ссавця, що включає лікування ссавця за допомогою будь-якого зі згаданих вище антитіл. В одному з таких аспектів, неврологічний розлад вибирається з групи, яка складається з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, розладу очного захворювання, епілептичного розладу, лізосомної хвороби нагромадження, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, розладу поведінки і запалення CNS. В іншому такому аспекті, неврологічний розлад стосується суб’єкта-людини. В іншому такому аспекті, величина дози і/або частота введення модулюється для зменшення концентрація антитіла, для якого експонуються еритроцити. В іншому такому аспекті, спосіб додатково включає стадію моніторингу суб'єкта відносно збідніння еритроцитів. В іншому такому аспекті, антитіло, зв'язане зі сполукою, вводиться в терапевтичній дозі. В одному з таких аспектів, терапевтична доза є TfR-насичувальною. В іншому такому аспекті, введення антитіла здійснюється в дозі і/або частоті дози, каліброваній для зведення до мінімуму гострих клінічних симптомів від введення антитіла.

В інших варіантах здійснення, даний винахід пропонує ізольоване антитіло, що зв'язується з TfR людини і TfR приматів, де антитіло не інгібує зв'язування трансферину з TfR, і де одна або кілька властивостей антитіла модифікуються для зменшення або усунення впливу антитіла на ретикулоцити і/або для зменшення важкості або присутності гострих клінічних симптомів у суб’єкта або ссавця, якого лікують за допомогою антитіла. В одному з аспектів, зв'язування являє собою специфічне зв'язування. В іншому аспекті, антитіло, крім того, не інгібує зв'язування HFE з TfR. В одному з аспектів, антитіло являє собою моноклональне антитіло. В іншому аспекті, антитіло являє собою антитіло людини. В іншому аспекті, антитіло являє собою гуманізоване антитіло. В іншому аспекті, антитіло являє собою химерне антитіло. В іншому аспекті, антитіло являє собою фрагмент антитіла, що зв'язує TfR людини і TfR примата. В іншому аспекті, TfR примата походить від мавпи циномолгус.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:31, 33 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:36, 38 і 39. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:36, 40 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:42, 43 і 44. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:31, 33 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:46, 48 і 49. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:52, 54 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:52, 58 і 59. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:62, 63 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:52, 65 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:68, 69 і 70, В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:73, 75 і 76. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:79, 81 і 82. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:79, 83 і 84. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:87, 89 і 90. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3,

відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:93, 95 і 96. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:99, 101 і 102. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L3, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:127, 33 і 34.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:32, 33 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:37, 38 і 39. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:32, 40 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:37, 43 і 44. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:32, 33 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:47, 48 і 49. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 54 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 58 і 59. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 63 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 65 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:3, 69 і 70, В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:74, 75 і 76. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:80, 81 і 82. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:80, 83 і 84. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:88, 89 і 90. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:94, 95 і 96. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:100, 101 і 102.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:29, 30 і 31. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:35, 30 і 36. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:41, 30 і 42. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:29, 30 і 31. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:45, 30 і 46. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:50, 51 і 52. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:56, 57 і 52. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:60, 61 і 62. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:60, 64 і 52. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:66, 67 і 68. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:71, 72 і 73. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:77, 78 і 79. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення,

антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:85, 86 і 87. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:91, 92 і 93. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:97, 98 і 99. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:29, 30 і 127.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:29, 30 і 31 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:32, 33 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:35, 30 і 36 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:37, 38 і 39. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:35, 30 і 36 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:32, 40 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:41, 30 і 42 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:37, 43 і 44. В іншому аспекті розглянутого вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:29, 30 і 31 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:32, 33 і 34. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:45, 30 і 46 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:47, 48 і 49. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:50, 51 і 52 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 54 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:56, 57 і 52 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 58 і 59. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:60, 61 і 62 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 63 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:60, 64 і 52 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 65 і 55. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:66, 67 і 68 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:53, 69 і 70. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:71, 72 і 73 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:74, 75 і 76. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:77, 78 і 79 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:80, 81 і 82. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:77, 78 і 79, і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:80, 83 і 84. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:85, 86 і 87 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:88, 89 і 90. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:91, 92 і 93 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:94, 95 і 96. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:97, 98 і 99 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:100, 101 і 102. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3,

відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:29, 30 і 127 і HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, відповідно, що містять послідовності амінокислот SEQ ID NO:32, 33 і 34.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить щонайменше одну послідовність з HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 або HVR-L3, вибрану з групи послідовностей, що складається з послідовності HVR-H1 SEQ ID NO:47, 53 або 100; послідовності HVR-H2 SEQ ID NO:48, 69 або 101; послідовності HVR-H3 SEQ ID NO:49, 76 або 102; послідовності HVR-L1 SEQ ID NO:45, 66 або 97; послідовності HVR-L2 SEQ ID NO:30, 67 або 98 і послідовності HVR-L3 SEQ ID NO:46, 68 або 102.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить (a) послідовність VH, що має щонайменше 95 % ідентичність послідовностей амінокислот з SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 15, 16, 17, 18, 20, 25, 26, 27, 28, 108, 114, 120 або 126; (b) послідовність VL, що має щонайменше 95 % ідентичність послідовностей амінокислот з SEQ ID NO:4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 19, 21, 22, 23, 24, 105, 111, 117 або 123; або (c) послідовність VH як у (a) і послідовність VL як у (b). В одному з таких аспектів, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:4 і послідовність VH, SEQ ID NO:7. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:5 і послідовність VH, SEQ ID NO:8. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:5 і послідовність VH, SEQ ID NO:9. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:6 і послідовність VH, SEQ ID NO:10. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:11 і послідовність VH, SEQ ID NO:15. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:12 і послідовність VH, SEQ ID NO:16. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:13 і послідовність VH, SEQ ID NO:17. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:14 і послідовність VH, SEQ ID NO:18. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:19 і послідовність VH, SEQ ID NO:20, В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:21 і послідовність VH, SEQ ID NO:25. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:22 і послідовність VH, SEQ ID NO:26. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:23 і послідовність VH, SEQ ID NO:27. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:24 і послідовність VH, SEQ ID NO:28. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:105 і послідовність VH, SEQ ID NO:108. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:111 і послідовність VH, SEQ ID NO:114. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:1 17 і послідовність VH, SEQ ID NO:120. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL, SEQ ID NO:123 і послідовність VH, SEQ ID NO:126. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VH з (a) SEQ ID NO:108, (b) SEQ ID NO:114, (c) SEQ ID NO:120 або (d) SEQ ID NO:126. В іншому такому аспекті, антитіло містить послідовність VL з (a) SEQ ID NO:105, (b) SEQ ID NO:111, (c) SEQ ID NO:117 або (d) SEQ ID NO:123.

В одному з аспектів варіанта здійснення вище, антитіло вибирають із групи, яка складається з антитіла 7A4, 8A2, 15D2, 10D11, 7B10, 15G11, 16G5, 13C3, 16G4, 16F6, 7G7, 4C2, 1B12 і 13D4. В одному з таких аспектів, антитіло являє собою 7A4. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 8A2. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15D2. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 10D11. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7B10, В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16G5. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 13C3. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16G4. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16F6. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7G7. В іншому такому аспекті, антитіло is 4C2. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 1B12. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 13D4.

В одному аспекті з будь-якого з аспектів, згаданих вище, антитіло, крім того, має дозрілу спорідненість. В одному з таких аспектів, антитіло вибирають із групи, яка складається з 15G11.v1, 15G11.v2, 15G11.V3, 15G11.V4, 15G11.v5, 7A4.v1; 7A4.v2, 7A4.v3, 7A4.v4, 7A4.v5, 7A4.v6, 7A4.v7, 7A4.v8, 7A4.v9, 7A4.v10, 7A4.v11, 7A4.v12, 7A4.v13, 7A4.v14, 7A4.v15, 7G7.v1, 16F6.v1, 16F6.v2, 16F6.v3 і 16F6.v4. В одному з таких аспектів, антитіло являє собою 15G11.v1. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11.v2. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11.v3. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11.v4. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11.v5. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v1. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v2. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v3. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v4. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v5. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v6. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v7. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v8. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v9. В іншому

такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v10, В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v11. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v12. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v13. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v14. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7A4.v15. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 7G7.v1. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16F6.v1. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16F6.v2. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16F6.v3. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16F6.v4. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11.N52A. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16F6.v4. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11.T53A. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16F6.v4. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 15G11.W92A. В іншому такому аспекті, антитіло являє собою 16F6.v4.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло модифікується в одному або декількох положеннях амінокислот у VH або VL до амінокислоти, показаної для цього положення на Фігурах 4E-1 і 4E-2. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить послідовність або одну або кілька послідовностей HVR, що відповідають послідовностям однієї або декількох HVR, наведених для будь-якого з клонів на Фігурах 3 і 4 і на Фігурах 4E-1 і 4E-2. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить послідовність VH або VL відповідних послідовностям, наведеним для будь-якого з клонів на Фігурах 3 і 4 і Фігурах 4E-1 і 4E-2. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло містить одну або кілька послідовностей HVR, що відповідають одній або декільком послідовностям, наведеним для будь-якого з клонів на Фігурах 3 і 4 і Фігурах 4E-1 і 4E-2.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, одну або кілька властивостей антитіла вибирають з ефекторної функції Fc-області антитіла, функції активування комплементу антитіла і спорідненості антитіла до TfR. В одному з таких аспектів, властивість являє собою ефекторну функцію в Fc-області антитіла. В іншому такому аспекті, властивість являє собою функцію активування комплементу антитіла. В іншому такому аспекті, властивість являє собою спорідненість антитіла до TfR. В одному з таких аспектів, ефекторна функція або функція активування комплементу зменшується або усувається відносно антитіла дикого типу такого ж ізотипу. В одному з аспектів, ефекторна функція зменшується або усувається за допомогою способу, вибраного зі зниження глікозилування антитіла, модифікації ізотипу антитіла до ізотипу, що має природним способом зменшену або усунуту ефекторну функцію, і модифікації Fc-області.

В одному з таких аспектів, ефекторна функція зменшується або усувається за допомогою зниження глікозилування антитіла. В одному з таких аспектів, глікозилування антитіла зменшується за допомогою способу, вибраного із: продукування антитіла в навколишньому середовищі, що не дає можливості для глікозилування дикого типу; видалення вуглеводних груп, що вже є присутніми на антитілі; і модифікації антитіла таким чином, що глікозилування дикого типу не здійснюється. В одному з таких аспектів, глікозилування антитіла зменшується за допомогою продукування антитіла в навколишньому середовищі, що не дає можливості для глікозилування дикого типу, такого як продукування в системі продукування клітин типу, відмінного від ссавців, або коли антитіло продукується синтетично. В одному з таких аспектів, антитіло продукується в системі продукування клітин, відмінній від ссавців. В іншому такому аспекті, антитіло продукується синтетично. В іншому такому аспекті, глікозилування антитіла зменшується за допомогою модифікації антитіла таким чином, що глікозилування дикого типу не здійснюється, наприклад, де Fc-область антитіла містить мутацію в положенні 297, так що аспарагіновий залишок дикого типу в цьому положенні замінений іншою амінокислотою, яка негативно впливає на глікозилування в цьому положенні.

В іншому такому аспекті, ефекторна функція зменшується або усувається за допомогою щонайменше однієї модифікації Fc-області. В одному з таких аспектів, ефекторна функція або функція активування комплементу зменшується або усувається за допомогою делеції всієї Fc-області або її частини, або за допомогою одержання за допомогою генної інженерії такого антитіла, що воно не містить Fc-області або відмінної від Fc-області, яка конкурує за ефекторну функцію або за функцію активування комплементу. В іншому такому аспекті щонайменше одна модифікація Fc-області вибирається з: точкової мутації Fc-області для ослаблення зв'язування з одним або декількома Fc-рецепторами, вибраної з наступних положень: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 і 439; точкової мутації Fc-області для ослаблення зв'язування з C1q, вибраної з наступних положень: 270, 322, 329 і 321; усунення деякої частини або всієї Fc-області і точкової мутації в положенні

132 домену CH1. В одному з таких аспектів, модифікація являє собою точкову мутацію Fc-області для ослаблення зв'язування з C1q, вибраної з наступних положень: 270, 322, 329 і 321. В іншому такому аспекті, модифікація являє собою усунення деякої частини або всієї Fc-області. В іншому такому аспекті, функція активування комплементу зменшується або усувається за допомогою делеції всієї Fc-області або її частини, або за допомогою одержання за допомогою генної інженерії такого антитіла, що воно не включає Fc-області, яка залучена в шлях комплементу. В одному з таких аспектів, антитіло вибирається з Fab або одноланцюжкового антитіла. В іншому такому аспекті, відмінна від Fc область антитіла модифікується для зменшення або усунення активування шляху комплементу за допомогою антитіла. В одному з таких аспектів, модифікація являє собою точкову мутацію області CH1 для ослаблення зв'язування з C3. В одному з таких аспектів, точкова мутація знаходиться в положенні 132 (дивися, наприклад, Vidarte et al., (2001) J. Biol. Chem. 276(41):38217-38223).

В одному з аспектів, час напівжиття антитіла підвищується за допомогою модифікації в області зв'язування FcRn. В одному з аспектів, модифікація являє собою заміщення амінокислоти, вибране з наступних положень: 251, 256, 285, 290, 308, 314, 385, 389, 428, 434, 436, 238, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434. В одному з аспектів модифікація являє собою заміщення, вибране з наступних: M252Y, S254T, T256E, N434A і Y436I.

В одному з аспектів, антитіло поєднують із додатковою сполукою, яка ослаблює або робить внесок у зменшення впливу на рівні ретикулоцитів або на гострі клінічні симптоми. В одному з таких аспектів, додаткова сполука захищає ретикулоцити від зв'язаного з антитілом збідніння або підтримує ріст, розвиток або заповнення ретикулоцитів. В іншому такому аспекті, додаткова сполука вибирається з еритропоетину (EPO), добавки, що містить залізо, вітаміну C, фолієвої кислоти і вітаміну B12 або еритроцитів або ретикулоцитів.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, спорідненість антитіла до TfR зменшується, як вимірювано відносно антитіла дикого типу того ж ізотипу, що не має зниженої спорідненості до TfR. В одному з таких аспектів, антитіло має KD або IC50 відносно TfR приблизно від 1 пМ приблизно до 100 мкМ. В іншому аспекті, величина дози і/або частота введення антитіла модулюється для зменшення концентрації антитіла, для якого експонуються еритроцити.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло зв'язується з терапевтичною сполукою. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, антитіло зв'язується з агентом для одержання зображень або з міткою. В одному з таких аспектів, антитіло являє собою мультиспецифічне антитіло, і терапевтична сполука необов'язкова утворює одну з частин мультиспецифічного антитіла. В одному з таких аспектів, мультиспецифічне антитіло містить перший сайт зв'язування антигену, що зв'язує TfR, і другий сайт зв'язування антигену, що зв'язує антиген головного мозку. В одному з таких аспектів, антиген головного мозку вибирають із групи, яка складається з: бета-секретази 1 (BACE1), Abeta, епідермального фактора росту рецептора (EGFR), рецептора 2 епідермального фактора росту людини (HER2), тау, аполіпопротеїну E (ApoE), альфа-синуклеїну, CD20, хантингтину, пріонного білки (PrP), збагаченої лейциновими повторами кінази 2 (LRRK2), паркіну, презеніліну 1, презеніліну 2, гамма-секретази, рецептора загибелі 6 (DR6), білка-попередника амілоїду (APP), рецептора нейротропіну p75 (p75NTR) і каспази 6. В іншому такому аспекті, мультиспецифічне антитіло зв'язується як з TfR, так і з BACE1. В іншому такому аспекті, мультиспецифічне антитіло зв'язується як з TfR, так і з Abeta. В іншому такому аспекті, терапевтична сполука являє собою лікарський засіб проти неврологічного розладу.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, даний винахід пропонує ізольовану нуклеїнову кислоту, що кодує будь-яке зі згаданих вище антитіл. В іншому аспекті, даний винахід пропонує клітину-хазяїна, що містить таку нуклеїнову кислоту. В іншому аспекті, даний винахід пропонує спосіб продукування будь-якого зі згаданих вище антитіл, який включає культивування такої клітини-хазяїна таким чином, що продукується антитіло, і який необов'язково додатково включає витягнення антитіла з клітини-хазяїна.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, даний винахід пропонує фармацевтичний препарат, який містить будь-яке зі згаданих вище антитіл і фармацевтично прийнятний носій.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, даний винахід пропонує будь-яке зі згаданих вище антитіл для застосування як лікарського препарату. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, даний винахід пропонує застосування будь-якого зі згаданих вище антитіл при виробництві лікарського препарату для лікування неврологічного розладу. В одному з таких аспектів, неврологічний розлад вибирається з групи, яка складається

з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, розладу очного захворювання, епілептичного розладу, лізосомної хвороби нагромадження, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, розладу поведінки і запалення CNS.

В іншому аспекті розглянутого вище варіанта здійснення, даний винахід пропонує будь-яке зі згаданих вище антитіл для застосування при лікуванні неврологічного розладу. В одному з таких аспектів, неврологічний розлад вибирається з групи, яка складається з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, розладу очного захворювання, епілептичного розладу, лізосомної хвороби нагромадження, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, розладу поведінки і запалення CNS.

В іншому аспекті розглянутого вище варіанта здійснення, даний винахід пропонує будь-яке зі згаданих вище антитіл для застосування з метою перенесення однієї або декількох сполук через BBB. В іншому аспекті зазначеного вище варіанта здійснення, пропонується застосування будь-якого зі згаданих вище антитіл при виробництві лікарського препарату для перенесення однієї або декількох сполук через BBB.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, пропонується спосіб перенесення сполуки через BBB у суб'єкта, що включає експонування будь-якого зі згаданих вище антитіл для BBB таким чином, що антитіло переносить сполуку, зв’язану з ним, через BBB. В іншому такому аспекті, BBB стосується суб'єкта-людини. В іншому такому аспекті, величина дози і/або частота введення модулюється для зменшення концентрації антитіла, для якого експонуються еритроцити. В іншому такому аспекті, спосіб додатково включає стадію моніторингу суб'єкта відносно збідніння еритроцитів. В іншому такому аспекті, антитіло, зв'язане зі сполукою, вводиться в терапевтичній дозі. В одному з таких аспектів, терапевтична доза є TfR-насичувальною. В іншому такому аспекті, введення антитіла здійснюється в дозі і/або частоті дози, каліброваній для зведення до мінімуму гострих клінічних симптомів від введення антитіла.

В іншому аспекті розглянутого вище варіанта здійснення, пропонується спосіб збільшення експонування CNS суб'єкта для сполуки, що включає експонування будь-якого зі згаданих вище антитіл для BBB таким чином, що антитіло переносить сполуку, зв’язану з ним, через BBB. В іншому такому аспекті, BBB стосується суб’єкта-людини. В іншому такому аспекті, величина дози і/або частота введення модулюється для зменшення концентрації антитіла, для якого експонуються еритроцити. В іншому такому аспекті, спосіб додатково включає стадію моніторингу суб'єкта відносно збідніння еритроцитів. В іншому такому аспекті, антитіло, зв'язане зі сполукою, вводиться в терапевтичній дозі. В одному з таких аспектів, терапевтична доза є TfR-насичувальною. В іншому такому аспекті, введення антитіла здійснюється в дозі і/або частоті дози, каліброваній для зведення до мінімуму гострих клінічних симптомів від введення антитіла.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, пропонується спосіб збільшення утримання в CNS сполуки, що вводиться суб'єкту, що включає експонування будь-якого зі згаданих вище антитіл для BBB таким чином, що утримання в CNS сполуки збільшується. В іншому такому аспекті, BBB стосується суб’єкта-людини. В іншому такому аспекті, величина дози і/або частота введення модулюється для зменшення концентрації антитіла, для якого експонуються еритроцити. В іншому такому аспекті, спосіб додатково включає стадію моніторингу суб'єкта відносно збідніння еритроцитів. В іншому такому аспекті, антитіло, зв'язане зі сполукою, вводиться в терапевтичній дозі. В одному з таких аспектів, терапевтична доза є TfR-насичувальною. В іншому такому аспекті, введення антитіла здійснюється в дозі і/або частоті дози, каліброваній для зведення до мінімуму гострих клінічних симптомів від введення антитіла.

В одному з аспектів зазначеного вище варіанта здійснення, пропонується спосіб лікування неврологічного розладу в ссавця, що включає лікування ссавця за допомогою будь-якого зі згаданих вище антитіл. В одному з таких аспектів, неврологічний розлад вибирається з групи, яка складається з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, розладу очного захворювання, епілептичного розладу, лізосомної хвороби нагромадження, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, розладу поведінки і запалення CNS. В іншому такому аспекті, неврологічний розлад стосується суб’єкта-людини. В іншому такому аспекті, величина дози і/або частота введення модулюється для зменшення концентрації антитіла, для якого експонуються еритроцити. В іншому такому аспекті, спосіб додатково включає стадію моніторингу суб'єкта відносно збідніння еритроцитів. В іншому такому аспекті, антитіло, зв'язане зі сполукою, вводиться в терапевтичній дозі. В одному з таких аспектів, терапевтична доза є TfR-насичувальною. В іншому такому аспекті, введення антитіла здійснюється в дозі і/або

частоті дози, каліброваній для зведення до мінімуму гострих клінічних симптомів від введення антитіла.

В інших варіантах здійснення, даний винахід пропонує ізольоване антитіло, що зв'язується з таким же епітопом на TfR, як і антитіло, вибране з групи, яка складається з антитіл 7A4, 8A2, 15D2, 10D11, 7B10, 15G11, 16G5, 13C3, 16G4, 16F6, 7G7, 4C2, 1B12, 13D4, 15G11.v1, 15G11.v2, 15G11.v3, 15G11.v4, 15G11.v5, 7A4.v1; 7A4.v2, 7A4.v3, 7A4.v4, 7A4.v5, 7A4.v6, 7A4.v7, 7A4.v8, 7A4.v9, 7A4.v10, 7A4.v11, 7A4.v12, 7A4.v13, 7A4.v14, 7A4.v15, 7G7.v1, 16F6.v1, 16F6.v2, 16F6.v3, 16F6.v4 15G11.N52A, 15G11.T53A і 15G11W92A.

В інших варіантах здійснення, пропонується спосіб зменшення виведення сполуки, що вводиться суб'єкту, де сполука зв'язується з антитілом, що зв'язується з низькою спорідненістю до TfR таким чином, що зменшується виведення сполуки і при цьому зменшується або усувається зниження рівнів еритроцитів у суб'єкта при введенні антитіла, зв'язаного зі сполукою.

В інших варіантах здійснення, пропонується спосіб оптимізації фармакокінетики і/або фармакодинаміки сполуки, щоб вона була ефективною у CNS суб'єкта, при цьому сполука зв'язується з антитілом, що зв'язується з TfR з низькою спорідненістю, і антитіло вибирається таким чином, що його спорідненість з TfR після зв'язування зі сполукою дає в результаті величину перенесення антитіла, кон'югованого зі сполукою, через BBB, що оптимізує фармакокінетику і/або фармакодинаміку сполуки в CNS, де зменшується або усувається рівень еритроцитів у суб'єкта при введенні суб'єкту антитіла, зв'язаного зі сполукою.

Буде зрозуміло, що будь-який зі згаданих вище способів і композицій за даним винаходом може бути об'єднаний з іншими і/або з додатковими аспектами даного винаходу, описаними в даному описі.

Короткий опис фігур

Фігура 1 зображає тривимірну кристалічну структуру димеру TfR у комплексі з TfR, на основі файлу pdb 3SM9. Відзначено апікальну область TfR, що не зв'язується з TfR.

Фігури 2A-2B зображають аналіз FACS зв'язування супернатантів батьківських клонів гібридоми мишей з TfR людини і циномолгус, транзиторно експресованими в клітини 293 у присутності 1 мкМ голо-TfR людини. Якщо не зазначено іншого, лінія, що обмежує сіре поле, на кожному графіку являє собою фон від детектування антитіл, сіра лінія середньої товщини являє собою зв'язування з 293 клітинами, які ендогенно експресують базальні рівні TfR людини, товста чорна лінія представляє зв'язування з транзиторно експресованим TfR людини, і тонка сіра лінія представляє зв'язування з транзиторно експресованим TfR цино.

Фігура 2C зображає результати перехресно-реактивних конкурентних аналізів антитіла людини/циномолгус, як описано в Прикладі 1. Дев'ять з чотирнадцяти клонів, як виявлено, блокують зв'язування антитіла з апікальним зв'язуванням згідно з фаговим дисплеєм.

Фігури 3A-1, 3A-2, 3B-1, 3B-2, 3C-1, 3C-2, 3D-1 і 3D-2 зображають послідовності варіабельних областей важких і легких ланцюгів клонів гібридоми, що зв'язуються з апікальними і не апікальними областями TfR. Послідовності можуть додатково підрозділятися по епітопу і подібності послідовностей на клас I-III (апікальне зв'язування) і клас IV (не-апікальне зв'язування). HVR згідно з Kabat зазначені за допомогою підкреслення.

Фігури 4A-1, 4A-2, 4B-1, 4B-2, 4C-1, 4C-2, 4D-1 і 4D-2 зображають вирівнювання гуманізованих послідовностей для (A) 15G11, (B) 7A4/8A2, (C) 7G7 і (D) 16F6. Кожна послідовність легкого або важкого варіабельного домену миші (другий рядок) вирівнюється по найближчій зародковій лінії людини або по консенсусному варіабельному домену (перший рядок). Гуманізована версія для кожного антитіла показана унизу (третій рядок). Відмінності від зародкової лінії людини або від консенсусної послідовності затінені. Послідовності HVR, що прищеплюються в каркас людини, обведені прямокутником. Показано визначення CDR згідно з Kabat.

Фігура 4E-1 і 4E-2 показують, що групи антитіл класу I-III, варіантні форми антитіл з модифікаціями на одному або декількох залишках FR зберігають спорідненість і специфічність зв'язування.

Фігура 5 зображає зв'язування hu7A4.v15, hu15G11.v5 і hu7G7.v1 з huTfR у присутності 6,3 мкМ голо-TfR. Зв'язування антитіла на іммобілізованих huTfR показано в присутності (порожні символи і переривчасті лінії) або під час відсутності (зафарбовані символи і суцільні лінії) 6,3 мкМ голо-TfR.

Фігури 6A-B зображають результати аналізів зв'язування HFE - HuTfR і блокування HFE, описаних у Прикладі 1. Фігура 6A показує зв'язування антитіла при концентраціях huTfR, що збільшуються, захоплених за допомогою іммобілізованих HFE. Фігура 6B показує зв'язування huTfR на іммобілізованих HFE у присутності збільшеної концентрації антитіла.

Фігури 7A-B зображають аналізи зв'язування 15G11.v5 і 7A4.v5 IgG і варіантів Fab Ala з TfR цино і людину, що демонструють впливи на спорідненість мутацій Ala у CDR-L3 і CDR-H3 кожного антитіла, оцінюваних як IgG, за допомогою зв'язування ELISA, і IgG або Fab - за допомогою аналізу SPR іммобілізованих TfR людини або цино, як описано в Прикладі 2.

Фігури 8A-B і Фігури 9A-B зображають результати експериментів, що оцінюють впливи статусу ефекторної функції на активність ADCC антитіл анти-TfR людини ("анти-hTFR") у первинних мононуклеарних клітинах кісткового мозку людини або в лінії клітин еритробластів людини, як описано в Прикладі 4.

Фігура 10 зображає схему дозування і відбору зразків для досліджень на приматах, описаних у Прикладі 5.

Фігури 11A-11B зображають фармакокінетичні результати експериментів, описаних у Прикладі 5, конкретно, індивідуальні і середні по групах концентрації в сироватці анти-TfR^1/BACE1, анти-TfR^2/BACE1 і анти-gD, як функцію часу після однократного внутрішньовенного введення болюсу при 30 мг/кг на мавпах циномолгус у сироватці (Фігура 11A) і CSF (Фігура 11B).

Фігури 12A-12E зображають фармакодинамічні результати експериментів, описаних у Прикладі 5, конкретно, індивідуальні і середні по групах концентрації анти-TfR^1/BACE1, анти-TfR^2/BACE1 і анти-gD у плазмі (A) або в CSF (B-E) як функцію часу після однократного внутрішньовенного введення болюсу при 30 мг/кг мавпам циномолгус. Верхні панелі показують рівні $Abeta_{1-40}$ у плазмі (Фігура 12A) і CSF (Фігура 12B), у той час як нижні панелі показують рівні розчинного APP (Фігура 12C), рівні розчинного APPβ (Фігура 12D) і відношення sAPPβ/sAPPα (Фігура 12E) як функцію часу.

Фігури 13A-13D зображають результати відбору гематологічних зразків, здійснюваного протягом досліджень, описаних у Прикладі 5. У кожній із зазначених часових точок загальна кількість ретикулоцитів (Фігура 13 A), еритроцитів (Фігура 13B), гемоглобіну (Фігура 13D) і відсоток незрілих ретикулоцитів у загальному пулі ретикулоцитів (Фігура 13C) вимірюють із використанням стандартних методик.

Фігура 14 зображає схему дозування і відбору зразків для дослідження на приматах, описаного в Прикладі 6.

Фігури 15A-15B зображають фармакодинамічні результати (A) і концентрації антитіла в головному мозку (B) для експериментів, описаних у Прикладі 6. Конкретно, Фігура 15A показує індивідуальні і середні по групах відношення анти-TfR^1/BACE1, анти-TfR^2/BACE1, анти-gD і анти-BACE1 для sAPPβ/sAPPα у CSF, як функцію часу після однократного внутрішньовенного введення болюсу при 30 мг/кг мавпам циномолгус. Фігура 15B показує індивідуальні концентрації антитіла анти-TfR^1/BACE1, анти-TfR^2/BACE1, анти-gD і анти-BACE1 у різних областях головного мозку через 24 години після дозування.

Фігури 16A-B зображають послідовності амінокислот легких і важких ланцюгів клону YW412.8 анти-BACE1, отриманого з наївної бібліотеки фагових дисплеїв природного різноманіття, і форм YW412.8 з дозрілою спорідненістю. Фіг. 16A зображає вирівнювання варіабельних легких (VL) послідовностей (SEQ ID NO. 132-137). Фіг. 16B зображає вирівнювання варіабельних важких (VH) послідовностей (SEQ ID NO. 138-139). На обох фігурах, послідовності HVR для кожного клону показані за допомогою областей, обведених прямокутником, при цьому перший прямокутник показує HVR-L1 (Фіг. 16A) або HVR-H1 (Фіг. 16B), другий прямокутник показує HVR-L2 (Фіг. 16A) або HVR-H2 (Фіг. 16B) і третій прямокутник показує HVR-L3 (Фіг. 16A) або HVR-H3 (Фіг. 16B).

Фігури 17A-B зображають послідовності амінокислот легких і важких ланцюгів клону Fab 12 антитіла анти-BACE1, отриманих з наївної бібліотеки фагових дисплеїв синтетичного різноманіття, і форми Fab 12 з дозрілою спорідненістю. Фіг. 17A зображає вирівнювання послідовності легкого ланцюга (SEQ ID NO. 140-143). Фіг. 17B зображає вирівнювання послідовності важкого ланцюга (SEQ ID NO. 144). На обох фігурах, послідовності HVR для кожного клону показані за допомогою областей, обведених прямокутником, при цьому перший прямокутник показує HVR-L1 (Фіг. 17A) або HVR-H1 (Фіг. 17B), другий прямокутник показує HVR-L2 (Фіг. 17A) або HVR-H2 (Фіг. 17B) і третій прямокутник показує HVR-L3 (Фіг. 17A) або HVR-H3 (Фіг. 17B).

Фігури 18A-B зображають важкий ланцюг (Фіг. 18A; SEQ ID NO. 145) і легкий ланцюг (Фіг. 18B; SEQ ID NO. 146) ілюстративного антитіла анти-Abeta.

Фігура 19 зображає фармакокінетичні властивості анти-TfR^1/BACE1, анти-TfR^{52A}/BACE1 і анти-TfR^{53A}/BACE1, як описано в Прикладі 5.

Фігура 20 зображає фармакокінетичні властивості антитіл анти-TfR^D/BACE1 і анти-gD IgG2a мишачих з мутаціями ефекторної функції Fc LALAPG, як описано в Прикладі 7.

Фігура 21 зображає загальну кількість і кількість незрілих ретикулоцитів у мишей через 24 години після введення дози 50 мг/кг антитіл анти-TfR^{D}/BACE1 і анти-gD IgG2a мишачих з мутаціями ефекторної функції Fc LALAPG, як описано в Прикладі 7.

Фігура 22 зображає загальну кількість ретикулоцитів у мишей через 24 години після введення дози 50 мг/кг антитіл анти-TfR^{52A}/BACE1 (N297G), анти-TfR^{52A}/BACE1 (LALAPG), анти-TfR^{52A}/BACE1 (LALAPG/YTE), TfR^{52A}/BACE1 (LALAPG/AI) мишам, нокаутованим рецепторами трансферину людини, як описано в Прикладі 8.

Фігура 23 зображає результати експериментів, що оцінюють вплив статусу ефекторної функції на активність ADCC антитіл анти-TfR/gD, анти-TfR/BACE1 (N297G), анти-TfR/BACE1 (LALAPG), анти-TfR/BACE1 (N297G/434A/436I) і анти-TfR/BACE1 (LALAPG/YTE) у первинних мононуклеарних клітинах кісткового мозку людини або у лінії клітин еритробластів людини, як описано в Прикладі 8.

Фігура 24 зображає послідовності варіабельних областей важкого і легкого ланцюга 1511Gv.5 (легкий ланцюг - SEQ ID NO:105 і важкий ланцюг - SEQ ID NO:108) і варіантів спорідненості 15G11.52A (легкий ланцюг - SEQ ID NO:105 і важкий ланцюг - SEQ ID NO:153), 15G11.53A (легкий ланцюг - SEQ ID NO:105 і важкий ланцюг - SEQ ID NO:154) і 15G11.92A (легкий ланцюг - SEQ ID NO:151 і важкий ланцюг - SEQ ID NO:108). HVR згідно з Kabat показані за допомогою підкреслення.

Фігура 25 зображає конкурентний аналіз порівняння між 15G11v.5 і анти-TfR^{C12}, як описано в Прикладі 1.

Докладний опис варіантів здійснення даного винаходу

1. Визначення

"Спорідненість" стосується сили суми загальних нековалентних взаємодій між окремим сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитіла) і її партнером по зв'язуванню (наприклад, антигеном). Якщо не зазначено іншого, як використовується в даному документі, "спорідненість зв'язування" стосується власної спорідненості зв'язування, що відображає взаємодію 1:1 між елементами пари зв'язування (наприклад, антитілом і антигеном). Спорідненість молекули X до її партнера Y може, у цілому, бути представлена за допомогою константи дисоціації (KD, що являє собою відношення швидкості від'єднання X від Y (kd або Koff) до швидкості асоціації X і Y (ka або kon)). Сурогатний вимір для спорідненості одного або декількох антитіл до їхньої мішені являє собою їх половинну максимальну інгібіторну концентрацію (IC50), міру того, скільки антитіла потрібно для інгібування зв'язування відомого ліганду з цільовим антитілом на 50%. Спорідненість може вимірюватися за допомогою звичайних способів, відомих у даній галузі, включаючи ті, які описані в даному документі. Конкретні ілюстративні і зразкові варіанти здійснення для вимірювання спорідненості зв'язування описані в даному документі.

"Гематоенцефалічний бар'єр" або "BBB" стосується фізіологічного бар'єра між периферичним кровообігом і головним мозком і спинним мозком (тобто CNS), що формується за допомогою щільних переходів за допомогою плазматичних мембран ендотелію капілярів головного мозку, які створюють щільний бар'єр, що обмежує перенесення молекул у головний мозок, навіть дуже малих молекул, таких як сечовина (60 Дальтонів). Гематоенцефалічний бар'єр у головному мозку, гематоспінальний бар'єр у спинному мозку і гематоретинальний у сітківці ока являють собою суцільні капілярні бар'єри в CNS, і вони колективно згадуються в даному документі як гематоенцефалічний бар'єр або BBB. BBB також охоплює гемато-CSF бар'єр (хороїдне сплетення), де бар'єр складається з епендимних клітин замість капілярних ендотеліальних клітин.

Терміни "амілоїд бета", "бета-амілоїд", "Abeta", "амілоїдβ" і "Aβ", використовувані в даному документі взаємозамінно, стосуються фрагмента білка-попередника амілоїду ("APP"), який продукується при розщепленні APP за допомогою β-секретази 1 ("BACE1"), а також його модифікацій, фрагментів і будь-яких функціональних еквівалентів, включаючи, але не обмежуючись цим, $Aβ_{1-40}$ і $Aβ_{1-42}$. Aβ, як відомо, існує в мономерній формі, а також асоціюється з утворенням олігомерів і фібрилярних структур, які можуть виявлятися як складові елементи амілоїдних бляшок. Структура і послідовності таких пептидів Aβ добре відомі фахівцям у даній галузі, і способи продукування зазначених пептидів або витягнення їх з головного мозку й інших тканин описані, наприклад, у Glenner and Wong, Biochem Biophys Res. Comm. 129:885-890 (1984).

Крім того, пептиди Aβ є також комерційно доступними в різноманітних формах.

"Імуноглобулін анти-Abeta", "антитіло анти-Abeta" і "антитіло, яке зв'язує Abeta" використовуються в даному документі взаємозамінно, і стосуються антитіла, що специфічно зв'язується з Abeta людини. Необмежувальний приклад антитіла анти-Abeta являє собою кренезумаб. Інші необмежувальні приклади антитіл анти-Abeta являють собою соланезумаб,

бапінезумаб, гантенезумаб, адуканумаб, понезумаб і будь-які інші антитіла анти-Abeta, описані в наступних публікаціях: WO 2000162801, WO 2002046237, WO 2002003911, WO 2003016466, WO 2003016467, WO 2003077858, WO 2004029629, WO 2004032868, WO 2004032868, WO 2004108895, WO 2005028511, WO 2006039470, WO 2006036291, WO 2006066089, WO 2006066171, WO 2006066049, WO 2006095041, WO 2009027105.

Терміни "кренезумаб" і "MABT5102A" використовуються в даному документі взаємозамінно, і стосуються конкретного антитіла анти-Abeta, що зв'язується з мономерними, олігомерними і фібрилярними формами Abeta, і які зв'язані з CAS registry number 1095207. В одному з варіантів здійснення, таке антитіло містить послідовності, наведені на Фігурах 18A і 18B.

"Носій аполіпопротеїну E4" або "носій ApoE4" використовуються в даному документі взаємозамінно з "позитивним по аполіпопротеїну E4" або "позитивним по ApoE4" і стосується індивідуума, що має щонайменше одну алель аполіпопротеїну E4 (або "ApoE4"). Індивідуум з нулем алелей ApoE4 згадується в даному документі як такий, що є "негативним по ApoE4" або "не носій ApoE4". Дивися також Prekumar, et al., 1996, Am. J. Pathol. 148:2083-95.

Термін "церебральний вазогенний набряк" стосується надлишкової акумуляції внутрішньосудинної рідини або білка у внутрішньоклітинних або позаклітинних просторах головного мозку. Церебральний вазогенний набряк детектується, наприклад, за допомогою MRI (магнітної резонансної томографії) головного мозку, включаючи, але не обмежуючись цим FLAIR MRI, і може бути безсимптомним ("безсимптомний вазогенний набряк") або зв'язаним з неврологічними симптомами, такими як сплутаність свідомості, запаморочення, нудота і летаргія ("симптоматичний вазогенний набряк") (дивися Sperling et al. Alzheimer's & Dementia, 7:367, 2011).

Термін "церебральний макрокрововилив" стосується внутрішньочерепного крововиливу або кровотечі в головному мозку, площа якого становить більше приблизно 1 см у діаметрі. Церебральний макрокрововилив детектується, наприклад, за допомогою MRI головного мозку, включаючи але не обмежуючись цим, T2*-зважену GRE MRI, і може бути безсимптомним ("безсимптомний макрокрововилив") або пов'язаним із симптомами, такими як тимчасове або постійне осередкове ослаблення моторики або сенсорики, атаксія, афазія і дизартрія ("симптоматичний макрокрововилив") (дивися, наприклад, Chalela JA, Gomes J. Expert Rev. Neurother. 2004 4:267, 2004 and Sperling et al. Alzheimer's & Dementia, 7:367, 2011).

Термін "церебральний мікрокрововилив" стосується внутрішньочерепного крововиливу або кровотечі в головному мозку, площа якого становить менше приблизно ніж 1 см у діаметрі. Церебральний мікрокрововилив детектується, наприклад, за допомогою MRI головного мозку, включаючи, але не обмежуючись цим, T2*-зважену GRE MRI, і може бути безсимптомним ("безсимптомний мікрокрововилив") або може потенційно бути пов'язаним з такими симптомами, як тимчасове або постійне осередкове ослаблення моторики або сенсорики, атаксія, афазія і дизартрія ("симптоматичний мікрокрововилив"). Дивися, наприклад, Greenberg, et al., 2009, Lancet Neurol. 8:165-74.

Термін "сулькальний випіт" стосується випоту рідини в борозенці або в звивині головного мозку. Сулькальні випоти детектуються, наприклад, за допомогою MRI головного мозку, включаючи але не обмежуючись цим, FLAIR MRI. Дивися Sperling et al. Alzheimer's & Dementia, 7:367, 2011.

Термін "поверхневий сидероз центральної нервової системи" стосується кровотечі або крововиливу в субарахноїдальній області головного мозку і детектується, наприклад, за допомогою MRI головного мозку, включаючи але не обмежуючись цим, T2*-зважену GRE MRI. Симптоми, що вказують на поверхневий сидероз центральної нервової системи, включають перцептивну глухоту, мозочкову атаксію і пірамідальні ознаки. Дивися Kumara-N, Am J Neuroradiol. 31:5, 2010.

Термін "амілоїдоз", як використовується в даному документі, стосується групи захворювань і розладів, які викликаються амілоїдом або амілоїдоподібними білками або асоційованими з ними, і включає, але не обмежуючись цим, захворювання і розлади, які викликаються присутністю або активністю амілоїдоподібних білків у мономерному, фібрилярному або полімерному стані, або в будь-якому сполученні з цих трьох станів, включаючи амілоїдні бляшки. Такі захворювання включають, але не обмежуючись цим, вторинний амілоїдоз і віковий амілоїдоз, наприклад, захворювання, включаючи, але не обмежуючись цим, неврологічні розлади, такі як хвороба Альцгеймера ("AD"), захворювання або стани, характеризовані втратою когнітивної здатності пам'яті, такі, наприклад, як помірні когнітивні порушення (MCI), деменція з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий крововилив у мозок з амілоїдозом (Голландського типу), Гуамський комплекс хвороба Паркінсона - деменція й інші захворювання, що основані на амілоїдоподібних білках або асоціюються з ними, такі як прогресуючий

супрануклеарний параліч, множинний склероз, хвороба Крейтцфельда-Якоба, хвороба Паркінсона, деменція, пов'язана з ВІЛ, ALS (бічний аміотрофічний склероз), міозит із включеними тільцями (IBM), діабет дорослих, ендокринна пухлина і сенільний серцевий амілоїдоз, і різноманітні захворювання очей, включаючи дистрофію жовтої плями, пов'язану з друзами невропатію зорового нерва, глаукому і катаракту, пов'язані з відкладеннями бета-амілоїдів.

Глаукома являє собою групу захворювань зорового нерва, що включають втрату гангліонних клітин сітківки (RGC) у вигляді характерної структури оптичної нейропатії. RGC являють собою нервові клітини, які передають зорові сигнали від ока в головний мозок. Каспаза-3 і Каспаза-8, два головні ферменти в апоптичному процесі, активуються в процесі, що приводить до апоптозу RGC. Каспаза-3 розщеплює білок-попередник амілоїду (APP) із продукуванням нейротоксичних фрагментів, включаючи Abeta. Без захисного впливу APP акумуляція Abeta у шарі гангліонних клітин сітківки приводить у результаті до загибелі RGC і необоротної втрати зору.

Глаукома часто, але не завжди, супроводжується підвищенням очного тиску, що може бути результатом блокування циркуляції водного середовища або його дренування. Хоча підвищений внутрішньоочний тиск є важливим чинником ризику для розвитку глаукоми, не можна визначити поріг внутрішньоочного тиску, що, напевно, викликав би глаукому. Ушкодження може також викликатися поганим кровопостачанням вітальних волокон зорового нерва, слабістю структури нерва і/або проблемою зі здоров'ям самих нервових волокон. Нелікована глаукома приводить до постійного ушкодження зорового нерва і втрати поля зору, що виникає в результаті, що може поступово привести до сліпоти.

Термін "легка хвороба Альцгеймера" або "легка AD", як використовується в даному документі (наприклад, "пацієнт із діагнозом легка AD"), стосується стадії AD, що відрізняється оцінкою MMSE від 20 до 26.

Термін "легка - помірна хвороба Альцгеймера" або "легка - помірна AD" як використовується в даному документі, охоплює як легку, так і помірну AD, і відрізняється оцінкою MMSE від 18 до 26.

Термін "помірна хвороба Альцгеймера" або "помірна AD" як використовується в даному документі (наприклад, "пацієнт із діагнозом помірна AD") стосується стадії AD, що відрізняється оцінкою MMSE від 18 до 19.

"Центральна нервова система" або "CNS" стосується комплексу нервових тканин, що контролюють функції організму, і вона включає головний мозок і спинний мозок.

"Рецептор гематоенцефалічного бар'єра" (у даному документі скорочено "BBB-R") являє собою трансмембранний рецепторний білок, експресований у ендотеліальних клітинах головного мозку, що може переносити молекули через гематоенцефалічний бар'єр. Приклади BBB-R включають, але не обмежуючись цим: рецептор трансферину (TfR), рецептор інсуліну, рецептор інсуліноподібного фактора росту (IGF-R), рецептори ліпопротеїнів низької густини, що включають, без обмеження, білок 1, зв'язаний з рецептором ліпопротеїнів низької густини (LR1), і білок 8, зв'язаний з рецептором ліпопротеїнів низької густини (LRP8), переносник глюкози 1 (Glut1) і фактор росту, що зв’язує гепарин, подібний епідермальному фактору росту (HB-EGF). Ілюстративний BBB-R у даному документі являє собою рецептор трансферину (TfR).

Термін "рецептор трансферину" або "TfR", як використовується в даному документі, стосується будь-якого нативного TfR з будь-якого джерела - хребетної тварини, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, люди) і гризунів (наприклад, мишей і щурів), якщо не зазначено іншого. Термін охоплює "повнорозмірний" непроцесований TfR, а також будь-яку форму TfR, що виходить у результаті процесингу в клітині. Термін також охоплює варіанти TfR, що зустрічаються в природі, наприклад, сплайсовані варіанти або алельні варіанти. TfR являє собою трансмембранний глікопротеїн (з молекулярною масою приблизно 180000), що складається з двох дисульфідно зв'язаних субодиниць (кожна з видимою молекулярною масою приблизно 90000), залучений у споживання заліза в хребетних тварин. В одному з варіантів здійснення, TfR у даному документі являє собою TfR людини ("hTfR"), що містить послідовність амінокислот, як наведено в Schneider et al. Nature 311:675 - 678 (1984), наприклад, (SEQ ID NO:1). В інших варіантах здійснення, TfR у даному документі являє собою TfR приматів ("pTfR"), що містить послідовність амінокислот, як наведено в посиланні Genbank AFD 18260.1 (SEQ ID NO:2). Для порівняння, послідовність TfR миші можна знайти в посиланні Genbank AAH54522.1 (SEQ ID NO:3).

"Неврологічний розлад", як використовується в даному документі, стосується захворювання або розладу, який впливає на CNS і/або який має етіологію в CNS. Ілюстративні захворювання або розлади CNS включають, але не обмежуючись цим, невропатію, амілоїдоз, рак, очне захворювання або розлад, вірусні або мікробні інфекції, запалення, ішемію,

нейродегенеративне захворювання, епілепсію, розлади поведінки і лізосомну хворобу нагромадження. Для цілей даної заявки, CNS буде, як розуміється, включати око, яке, звичайно відокремлюється від іншої частини організму, гематоретинальним бар'єром. Конкретні приклади неврологічних розладів включають, але не обмежуючись цим, нейродегенеративні захворювання (включаючи, але не обмежуючись цим, захворювання з тільцями Леві, постполіомієлітний синдром, синдром Ши-Дрегера, оливомостомозочкову атрофію, хворобу Паркінсона, множинну системну атрофію, стріатонігральну дегенерацію, таутопатії (включаючи, але не обмежуючись цим, хворобу Альцгеймера і супрануклеарний параліч), пріонні захворювання (включаючи, але не обмежуючись цим, губкоподібну енцефалопатію великої рогатої худоби, скрейпі, синдром Крейтцфельда-Якоба, куру, хворобу Герштмана-Штраусслера-Шайнкера, хронічну вастинг-хворобу і фатальну спадкову інсомнію), бульбарний параліч, бічний аміотрофічний склероз і гетеродегенеративні розлади нервової системи (включаючи, але не обмежуючись цим, хворобу Канавана, хворобу Хантингтона, нейрональний цероїд-ліпофусциноз, хворобу Олександра, синдром Туретта, синдром кучерявого волосся Менкеса, синдром Кокейна, синдром Халервордена-Шпатца, хворобу Лафора, синдром Ретта, гепатолентикулярну дегенерацію, синдром Леша-Ніхана і синдром Унферіхта-Лундборга), деменцію (включаючи, але не обмежуючись цим, хворобу Піка і спінально-церебелярну атаксію), рак (наприклад, CNS, включаючи метастази в головний мозок, що виникають у результаті раку де-небудь в організмі).

"Лікарський засіб проти неврологічного розладу" являє собою лікарський засіб або терапевтичний агент, що лікує один або кілька неврологічних розладів. Лікарські засоби проти неврологічних розладів за даним винаходом включають, але не обмежуючись цим, антитіла, пептиди, білки, природні ліганди однієї або декількох мішеней у CNS, модифіковані версії природних лігандів однієї або декількох мішеней у CNS, аптамери, інгібіторні нуклеїнові кислоти (тобто малі інгібіторні РНК (siRNA) і короткі шпилькові РНК (shRNA)), рибозими і малі молекули або активні фрагменти будь-якої зі згаданих вище сполук. Ілюстративні лікарські засоби проти неврологічних розладів за даним винаходом описуються в даному документі і включають, але не обмежуючись цим: антитіла, аптамери, білки, пептиди, інгібіторні нуклеїнові кислоти і малі молекули, і активні фрагменти будь-яких зі згаданих вище сполук, які або самі собою представляють, або специфічно розпізнають і/або впливають (тобто інгібують, активують або детектують її) на антиген у CNS або цільову молекулу, таку як, але не обмежуючись цим, білок-попередник амілоїду або його частини, амілоїд бета, бета-секретаза, гамма-секретаза, тау, альфа-синуклеїн, паркін, хантингтин, DR6, презенілін, ApoE, гліома або інші маркери раку CNS і нейротрофіни. Необмежувальні приклади лікарських засобів проти неврологічних розладів і розладів, при яких їх можна використовувати для лікування, наводяться в поданій далі Таблиці 1.

Таблиця 1

Необмежувальні приклади лікарських засобів
проти неврологічних розладів і відповідні розлади, для лікування яких їх можна використовувати

Лікарський засіб	Неврологічний розлад
Антитіло анти-BACE1	Хвороба Альцгеймера, гостре і хронічне пошкодження мозку, інсульт
Антитіло анти-Abeta	Хвороба Альцгеймера
Антитіло анти-Tau	Хвороба Альцгеймера, таутопатії
Нейтрофін	Інсульт, гостре пошкодження головного мозку, пошкодження спинного мозку
Нейротрофічний фактор, отриманий із головного мозку (BDNF), фактор росту фібробластів 2 (FGF-2)	Хронічне пошкодження головного мозку (нейрогенез)
Антитіло анти-рецептор епідерсального фатора росту (EGFR)	Рак мозку
Невральний фактор, отриманий з лінії гліальних клітин (GDNF)	Хвороба Паркінсона
Нейротрофічний фактор, отриманий з головного мозку (BDNF)	Бічний аміотрофічний склероз, депресія
Лізосомальний фермент	Розлади лізосомального накопичення головного мозку
Силіарний нейротрофічний фактор (CNTF)	Бічний аміотрофічний склероз
Нейрегулін-1	Шизофренія
Антитіло анти-HER2 (наприклад, транстузумаб, пертузумаб, і тому подібне)	Метастази в головной мозок від HER2-позитивного раку
Антитіло анти-VEGF (наприклад, бевацизумаб)	Гліобластома, що відновлюється, або знову діагностована, злоякісна гліома, що відновлюється, метастази в головной мозок

"Агент для одержання зображень" являє собою сполуку, що має одну або кілька властивостей, що дозволяє детектувати прямо або побічно її присутність і/або положення. Приклади таких агентів для одержання зображень включають білки і низькомолекулярні сполуки, що містять мічений залишок, що уможливлює детектування.

"Антиген CNS " або "антиген головного мозку" являє собою антиген, експресований у CNS, включаючи головний мозок, на який може націлюватися антитіло або мала молекула. Приклади таких антигенів включають, без обмеження: бета-секретазу 1 (BACE1), амілоїд бета (Abeta), рецептор епідермального фактора росту (EGFR), рецептор 2 епідермального фактора росту людини (HER2), тау, аполіпопротеїн E4 (ApoE4), альфа-синуклеїн, CD20, хантингтин, пріонний білок (PrP), збагачену лейциновими повторами кіназу 2 (LRRK2), паркін, презенілін 1, презенілін 2, гамма-секретазу, рецептор загибелі 6 (DR6), білок-попередник амілоїду (APP), рецептор нейротрофіну p75 (p75NTR), рецептор інтерлейкіну 6 (IL6R), рецептор TNF 1 (TNFR1), інтерлейкін 1 бета (IL1β) і каспазу 6. В одному з варіантів здійснення, антиген являє собою BACE1.

Термін "BACE1", як використовується в даному документі, стосується будь-якої нативної бета-секретази 1 (яка також називається фермент 1, що розщеплює β-сайт білка-попередника амілоїду, асоційована з мембраною аспарагілпротеаза 2, мемапсин 2, аспартилпротеаза 2 або Asp2) від будь-якого джерела хребетної тварини, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, люди) і гризуни (наприклад, миші і щури), якщо не зазначено іншого. Термін охоплює "повнорозмірну" непроцесовану BACE1, а також будь-яку форму BACE1, що виходить у результаті процесингу в клітині. Термін також охоплює варіанти, що зустрічаються в природі, BACE1, наприклад, сплайсовані варіанти або алельні варіанти. Послідовність амінокислот ілюстративного поліпептиду BACE1 являє собою послідовність для BACE1 людини, ізоформа A, як повідомляється в Vassar et al., Science 286:735-741 (1999), що включається в даний документ як посилання у всій своїй повноті. Існують декілька інших ізоформ BACE1 людини, включаючи ізоформи B, C і D. Дивися UniProtKB/Swiss-Prot Entry P56817, що включається в даний документ як посилання у всій своїй повноті.

Терміни "антитіло анти-бета-секретаза", "антитіло анти-BACE1", "антитіло, що зв'язується з бета-секретазою" і "антитіло, що зв'язується з BACE1" стосуються антитіла, що може зв'язувати BACE1 з достатньою спорідненістю, так що антитіло є корисним як діагностичний і/або терапевтичний агент при націлюванні на BACE1. В одному з варіантів здійснення, ступінь зв'язування антитіла анти-BACE1 з неспорідненим білком, відмінним від BACE1, менше приблизно ніж 10 % від зв'язування антитіла з BACE1, як вимірювано, наприклад, за допомогою радіоімунного аналізу (RIA). У визначених варіантах здійснення, антитіло, що зв'язується з BACE1, має константу дисоціації (Kd) ≤1 мкМ, ≤100 нМ, ≤10 нМ, ≤1 нМ, ≤0,1 нМ, ≤0,01 нМ або ≤0,001 нМ (наприклад, 10^{-8}М або менше, наприклад, від 10^{-8}М до 10^{-13}М, наприклад, від 10^{-9}М до 10^{-13}М). У визначених варіантах здійснення, антитіло анти-BACE1 зв'язується з епітопом BACE1, що є консервативним серед BACE1 від різних видів і ізоформ. В одному з варіантів здійснення, пропонується антитіло, що зв'язується з епітопом на BACE1, зв'язаним з антитілом анти-BACE 1 YW412.8.31. В інших варіантах здійснення, пропонується антитіло, що зв'язується з екзосайтом у BACE1, розташованим у каталітичному домені BACE1. В одному з варіантів здійснення, пропонується антитіло, що конкурує з пептидами, ідентифікованими в Kornacker et al., Biochem. 44:11567-11573 (2005), що включається в даний документ як посилання у всій своїй повноті, (наприклад, пептиди 1, 2, 3, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 2-12, 3-12, 4-12, 5-12, 6-12, 7-12, 8-12, 9-12, 10-12, 4, 5, 6, 5-10, 5-9, рандомізовані, Y5A, P6A, Y7A, F8A, I9A, P10A і L11A), за зв'язування з BACE1. Ілюстративні послідовності антитіла BACE1 зображені на Фіг. 15A-B і Фіг. 16A-B. Одне з ілюстративних антитіл у даному документі містить варіабельні домени антитіла YW412.8.31 (наприклад, як на фігурах 15A-B).

Білок з "нативною послідовністю" у даному документі стосується білка, що містить послідовність амінокислот білків, що зустрічаються в природі, включаючи варіанти білка, що зустрічаються в природі. Термін, як використовується в даному документі, включає білок, як ізольований з його природного джерела або як отриманий рекомбінантно.

Термін "антитіло" у даному документі використовується в найширшому змісті й охоплює різноманітні структури антитіл, включаючи, але не обмежуючись цим, моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) і фрагменти антитіл стільки, скільки вони демонструють бажану активність зв'язування антигенів.

"Фрагмент антитіла" стосується молекули іншої, ніж інтактне антитіло, що містить частину інтактного антитіла, що зв'язує антиген, з яким зв'язується інтактне антитіло. Приклади фрагментів антитіл добре відомі в даній галузі (дивися, наприклад, Nelson, MAbs (2010) 2(1):77-83) і включають але не обмежуючись цим, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$ і Fv; діатіла; лінійні антитіла; одноланцюжкові молекули антитіл, включаючи, але не обмежуючись цим, одноланцюжкові варіабельні фрагменти (scFv), продукти злиття доменів легкого і/або важкого ланцюга, які зв’язують антиген, з лінкером або без нього (і необов'язково, у тандемі); і моноспецифічні або мультиспецифічні молекули, що зв'язують антиген, сформовані з фрагментів антитіл (включаючи, але не обмежуючись цим, мультиспецифічні антитіла, сконструйовані з множини варіабельних доменів, у яких відсутні Fc-області).

Термін "моноклональне антитіло", як використовується в даному документі, стосується антитіла, отриманого з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто індивідуальні антитіла, що складають популяцію, є ідентичними і/або зв'язуються з тим самим епітопом, за винятком можливих варіантів, наприклад, які містять мутації, що зустрічаються в природі, або вони можуть виникнути під час продукування моноклонального антитіла, такі варіанти, як правило, присутні в малих кількостях. На противагу препаратам поліклональних антитіл, що, як правило, містять антитіла, спрямовані проти різних детермінантів (епітопів), кожне моноклональне антитіло препарату моноклонального антитіла спрямовано проти одного детермінанта на антигені. Прикметник "моноклональне" вказує на характер антитіла як одержуваного по суті з гомогенної популяції антитіл, і воно не повинно розглядатися як антитіло, що потребує одержання, яким-небудь конкретним способом. Наприклад, моноклональні антитіла, що повинні використовуватися відповідно до даного винаходу, можуть бути приготовлені за допомогою різноманітних методик, включаючи але не обмежуючись цим, метод гібридоми (дивися, наприклад, Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)), методи з використанням рекомбінантної ДНК (дивися, наприклад, патент США № 4816567), методи фагового дисплея (наприклад, з використанням методик, описаних у Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991), і Marks et al., J. Mol Biol, 222:581-597 (1991)), і способи, що використовують трансгенних тварин, які містить усі локуси імуноглобуліну людини або частину їх, такі способи й інші ілюстративні способи одержання моноклональних антитіл описуються в даному документі. Конкретні приклади моноклональних антитіл у даному документі включають химерні антитіла, гуманізовані антитіла й антитіла людини, включаючи їхні фрагменти, що зв'язують антиген.

Моноклональні антитіла в даному документі конкретно включають "химерні" антитіла (імуноглобуліни), у яких частина важкого і/або легкого ланцюга є ідентичною або гомологічною відповідним послідовностям в антитілах, отриманих від конкретних видів або належних до конкретного класу або підкласу антитіл, у той час як інша частина ланцюга (ланцюгів) є ідентичною або гомологічною відповідним послідовностям в антитілах, отриманих від інших видів або належних до іншого класу або підкласу антитіл, а також фрагменти таких антитіл, стільки, скільки вони демонструють бажану біологічну активність (патент США № 4816567; Morrison et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

"Акцепторний каркас людини" для цілей даного документа являє собою каркас, що містить послідовність амінокислот каркаса варіабельного домену легкого ланцюга (VL) або каркаса варіабельного домену важкого ланцюга (VH), отриманий з каркаса імуноглобуліну людини або консенсусного каркаса людини, як визначено нижче. Акцепторний каркас людини, "отриманий з" каркаса імуноглобуліну людини або консенсусного каркаса людини, може містити його послідовність амінокислот, або він може містити зміни в послідовності амінокислот. У деяких варіантах здійснення, кількість змін амінокислот становить 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, 7 або менше, 6 або менше, 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше або 2 або менше. У деяких варіантах здійснення, акцепторний каркас VL людини ідентичний по послідовності каркаса VL імуноглобуліну людини або послідовності консенсусного каркаса людини.

"Консенсусний каркас людини" являє собою каркас, що являє собою залишки амінокислот, які найбільш часто зустрічаються, при виборі послідовностей каркаса VL або VH імуноглобуліну людини. Як правило, вибір послідовностей VL або VH імуноглобуліну людини здійснюють з підгрупи послідовностей варіабельних доменів. Як правило, підгрупа послідовностей являє собою підгрупу як у Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological of Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. В одному з варіантів здійснення, для VL, підгрупа являє собою підгрупу каппа I, як у Kabat et al., вище. В одному з варіантів здійснення, для VH, підгрупа являє собою підгрупу III, як у Kabat et al., вище.

"Гуманізовані" форми антитіл (наприклад, мишачих), що не належать людині, являють собою химерні антитіла, що містять мінімальну послідовність, отриману від антитіл, що не належать людині. Здебільшого, гуманізовані антитіла являють собою антитіла людини (антитіла реципієнта), у яких залишки з гіперваріабельної області реципієнта заміняються залишками з гіперваріабельної області видів, відмінних від людини (донорське антитіло), таких як миша, щур, кролик або примат, відмінний від людини, що мають бажану специфічність, спорідненість і ємність. Наприклад, у визначених варіантах здійснення, гуманізоване антитіло буде містити по суті всі щонайменше з одного, а, як правило, із двох, варіабельних доменів, у яких усі або по суті всі HVR (наприклад, CDR) відповідають залишкам антитіла, що не належить людині, і всі або по суті всі області каркаса (FR) відповідають областям антитіла людини. У деяких випадках, залишки FR імуноглобуліну людини заміняються відповідними залишками, що не належать людині. Крім того, гуманізовані антитіла можуть містити залишки, що не містяться в антитілі реципієнта або в донорському антитілі. Ці модифікації здійснюють для додаткового визначення характеристик антитіла. У визначених варіантах здійснення, гуманізоване антитіло буде містити по суті всі щонайменше з одного, а, як правило, двох варіабельних доменів, у яких усі або по суті всі гіперваріабельні області відповідають областям антитіла, що не належить людині, і всі або по суті всі FR являють собою області антитіла людини, за винятком заміщення (заміщень) FR, як відзначено вище. Гуманізоване антитіло необов'язкове також буде містити щонайменше частину постійної області антитіла, як правило, антитіла людини. "Гуманізована форма" антитіла, наприклад, антитіла, що не належить людині, стосується антитіла, що піддається гуманізації. Відносно додаткових деталей, дивися Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); і Presta, Curr. Op. Struct. Biol 2:593-596 (1992).

"Антитіло людини" у даному документі являє собою антитіло, що містить структуру послідовностей амінокислот, що відповідає структурі послідовності амінокислот антитіла, продукованого людиною або клітиною людини, або отриманого з джерела, відмінного від людини, що використовує репертуари антитіл людини або інші послідовності, що кодують антитіло людини. Це визначення антитіла людини конкретно виключає гуманізоване антитіло, що містить залишки, які зв'язують антиген, що не належать людині. Такі антитіла можуть ідентифікуватися або готуватися за допомогою різноманітних методик, включаючи, але не обмежуючись цим: продукування за допомогою трансгенних тварин (наприклад, мишей), що здатні при імунізації продукувати антитіла людини під час відсутності ендогенного продукування імуноглобуліну (дивися, наприклад, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year y Immuno., 7:33 (1993); і патенти США №№ 5591669, 5589369 і 5545807)); вибір із бібліотек фагових дисплеїв, які

експресують антитіла людини або фрагменти антитіл людини (дивися, наприклад, McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990); Johnson et al., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993); Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993); патенти США №№ 5565332 і 5573905); генерування за допомогою активованих in vitro В-лімфоцитів (дивися патенти США №№ 5567610 і 5229275) і ізоляцію з гібридом, які продукують антитіла людини.

"Мультиспецифічне антитіло" у даному документі являє собою антитіло, що має специфічність зв'язування щонайменше із двома різними епітопами. Ілюстративні мультиспецифічні антитіла можуть зв'язуватися як з TfR, так і з антигеном головного мозку. Мультиспецифічні антитіла можуть бути отримані у вигляді повнорозмірних антитіл або фрагментів антитіл (наприклад, біспецифічних антитіл $F(ab')_2$). Отримані за допомогою генної інженерії антитіла з двома, трьома або більше (наприклад, чотирма) функціональними сайтами зв'язування антигену також розглядаються (дивися, наприклад, заявку на патент США № 2002/0004587 Al, Miller et al.). Мультиспецифічні антитіла можуть бути отримані у вигляді повнорозмірних антитіл або у вигляді фрагментів антитіл.

Антитіла в даному документі включають "варіанти послідовностей амінокислот" зі зміненою активністю зв'язування антигену або біологічною активністю. Приклади таких змін амінокислот включають антитіла з підвищеною спорідненістю до антигену (наприклад, антитіла з "дозрілою спорідненістю") і антитіла зі зміненою Fc-областю, якщо вона присутня, наприклад, зі зміненою (підвищеною або зниженою) антитіло-залежною клітинною цитотоксичністю (ADCC) і/або комплемент-залежною цитотоксичністю (CDC) (дивися, наприклад, WO 00/42072, Presta, L. і WO 99/51642, Iduosogie et al.); і/або з підвищеним або зниженим часом напівжиття в сироватці (дивися, наприклад, WOOO/42072, Presta, L.).

"Варіант із модифікованою спорідненістю" має один або кілька заміщених залишків гіпервaріабельної області або каркаса вихідного антитіла (наприклад, вихідного химерного, гуманізованого або антитіла людини), що змінюють (підвищують або знижують) спорідненість. Звичайний шлях генерування таких заміщених варіантів використовує фаговий дисплей. Коротко, декілька сайтів гіпервaріабельної області (наприклад, 6-7 сайтів) мутують із генеруванням усіх можливих заміщень амінокислот на кожному сайті. Варіанти антитіл, генеровані таким чином, одержують за допомогою фагового дисплея одновалентним способом з нитковидних частинок фагів у вигляді злиттів із продуктом гена III M13, упакованого усередині кожної частинки. Потім здійснюють скринінг варіантів, отриманих за допомогою фагового дисплея, на їхню біологічну активність (наприклад, спорідненість зв'язування). Для ідентифікації можливих сайтів гіпервaріабельної області для модифікації, можна здійснити аланін-скануючий мутагенез для ідентифікації залишків гіпервaріабельних областей, що роблять значний внесок у зв'язування антигену. Альтернативно або на додаток до цього, може бути вигідним аналізувати кристалічну структуру комплексу антиген-антитіло для ідентифікації точок контакту між антитілом і його мішенню. Такі контактні залишки і сусідні залишки є кандидатами на заміщення відповідно до технологій, розроблених в даному документі. Після генерування таких варіантів, панелі варіантів піддають впливу скринінгу, і антитіла зі зміненою спорідненістю можуть вибиратися для подальшої розробки.

"pH-чутливий варіант антитіла" являє собою варіант антитіла, що має спорідненість зв'язування з цільовим антигеном при першому pH іншу, ніж при зв'язуванні з цим цільовим антигеном при іншому pH. Як необмежувальний приклад, антитіло анти-TfR за даним винаходом може бути вибране або отримане за допомогою генної інженерії, щоб воно мало pH-чутливе зв'язування з TfR, для того, щоб воно зв'язувалося з бажаною низькою спорідненістю (як описано в даному документі) з TfR поверхні клітини в плазмі при pH 7,4, але при інтерналізації в ендосомальному компартменті, швидко дисоціювало б від TfR при відносно низьких pH (pH 5,5-6,0); така дисоціація може захистити антитіло від опосередковуваного антигеном виведення і збільшити кількість антитіла, що або доставляється в CNS, або рециклюється назад через BBB, - у будь-якому випадку, ефективна концентрація антитіла збільшується порівняно з антитілом анти-TfR, що не має такої чутливості до pH (дивися, наприклад, Chaparro-Riggers et al. J. Biol. Chem. 287(14):11090-11097; Igawa et al., Nature Biotechnol. 28(11):1203-1208). Бажане сполучення спорідненості при pH сироватки і при pH ендосомального компартмента може легко бути визначене для TfR і кон'югованої сполуки фахівцем у даній галузі.

Антитіло в даному документі може кон'югуватися з "гетерологічною молекулою", наприклад, для збільшення часу напівжиття або стабільності, або для іншого удосконалення антитіла. Наприклад, антитіло може зв'язуватися з одним або декількома небілковими полімерами, наприклад, поліетиленгліколем (PEG), пропіленгліколем, поліоксіалкіленами або

співполімерами поліетиленгліколю і пропіленгліколю. Фрагменти антитіла, такі як Fab', зв'язані з однією або декількома молекулами PEG, являють собою ілюстративний варіант здійснення даного винаходу. В іншому прикладі, гетерологічна молекула являє собою терапевтичну сполуку або агент для візуалізації (тобто детектовану мітку), і антитіло використовується для перенесення такої гетерологічної молекули через BBB. Приклади гетерологічних молекул включають, але не обмежуючись цим, хімічну сполуку, пептид, полімер, ліпід, нуклеїнову кислоту і білок.

Антитіло в даному документі може являти собою "варіант із глікозилуванням", такий, що будь-який вуглевод, приєднаний до Fc-області, якщо він присутній, змінюється, або модифікується відносно присутності/відсутності, або модифікується відносно типу. Наприклад, антитіла з дозрілою структурою вуглеводів, у якій відсутня фукоза, приєднана до Fc-області антитіла, описані в заявці на патент США № 2003/0157108 (Presta, L.). Дивися також US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Антитіла з бісекцією N-ацетилглюкозаміну (GlcNAc) у вуглеводі, приєднаному до Fc-області антитіла, згадуються в WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. і в патенті США № 6602684, Umana et al. Антитіла щонайменше з одним залишком галактози в олігосахариді, приєднаному до Fc-області антитіла, обговорюються в WO 1997/30087, Patel et al. Дивися, також, WO 1998/58964 (Raju, S.) і WO 1999/22764 (Raju, S.) відносно антитіл зі зміненим вуглеводом, приєднаним до їх Fc-області. Дивися також US 2005/0123546 (Umana et al.), що описує антитіла з модифікованим глікозилуванням. Мутація консенсусної послідовності глікозилування в Fc-області (Asn-X-Ser/Thr у положеннях 297-299, де X не може являти собою пролін), наприклад, за допомогою мутації Asn цієї послідовності, із заміною на будь-яку іншу амінокислоту, за допомогою вміщення Pro у положення 298 або модифікації положення 299 із заміною на будь-яку амінокислоту, іншу, ніж Ser або Thr, повинне пригнічувати глікозилування в цьому положенні (дивися, наприклад, Fares Al-Ejeh et al., Clin. Cancer Res. (2007) 13:5519s-5527s; Imperiali and Shannon, Biochemistry (1991) 30(18):4374-4380; Katsuri, Biochem J. (1997) 323(Pt 2):415-419; Shakin-Eshleman et al., J. Biol. Chem. (1996) 271:6363-6366).

Термін "гіперваріабельна область" або "HVR", як використовується в даному документі, стосується кожної з областей варіабельного домену антитіла, що є гіперваріабельними в послідовності ("області, що визначають комплементарність" або "CDR") і/або утворюють структурно визначені петлі ("гіперваріабельні петлі") і/або містять залишки, що вступають у контакт з антигеном ("контакт з антигеном"). Як правило, антитіла містять шість HVR: три в VH (H1, H2, H3) і три в VL (LI, L2, L3). Ілюстративні HVR у даному документі включають:

(a) гіперваріабельні петлі, здійснювані на залишках амінокислот 26-32 (LI), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

(b) CDR, здійснювані на залишках амінокислот 24-34 (LI), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) і 95-102 (H3) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological of interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) контакти з антигенами, здійснювані на залишках амінокислот 27c-36 (LI), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (HI), 47-58 (H2) і 93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)); і

(d) сполучення (a), (b) і/або (c), що включають залишки амінокислот HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (HI), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) і 94-102 (H3).

В одному з варіантів здійснення, залишки HVR містять залишки, ідентифіковані на Фігурах 3A-D або 4A-D, у Таблиці 4 або Таблиці 5, або ще де-небудь у даному описі.

Якщо не зазначено іншого, залишки HVR і інші залишки у варіабельному домені (наприклад, FR залишки) нумеруються в даному документі відповідно до Kabat et al., вище.

Залишки "каркаса" або "FR" являють собою залишки варіабельного домену, інші, ніж залишки гіперваріабельної області як визначено в даному документі. FR варіабельного домену, як правило, складається з чотирьох доменів FR: FR1, FR2, FR3 і FR4. Відповідно, послідовності HVR і FR, як правило, з'являються в наступній послідовності в VH (або VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4. У визначених варіантах здійснення, один або декілька FR залишків можуть модифікуватися для модулювання стабільності антитіла або для модулювання тривимірного позиціонування однієї або декількох HVR антитіла, наприклад, для посилення зв'язування.

"Повнорозмірне антитіло" являє собою антитіло, що містить варіабельну область зв'язування антигену, а також постійний домен легкого ланцюга (CL) і постійні домени важкого ланцюга, CH1, CH2 і CH3. Постійні домени можуть являти собою постійні домени з нативною послідовністю (наприклад, постійні домени з нативною послідовністю людини) або варіанти їхніх послідовностей амінокислот.

Терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" і "цільне антитіло" використовуються в даному документі взаємозамінно для згадування антитіла, що має структуру по суті подібну з

нативною структурою антитіла або що має важкі ланцюги, які містять Fc-область, як визначено в даному документі.

"Голе антитіло" стосується антитіла, що не кон'югується з гетерологічним залишком (наприклад, з цитотоксичним залишком або радіоізотопною міткою). Голе антитіло може бути присутнім у фармацевтичному препараті.

"Нативні антитіла" стосуються молекул імуноглобуліну, що зустрічаються в природі, з різними структурами. Наприклад, нативні антитіла IgG являють собою гетеротетрамерні глікопротеїни масою приблизно 150000 Дальтонів, що складаються з двох ідентичних легких ланцюгів і двох ідентичних важких ланцюгів, що зв'язані дисульфідними зв'язками. Від N- до C-закінчення, кожен важкий ланцюг має варіабельну область (VH), яка також називається варіабельним важким доменом або варіабельним доменом важкого ланцюга, за яким слідують три постійні домени (CH1, CH2 і CH3). Подібним же чином, від N- до C-закінчення, кожен легкий ланцюг має варіабельну область (VL), яка також називається варіабельним легким доменом або варіабельним доменом легкого ланцюга, за яким слідує постійний легкий домен (CL). Легкий ланцюг антитіла може бути приписаний до одного з двох типів, які називаються каппа (κ) і лямбда (λ), на основі послідовності амінокислот його постійного домену.

"Ефекторні функції" антитіла стосується тих біологічних активностей антитіла, які дають у результаті активування імунної системи, інше, ніж активування шляху комплементу. Такі активності здебільшого знаходяться в Fc-області (Fc-області нативної послідовності або Fc-області послідовності амінокислот варіанта) антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають, наприклад, зв'язування Fc-рецептора й опосередковувану антитіло-залежними клітинами цитотоксичність (ADCC). В одному з варіантів здійснення, антитіло за даним документом по суті не має ефекторної функції. В іншому варіанті здійснення, антитіло за даним документом зберігає мінімальну ефекторну функцію. Способи модифікування або усунення ефекторної функції добре відомі в даній галузі і включають, але не обмежуючись цим, усунення всієї Fc-області, відповідальної за ефекторну функцію, або його частини (тобто використання антитіла або фрагмента антитіла у форматі, де відсутня уся Fc-область або її частина, такого, але не обмежуючись цим, як фрагмент Fab, одноланцюжкове антитіло тощо, як описано в даному документі і як відомо в даній галузі; модифікацію Fc-області в одному або декількох положеннях амінокислот для усунення ефекторної функції (що впливають на Fc-зв'язування: положення 238, 239, 248, 249, 252, 254, 256, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 311, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 436, 437, 438 і 439; і модифікацію глікозилування антитіла (включаючи, але не обмежуючись цим, продукування антитіла в навколишньому середовищі, що не дає можливості для глікозилування для ссавців дикого типу, видалення однієї або декількох вуглеводних груп із уже глікозилованого антитіла і модифікацію антитіла в одному або декількох положеннях амінокислот для усунення здатності антитіла до глікозилування в цих положеннях (включаючи, але не обмежуючись цим, N297G і N297A і D265A).

Функції "активування комплементу" антитіла або властивості антитіла, що уможливлюють або запускають "активування шляху комплементу", використовуються взаємозамінно і стосуються тих біологічних активностей антитіла, що залучені в шлях активування комплементу імунної системи суб'єкта або стимулюють його. Такі активності включають, наприклад, зв'язування C1q і комплемент-залежну цитотоксичність (CDC), і можуть опосередковуватися як Fc-частиною, так і відмінною від Fc частиною антитіла. Способи модифікації або усунення функції активування комплементу добре відомі в даній галузі і включають, але не обмежуючись цим, усунення всієї Fc-області, відповідальної за активування комплементу, або її частини (тобто використання антитіла або фрагмента антитіла у форматі, де відсутня уся Fc-область або її частина, такого як, але не обмежуючись цим, фрагмент Fab, одноланцюжкове антитіло тощо, як описано в даному документі і як відомо в даній галузі, або модифікацію Fc-області в одному або декількох положеннях амінокислот для усунення або зменшення взаємодій з компонентами комплементу або здатності до активування компонентів комплементу, таких як положення 270, 322, 329 і 321, як відомо, залучені в зв'язування C1q), і або модифікацію усунення частини області, відмінної від Fc, відповідальної за активування комплементу (тобто модифікування CH1 області в положенні 132 (дивися, наприклад, Vidarte et al., (2001) J. Biol. Chem. 276(41):38217-38223)).

Залежно від послідовності амінокислот постійного домену їхніх важких ланцюгів, повнорозмірні антитіла можуть бути приписані до різних "класів". Є п'ять головних класів повнорозмірних антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, і декілька з них можуть додатково підрозділятися на "підкласи" (ізотипи), наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA і IgA2. Постійні домени важких ланцюгів, що відповідають різним класам антитіл, називають альфа, дельта,

епсилон, гамма і мю, відповідно. Структури субодиниць і тривимірні конфігурації різних класів імуноглобулінів добре відомі в даній галузі.

Термін "рекомбінантне антитіло", як використовується в даному документі, стосується антитіла (наприклад, химерного, гуманізованого антитіла або антитіла людини або його фрагмента, що зв'язує антиген), що експресується рекомбінантною клітиною-хазяїном, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло.

Терміни "клітина-хазяїн", "лінія клітин-хазяїнів" і "культура клітин-хазяїнів" використовуються взаємозамінно і стосуються клітин, у які може вводитися екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство таких клітин. Клітини-хазяїни включають "трансформанти" і "трансформовані клітини", що включають первинні трансформовані клітини і потомство, отримане від них, поза залежністю від кількості пасажів. Потомство може не бути повністю ідентичним по вмісту нуклеїнової кислоти вихідної клітини, але може містити мутації. Мутантне потомство, що має таку ж функцію або біологічну активність, як було отримано за допомогою скринінгу або вибрано для вихідних трансформованих клітин, включаються в розгляд у даному документі. Приклади "клітин-хазяїнів" для продукування рекомбінантних антитіл включають: (1) клітини ссавців, наприклад, клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO), COS, клітини мієломи (включаючи клітини Y0 і NS0), клітини нирок дитинчати хом'яка (BHK), клітини Hela і Vero; (2) клітини комах, наприклад, sf9, sf21 і Tn5; (3) клітини рослин, наприклад, рослин, що належать до роду Nicotiana (наприклад, Nicotiana tabacum); (4) клітини дріжджів, наприклад, дріжджів, що належать до роду Saccharomyces (наприклад, Saccharomyces cerevisiae) або до роду Aspergillus (наприклад, Aspergillus niger); (5) бактеріальні клітини, наприклад, клітини Escherichia coli або клітини Bacillus subtilis тощо.

Як використовується в даному документі, "що специфічно зв'язується" або "специфічно зв'язується з" стосується антитіла, що селективно або переважно зв'язується з антигеном. Спорідненість зв'язування, як правило, визначається з використанням стандартного аналізу, наприклад, аналізу Скатчарда, або методики поверхневого плазмонного резонансу (наприклад, з використанням BIACORE®).

"Антитіло, що зв'язується з таким же епітопом" як антитіло порівняння стосується антитіла, що блокує зв'язування антитіла порівняння з його антигеном при конкурентному аналізі на 50 % або більше, і навпаки, антитіло порівняння блокує зв'язування антитіла з його антигеном при конкурентному аналізі на 50 % або більше. В одному з варіантів здійснення, антитіло анти-BACE1, що утворює одне з біспецифічних або мультиспецифічних антитіл за даним винаходом, зв'язує епітоп BACE1, що зв'язується за допомогою YW412.8.31. Ілюстративний конкурентний аналіз наводиться в даному документі.

Термін "цитотоксичний агент", як використовується в даному документі, стосується речовини, що інгібує або запобігає здійсненню клітинної функції і/або викликає загибель або руйнування клітини. Цитотоксичні агенти включають, але не обмежуючись цим, радіоактивні ізотопи (наприклад, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} і радіоактивні ізотопи Lu); хіміотерапевтичні агенти або лікарські засоби (наприклад, метотрексат, адріаміцин, алкалоїди вінка (вінкристин, вінбластин, етопозид), доксорубіцин, мелфалан, мітоміцин C, хлорамбуцил, даунорубіцин або інші інтеркалюючі агенти); агенти-інгібітори росту; ферменти і їхні фрагменти, такі як нуклеолітичні ферменти; антибіотики; токсини, такі як низькомолекулярні токсини або ферментативно активні токсини бактеріального, грибкового, рослинного або тваринного походження, включаючи їхні фрагменти і/або варіанти; і різноманітні протипухлинні або протиракові агенти, описані в даному документі.

"Ефективна кількість" агента, наприклад, фармацевтичного препарату, стосується кількості ефективної при необхідних дозах і протягом періодів часу необхідних для досягнення бажаного терапевтичного або профілактичного результату.

Термін "Fc-область" у даному документі використовується для визначення C-кінцевої області важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить щонайменше частину постійної області. Термін включає Fc-області нативної послідовності і Fc-області варіантів. В одному з варіантів здійснення, Fc-область важкого ланцюга IgG людини простягається від Cys226 або від Pro230 до карбоксильного закінчення важкого ланцюга. Однак C-кінцевий лізин (Lys447) Fc-області може бути присутнім або не бути присутнім. Якщо в даному документі не зазначено іншого, нумерація залишків амінокислот у Fc-області або в постійній області здійснюється відповідно до системи нумерації EC, яка також називається індекс EC, як описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological of Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Термін "рецептор FcRn" або "FcRn", як використовується в даному документі, стосується Fc-рецептора ("n" означає неонатальний), що, як відомо, залучений у перенесення материнських

IgG у фетус через плаценту людини або приматів або жовтковий мішок (кролика) і немовляті з молозива через тонкий кишечник. Також відомо, що FcRn залучений у підтримку постійних рівнів IgG у сироватці за допомогою зв'язування молекул IgG і рециклювання їх у сироватку. "Область зв'язування FcRn" або "область зв'язування рецептора FcRn" стосується тієї частини антитіла, що взаємодіє з рецептором FcRn. Визначені модифікації області зв'язування FcRn антитіла збільшують спорідненість антитіла або його фрагмента до FcRn, а також збільшують час напівжиття молекули in vivo. Заміщення амінокислот в одному або декількох з наступних положень амінокислот 251, 256, 285, 290, 308, 314, 385, 389, 428, 434 і 436 збільшують взаємодію антитіла з рецептором FcRn. Заміщення в наступних далі положеннях також збільшують взаємодію антитіла з рецептором FcRn: 238, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434, наприклад, заміщення з (патенту США № 7371826).

"Імунокон'югат" являє собою антитіло, кон'юговане з однією або декількома гетерологічними молекулами, включаючи, але не обмежуючись цим, мітку або цитотоксичний агент. Необов'язково, таке кон'югування здійснюється через лінкер.

"Лінкер", як використовується в даному документі, являє собою структуру, що ковалентно або нековалентно з'єднує антитіло анти-TfR з гетерологічною молекулою. У визначених варіантах здійснення, лінкер являє собою пептид. В інших варіантах здійснення, лінкер являє собою хімічний лінкер.

"Мітка" являє собою маркер, з'єднаний з антитілом за даним документом, і використовується для детектування або одержання зображень. Приклади таких міток включають: радіоізотопну мітку, флуорофор, хромофор або афінну мітку. В одному з варіантів здійснення, мітка являє собою радіоізотопну мітку, використовувану для одержання зображень, наприклад, tc99m або 1123, або спінову мітку для одержання зображень за допомогою ядерного магнітного резонансу (ЯМР) (також відомого як магнітна резонансна томографія, MRI), таку, знову ж, як йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець, залізо тощо.

"Індивідуум" або "суб'єкт" являє собою ссавця. Ссавці включають, але не обмежуючись цим, одомашнених тварин (наприклад, корів, овець, кішок, собак і коней), приматів (наприклад, людей і приматів, інших, ніж люди, таких як мавпи), кроликів і гризунів (наприклад, мишей і щурів). У визначених варіантах здійснення, індивідуум або суб'єкт являє собою людину.

"Ізольоване" антитіло являє собою антитіло, що відділене від компонента його природного навколишнього середовища. У деяких варіантах здійснення, антитіло очищається до чистоти більш ніж 95 % або 99 %, як визначається, наприклад, за допомогою електрофоретичних (наприклад, SDS-PAGE, ізоелектричного фокусування (IEF), капілярного електрофорезу) або хроматографічних (наприклад, іонообмінної хроматографії або ВЕРХ з оберненою фазою) способів. Відносно способів оцінки чистоти антитіла, дивися, наприклад, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

"Ізольована нуклеїнова кислота" стосується молекули нуклеїнової кислоти, що відділена від компонента її природного навколишнього середовища. Ізольована нуклеїнова кислота включає молекулу нуклеїнової кислоти, що міститься в клітинах, які звичайно містять молекулу нуклеїнової кислоти, але молекула нуклеїнової кислоти присутня екстрахромосомально або в хромосомальному положенні, що відрізняється від її природного хромосомального положення.

"Ізольована нуклеїнова кислота, що кодує антитіло анти-TfR", стосується однієї або декількох молекул нуклеїнової кислоти, що кодують важкі і легкі ланцюги антитіла (або їхні фрагменти), включаючи таку молекулу (молекули) нуклеїнової кислоти, вбудовану в один вектор або у роздільні вектори, і така молекула (молекули) нуклеїнової кислоти присутня в одному або декількох положеннях у клітині-хазяїні.

Термін "вставка в упакування" використовується для згадування інструкцій, терапевтичних продуктів, що вставляються вручну в комерційні упакування, які містять інформацію про показання, застосування, дозування, уведення, сполучену терапію, протипоказання і/або попередження відносно використання таких терапевтичних продуктів.

"Відсоток (%) ідентичності послідовностей амінокислот" відносно послідовності поліпептидів порівняння визначається як відсоток залишків амінокислот у розглянутій послідовності, які є ідентичними із залишками амінокислот у послідовності поліпептидів порівняння, після вирівнювання послідовностей і введення розривів, при необхідності, для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовностей, і не розглядаючи ніякі консервативні заміщення як частину ідентичності послідовностей. Вирівнювання для цілей визначення відсотка ідентичності послідовностей амінокислот може здійснюватися різними способами, що відомі фахівцям у даній галузі, наприклад, з використанням публічно доступного комп'ютерного програмного забезпечення, такого як BLAST, BLAST-2, ALIGN або програмне забезпечення

Megalign (DNASTAR). Фахівці в даній галузі можуть визначити відповідні параметри для вирівнювання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання по всій довжині послідовностей, які порівнюють. Для цілей у даному документі, однак, значення % ідентичності послідовностей амінокислот генерують із використанням комп'ютерної програми порівняння послідовностей ALIGN-2. Комп'ютерна програма порівняння послідовностей ALIGN-2 розроблена Genentech, Inc., і код джерела поданий разом з документацією користувача в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, де він зареєстрований як U.S. Copyright Registration No. TXU 10087. Програма ALIGN-2 є публічно доступною від Genentech, Inc., South San Francisco, California, або може бути компільована з коду джерела. Програма ALIGN-2 повинна бути компільована для використання на оперативній системі UNIX, включаючи цифрову UNIX V4.0D. Усі параметри порівняння послідовностей встановлюються програмою ALIGN-2 і не змінюються.

У ситуаціях, де ALIGN-2 використовується для порівняння послідовностей амінокислот, % ідентичності послідовностей амінокислот даної послідовності амінокислот A з даною послідовністю амінокислот B (це можна альтернативно перефразувати як % ідентичності даної послідовності амінокислот A, що має або містить визначений % ідентичності послідовностей амінокислот з даною послідовністю амінокислот B або порівняно з нею) обчислюється в такий спосіб:

100 помножити на X/Y,

де X являє собою кількість залишків амінокислот, оцінюваних як ідентичні збіги за допомогою програми вирівнювання послідовностей ALIGN-2 при вирівнюванні програмою A і B, і де Y являє собою загальну кількість залишків амінокислот у B. Буде очевидно, що, коли довжина послідовності амінокислот A не дорівнює довжині послідовності амінокислот B, % ідентичності послідовностей амінокислот A відносно B не буде дорівнювати % ідентичності послідовностей амінокислот B відносно A. Якщо конкретно не стверджується іншого, усі значення % ідентичності послідовностей амінокислот, використовувані в даному документі, одержують, як описано в попередньому абзаці з використанням комп'ютерної програми ALIGN-2.

Термін "фармацевтичний препарат" стосується препарату, який знаходиться в такій формі, щоб дозволити біологічній активності активного інгредієнта, що міститься в ньому, бути ефективною, і який не містить додаткових компонентів, що є неприйнятно токсичними для суб'єкта, якому препарат повинен уводитися.

"Фармацевтично прийнятний носій" стосується інгредієнта у фармацевтичному препараті, іншого, ніж активний інгредієнт, що є нетоксичним для суб'єкта. Фармацевтично прийнятний носій включає, але не обмежуючись цим, буфер, наповнювач, стабілізатор або консервант.

Як використовується в даному документі, "лікування" (і його граматичні варіанти, такі як "лікувати" або "лікований") стосується клінічного втручання в спробі змінити природний хід подій для індивідуума, що лікується, і може здійснюватися або для профілактики, або в ході клінічної патології. Бажані впливи лікування включають, але не обмежуючись цим, запобігання появі або поновленню захворювання, ослаблення симптомів, зменшення будь-яких прямих або непрямих патологічних наслідків захворювання, запобігання появі метастаз, зменшення швидкості розвитку захворювання, полегшення або тимчасове полегшення хворобливого стану і ремісію або поліпшення прогнозу. У деяких варіантах здійснення, антитіла за даним винаходом використовують для уповільнення розвитку захворювання або для уповільнення ходу захворювання.

Термін "варіабельна область" або "варіабельний домен" стосується домену важкого або легкого ланцюга антитіла, що залучений у зв'язування антитіла з антигеном. Варіабельні домени важкого ланцюга і легкого ланцюга (VH і VL, відповідно) нативного антитіла, як правило, мають подібні структури, при цьому кожен домен містить чотири консервативні області каркаса (FR) і три гіперваріабельні області (HVR). (Дивися, наприклад, Kindt et al. Kuby Immunology, 6thed., W.H. Freeman і Co., page 91 (2007).) Один VH або VL домен може бути достатнім для надання специфічності зв'язування антигену. Крім того, антитіла, що зв'язують конкретний антиген, можуть бути ізольовані з використанням домену VH або VL від антитіла, що зв'язує антиген, для скринінгу бібліотеки комплементарних доменів VL або VH, відповідно. Дивися, наприклад, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).

Термін "вектор", як використовується в даному документі, стосується молекули нуклеїнової кислоти, здатної розмножувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона зв'язана. Термін включає вектор як структуру нуклеїнової кислоти, яка самореплікується, а також вектор, включений у геном клітини-хазяїна, у яку він уводиться. Визначені вектори здатні спрямовувати експресію

нуклеїнових кислот, з якими вони зв'язані в робочому стані. Такі вектори згадуються в даному документі як "вектори експресії".

2. Композиції і способи

А. Продукування антитіл анти-TfR і їх кон'югатів

В одному з аспектів, даний винахід ґрунтується, частково, на антитілах анти-TfR, які можна використовувати для перенесення бажаних молекул через BBB. У визначених варіантах здійснення пропонуються антитіла, що зв'язуються з TfR людини. У визначених варіантах здійснення, пропонуються антитіла, що зв'язуються як з TfR людини, так і з TfR приматів. Антитіла за даним винаходом є корисними, наприклад, для діагностики або лікування захворювань, що впливають на головний мозок і/або CNS.

А. Ілюстративні антитіла анти-TfR

В одному з аспектів, даний винахід пропонує ізольовані антитіла, що зв'язуються з TfR. У визначених варіантах здійснення, антитіло анти-TfR за даним винаходом зв'язується специфічно як з TfR людини, так і з TfR приматів. У визначених таких варіантах здійснення, антитіло анти-TfR за даним винаходом не інгібує зв'язування трансферину з TfR. У визначених таких варіантах здійснення, антитіло анти-TfR за даним винаходом зв'язується з апікальним доменом TfR. В інших визначених таких варіантах здійснення, антитіло анти-TfR за даним винаходом зв'язується з неапікальним доменом TfR. У визначених аспектах, антитіла анти-TfR можна використовувати для перенесення однієї або декількох кон'югованих сполук для одержання зображень або терапевтичних сполук через BBB.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:32; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:33; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:34; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:29; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:30; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:31. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 7A4, як показано на Фігурі 3A і в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:37; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:38; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:39; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:35; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:30; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:36. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 8A2, як показано на Фігурі 3A і в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:32; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:40; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:34; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:35; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:30; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:36. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 15D2, як показано на Фігурі 3A і в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:37; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:43; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:44; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:41; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:30; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:42. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 10D11, як показано на Фігурі 3A і в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:32; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:33; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:34; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:29; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:30; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:31. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 7B10, як показано на Фігурі 3A і в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:53; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:54; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:55; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:50; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:1; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:52. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 15G11, як показано на Фігурі 3B і в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:53; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:58; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:59; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:6; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:57; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:52. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 16G5, як показано на Фігурі 3B і в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:53; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:63; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:55; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:60; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:61; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:62. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 13C3, як показано на Фігурі 3B і в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:53; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:65; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:55; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:60; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:64; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:52. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 16G4, як показано на Фігурі 3B і в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:74; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:75; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:76; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:71; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:72; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:73. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 16F6, як показано на Фігурі 3C і в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:80; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:81; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:82; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:77; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:78; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:79. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 7G7, як показано на Фігурі 3D і в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:80; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:83; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:84; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:77; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:78; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:79. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 4C2, як показано на Фігурі 3D і в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:88; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:89; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:90; (d) HVR-L1, що містить

послідовність амінокислот SEQ ID NO:85; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:86; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:87. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 1B12, як показано на Фігурі 3D і в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:94; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:95; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:96; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:91; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:92; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:93. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 13D4, як показано на Фігурі 3D і в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:32; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:33; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:34; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:29; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:30; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:127. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR. В іншому аспекті, антитіло являє собою клон 7A4.v15, як показано на Фігурі 4B і в Таблиці 4.

Клони, згадані вище, потрапляють у чотири комплементні групи з подібністю послідовностей у HVR. Як показано в Таблиці 3, консенсусні послідовності легко можуть бути отримані з пропонованих послідовностей антитіл для кожної HVR. Як один із необмежувальних прикладів, консенсусні HVR антитіл класу I є наступними:

HVR-L1: Arg-Ala-Ser-Glu-Ser-Val-Asp-[Ser або Asp]-Tyr-Gly-[Asn або Pro]-Ser-Phe-Met-His (SEQ ID NO:45);

HVR-L2: Arg-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser (SEQ ID NO:30);

HVR-L3: Gln-[Gln або His]-Ser-Asn-Glu-[Ala, Gly або Asp]-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO:46);

HVR-H1: Asp-Tyr-[Ala або Gly]-Met-His (SEQ ID NO:47);

HVR-H2: [Gly або Val]-Ile-Ser-[Thr, Phe або Pro]-Tyr-[Phe або Ser]-Gly-[Arg або Lys]-Thr-Asn-Tyr-[Asn або Ser]-Gln-[Lys або Asn]-Phe-[Lys або Met]-Gly (SEQ ID NO:48);

HVR-H3: Gly-Leu-Ser-Gly-Asn-[Tyr або Phe]-Val-[Met або Val]-Asp-[Tyr або Phe] (SEQ ID NO:49). (дивися Таблицю 4). Консенсусні послідовності для класу II і IV також наведені в Таблиці 3.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:47; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:48; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:49; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:45; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:30; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:46. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:53; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:69; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:70; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:66; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:67; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:68. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, що містить щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних з (a) HVR-H1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:100; (b) HVR-H2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:101; (c) HVR-H3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:102; (d) HVR-L1, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:97; (e) HVR-L2, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:98; і (f) HVR-L3, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO:99. В одному з аспектів, антитіло містить усі шість з перерахованих вище послідовностей HVR.

В одному з аспектів, даний винахід пропонує антитіло, що містить щонайменше одну щонайменше дві або всі три VH послідовності HVR будь-якого з антитіл, описаних вище. В одному з варіантів здійснення, антитіло містить послідовність HVR-H3 будь-якого з антитіл, описаних вище. В інших варіантах здійснення, антитіло містить послідовності HVR-H3 і HVR-L3 будь-якого з антитіл, описаних вище. В іншому варіанті здійснення, антитіло містить

послідовності HVR-H3, HVR-L3 і HVR-H2 будь-якого з антитіл, описаних вище. В інших варіантах здійснення, антитіло містить послідовності HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3 будь-якого з антитіл, описаних вище. В іншому аспекті, даний винахід пропонує антитіло, що містить щонайменше одну, щонайменше дві або всі три VL послідовності HVR будь-якого з антитіл, описаних вище. В одному з варіантів здійснення, антитіло містить послідовності HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3 будь-якого з антитіл, описаних вище.

В іншому аспекті, антитіло за даним винаходом містить (a) домен VH, що містить щонайменше одну, щонайменше дві або всі три VH послідовності HVR, вибрані з послідовностей HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3 будь-якого з антитіл, описаних вище; і (b) домен VL, що містить щонайменше одну, щонайменше дві або всі три VL послідовності HVR, вибрані з послідовностей HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3 будь-якого з антитіл, описаних вище.

У будь-якому з розглянутих вище варіантів здійснення, антитіло анти-TfR являє собою гуманізоване антитіло. В одному з варіантів здійснення, антитіло анти-TfR містить HVR, як у будь-якому з розглянутих вище варіантів здійснення, і додатково містить акцепторний каркас людини, наприклад, каркас імуноглобулінів людини або консенсусний каркас людини. В інших варіантах здійснення, антитіло анти-TfR містить HVR, як у будь-якому з розглянутих вище варіантів здійснення, і додатково містить VH або VL, що містять одне або кілька заміщень амінокислот в одній або декількох областях FR. У Прикладі 2, у даному документі, заявники здійснюють аланін-сканування на визначених антитілах, вибраних з тих, які розглянуті вище, і визначають, що виходить подібне поліпшене або зв'язування, незважаючи на модифікації амінокислот у вибраних положеннях FR. Як показано на Фігурах 6-1 і 6-2 і в Прикладі 2 у даному документі, для груп антитіл класу I-III, варіантні форми антитіл з модифікаціями на одному або декількох залишках FR зберігають спорідненість і специфічність зв'язування. Наприклад, для антитіла 15G11, положення 43 і 48 у легкому ланцюзі FR2, положення 48 у важкому ланцюзі FR2 і положення 67, 69, 71 і 73 у важкому ланцюзі FR3 могли би модифікуватися, як показано на Фігурах 6-1 і 6-2, і отримане в результаті антитіло, як і раніше, зберігає специфічність і сильну спорідненість зв'язування з TfR людини/приматів. В іншому прикладі, для антитіла 7A4, положення 58 і 68 легкого ланцюга FR3, положення 24 у важкому ланцюзі FR1 і положення 71 у важкому ланцюзі FR3 могли б модифікуватися, як показано на Фігурах 6-1 і 6-2, і отримане в результаті антитіло, як і раніше, зберігає специфічність і сильну спорідненість зв'язування з TfR людини/приматів. У третьому прикладі, для антитіла 16F6, положення 43 і 44 легкого ланцюга FR2 і положення 71 і 78 важкого ланцюга FR3 можна модифікувати, як показано на Фігурах 6-1 і 6-2, і отримане в результаті антитіло, як і раніше, зберігає специфічність і сильну спорідненість зв'язування з TfR людини/приматів. В іншому аспекті, антитіло анти-TfR містить послідовність варіабельного домену (VH) важкого ланцюга, що має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовності з послідовністю амінокислот будь-якої з SEQ ID NO:7-10, 15-18, 20, 25-28, 108, 114, 120 і 126. У визначених варіантах здійснення, послідовність VH, що має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), інсерції або делеції порівняно з послідовністю порівняння, але антитіло анти-TfR, що містить таку послідовність, зберігає здатність до зв'язування з TfR. У визначених варіантах здійснення, у цілому від 1 до10 амінокислот заміщаються, вставляються і/або видаляються в будь-якій з SEQ ID NO:7-10, 15-18, 20, 25-28, 108, 114, 120 і 126. У визначених варіантах здійснення, заміщення, інсерції або делеції здійснюються в областях усередині HVR (тобто в FR). Необов'язково, антитіло анти-TfR містить послідовність VH будь-якої з SEQ ID NO:7-10, 15-18, 20 25-28, 108, 114, 120 і 126, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. У конкретному варіанті здійснення, VH для конкретного антитіла містить одну, дві або три HVR, вибраних з: HVR, наведених вище й у Таблиці 3 або 4, для цього конкретного антитіла. Послідовності VH для антитіл за даним винаходом показані на Фігурах 3 і 4 у даному документі.

В іншому аспекті, пропонується антитіло анти-TfR, де антитіло містить варіабельний домен (VL) легкого ланцюга, що має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність послідовностей з послідовністю амінокислот будь-якої з SEQ ID NO:4-6, 11-14, 19, 21-24, 105, 111, 117 і 123. У визначених варіантах здійснення, VL послідовність, що має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність, містить заміщення (наприклад, консервативні заміщення), інсерції або делеції, порівняно з послідовністю порівняння, але антитіло анти-TfR, що містить таку послідовність, зберігає здатність до зв'язування з TfR. У визначених варіантах здійснення, у цілому від 1 до 10 амінокислот заміщаються, вставляються і/або видаляються в будь-якій послідовності з SEQ ID NO:4-6, 11-14, 19, 21-24, 105, 111, 117 і 123. У визначених варіантах здійснення, заміщення, інсерції або делеції здійснюються в областях поза HVR (тобто в FR).

Необов'язково, антитіло анти-TfR містить послідовність VL у будь-якій з SEQ ID NO:4-6, 11-14, 19, 21-24, 105, 111, 117 і 123, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. У конкретному варіанті здійснення, VL містить одну, дві або три HVR, вибраних з HVR, наведених вище й у Таблиці 4 або 5, для цього конкретного антитіла. Послідовності VL для антитіл за даним винаходом показані на Фігурах 3 і 4 у даному документі.

В іншому аспекті, пропонується антитіло анти-TfR, де антитіло містить VH, як у будь-якому з варіантів здійснення, наведених вище, і VL, як у будь-якому з варіантів здійснення, наведених вище. В одному з варіантів здійснення, антитіло містить послідовності VL і VH, відповідно, у SEQ ID NO:4 і 7; 5 і 8; 5 і 9; 6 і 10; 4 і 7; 11 і 15; 12 і 16; 13 і 17; 14 і 18; 19 і 20; 21 і 25; 22 і 26; 23 і 27; 24 і 28; 105 і 108; 111 і 114; 117 і 120; і 123 і 126, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

В іншому аспекті, даний винахід пропонує антитіло, що зв'язується з таким же епітопом, як і антитіло анти-TfR, запропоноване в даному документі. Наприклад, у визначених варіантах здійснення, пропонується антитіло, що зв'язується з таким же епітопом, як антитіло анти-TfR, що містить послідовності VL і VH, відповідно, SEQ ID NO:4 і 7; 5 і 8; 5 і 9; 6 і 10; 4 і 7; 11 і 15; 12 і 16; 13 і 17; 14 і 18; 19 і 20; 21 і 25; 22 і 26; 23 і 27; 24 і 28; 105 і 108; 111 і 114; 117 і 120; або 123 і 126. В одному з аспектів, антитіло конкурує з будь-яким з антитіл Класу I (тобто з клонами 7A4, 8A2, 15D2, 10D11 або 7B10, або з версіями з дозрілою спорідненістю будь-яких з цих антитіл) за зв'язування з TfR. В іншому аспекті, антитіло конкурує з будь-яким з антитіл Класу II (тобто з клонами 15G11, 16G5, 13C3 або 16G, або з версіями з дозрілою спорідненістю будь-яких з цих антитіл) за зв'язування з TfR. В іншому аспекті, антитіло конкурує з клоном 16F6 або з його версіями з дозрілою спорідненістю за зв'язування з TfR. В іншому аспекті, антитіло конкурує з будь-яким з антитіл Класу IV (тобто з клонами 7G7, 4C2, 1B12 або 13D4, або з їхніми версіями з дозрілою спорідненістю) за зв'язування з TfR.

В іншому аспекті даного винаходу, антитіло анти-TfR відповідно до будь-якого з розглянутих вище варіантів здійснення являє собою моноклональне антитіло, включаючи химерне, гуманізоване антитіло або антитіло людини. В одному з варіантів здійснення, антитіло анти-TfR являє собою фрагмент антитіла, наприклад, Fv, Fab, Fab', scFv, діатіло або фрагмент $F(ab')_2$. В іншому варіанті здійснення, антитіло являє собою повнорозмірне антитіло, наприклад, інтактне антитіло IgG1, IgG2, IgG3 або антитіло IgG4 або інший клас або ізотип антитіла, як визначено в даному документі.

В іншому аспекті, антитіло анти-TfR відповідно до будь-якого з розглянутих вище варіантів здійснення може включати будь-яку з ознак окремо або в сполученні, як описано в Розділах 1-7, нижче:

1. Спорідненість антитіла

У визначених варіантах здійснення, антитіло, пропоноване в даному документі, має константу дисоціації (Kd) ≤1 мкМ, ≤100 нМ, ≤10 нМ, ≤1 нМ, ≤0,1 нМ, ≤0,01 нМ або ≤0,001 нМ (наприклад, 10^{-8}М або менше, наприклад від 10^{-8}М до 10^{-13}М, наприклад, від 10^{-9}М до 10^{-13}М).

У визначених аспектах даного винаходу, антитіло анти-TfR з "низькою спорідненістю" за даним винаходом вибирається, наприклад, на основі результатів Прикладу 5 і Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3, 84ra43 (2011) і Yu et al., Sci. Transl. Med. 25 May 201 1:Vol. 3, Issue 84, p.84ra44, що показують, що такі антитіла проти TfR з низькою спорідненістю демонструють поліпшене споживання в CNS (наприклад, у головному мозку) і/або стійкість у головному мозку/CNS. Для ідентифікації таких антитіл з низькою спорідненістю, доступні кілька аналізів для вимірювання спорідненості антитіла включаючи, без обмеження: аналіз Скатчарда і методику поверхневого плазмонного резонансу (наприклад, з використанням BIACORE®). Відповідно до одного з варіантів здійснення даного винаходу, антитіло має спорідненість до TfR людини або приматів приблизно від 5 нМ або приблизно від 20 нМ, або приблизно від 100 нМ, приблизно до 50 мкМ, або приблизно до 30 мкМ, або приблизно до 10 мкМ, або приблизно до 1 мкМ, або приблизно до 500 нМ. Таким чином, спорідненість може знаходитися в межах приблизно від 5 нМ приблизно до 50 мкМ або в межах приблизно від 20 нМ приблизно до 30 мкМ, або в межах приблизно від 30 нМ приблизно до 30 мкМ, або в межах приблизно від 50 нМ приблизно до 1 мкМ, або в межах приблизно від 100 нМ приблизно до 500 нМ, наприклад, як вимірювано за допомогою аналізу Скатчарда або BIACORE®. В інших варіантах здійснення даного винаходу, антитіло має час напівжиття при дисоціації з TfR менше ніж 1 хвилина, менше ніж 2 хвилини, менше ніж 3 хвилини, менше ніж чотири хвилини, менше ніж 5 хвилин або менше ніж від 10 хвилин і приблизно до 20 хвилин, або приблизно до 30 хвилин, як вимірювано за допомогою аналізу конкурентного зв’язування або BIACORE®.

Таким чином, даний винахід пропонує спосіб одержання антитіла, придатного для перенесення лікарського засобу проти неврологічного розладу через гематоенцефалічний

бар'єр, що включає вибір антитіла з панелі антитіл проти TfR, оскільки воно має спорідненість TfR, що знаходиться в межах приблизно від 5 нМ або приблизно від 20 нМ, або приблизно від 100 нМ, приблизно до 50 мкМ, або приблизно до 30 мкМ, або приблизно до 10 мкМ, або приблизно до 1 мкМ, або приблизно до 500 мМ. Таким чином, спорідненість може знаходитися в межах приблизно від 5 нМ приблизно до 50 мкМ або в межах приблизно від 20 нМ приблизно до 30 мкМ, або в межах приблизно від 30 нМ приблизно до 30 мкМ, або в межах приблизно від 50 нМ приблизно до 1 мкМ, або в межах приблизно від 100 нМ приблизно до 500 нМ, як вимірювано, наприклад, за допомогою аналізу Скатчарда або BIACORE®. Як буде зрозуміло фахівцю в даній галузі, кон'югування гетерологічної молекули/сполуки з антитілом часто буде зменшувати спорідненість антитіла до його мішені, наприклад, через стеричне ускладнення або навіть усунення одного плеча зв'язування, якщо антитіло робиться мультиспецифічним за допомогою одного або декількох плечей, що зв'язуються з антигеном, іншим, ніж вихідна мішень антитіла. В одному з варіантів здійснення, антитіло з низькою спорідненістю за даним винаходом специфічне до TfR, кон'юговане з анти-BACE1, має Kd відносно TfR, як вимірювано за допомогою BIACORE, приблизно 30 нМ. В іншому варіанті здійснення, антитіло з низькою спорідненістю за даним винаходом специфічне відносно TfR, кон'юговане з BACE1 має Kd відносно TfR, як вимірювано за допомогою BIACORE, приблизно 600 нМ. В іншому варіанті здійснення, антитіло з низькою спорідненістю за даним винаходом специфічне до TfR, кон'юговане з BACE1, має Kd відносно TfR, як вимірювано за допомогою BIACORE, приблизно 20 мкМ. В інших варіантах здійснення, антитіло з низькою спорідненістю за даним винаходом специфічне до TfR, кон'юговане з BACE1, має Kd відносно TfR, як вимірювано за допомогою BIACORE, приблизно 30 мкМ.

В одному з варіантів здійснення, Kd вимірюють за допомогою аналізу зв'язування радіоактивно міченого антигену (RIA). В одному з варіантів здійснення, RIA здійснюють за допомогою версії Fab антитіла, що становить інтерес, і його антигену. Наприклад, спорідненість зв'язування в розчині Fab з антигеном вимірюють за допомогою врівноважування Fab за допомогою мінімальної концентрації (^{125}I)-міченого антигену в присутності послідовних титрів неміченого антигену, потім захоплення зв'язаного антигену за допомогою планшета, покритого антитілом анти-Fab (дивися, наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Для встановлення умов аналізу, багатоямкові планшети MICROTITER (Thermo Scientific) покривають протягом ночі 5 мкг/мл покриття, що захоплює антитіло анти-Fab (Cappel Labs), у 50 мМ карбонату натрію (pH 9,6), а згодом блокують за допомогою 2 % (мас./об'єм) бичачого сироваткового альбуміну в PBS протягом двох-п'яти годин при кімнатній температурі (приблизно 23 °C). На неадсорбуючому планшеті (Nunc #269620), 100 пМ або 26 пМ [^{125}I]-антигену змішують з послідовними розведеннями Fab, що становлять інтерес (наприклад, сумісних з оцінками антитіла анти-VEGF, Fab-12, у Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Потім Fab, що становить інтерес, інкубується протягом ночі; однак інкубування може продовжуватися протягом більш тривалого періоду (наприклад, приблизно 65 годин), щоб забезпечити досягнення рівноваги. Після цього суміші переносять у захоплювальний планшет для інкубування при кімнатній температурі (наприклад, протягом однієї години). Потім розчин видаляють, і планшет промивають вісім разів 0,1 % розчину полісорбату 20 (TWEEN-20®) у PBS. Коли планшети сушать, додають 150 мкл/ямка сцинтилянта (MICROSCINT-20™; Packard), і планшети зчитують на гамма-лічильнику TOPCOUNT™ (Packard) протягом десяти хвилин. Концентрації кожного Fab, що дають 20 % від максимального зв'язування або менше, вибирають для використання в конкурентних аналізах зв'язування.

В одному з аспектів, RIA являє собою аналіз Скатчарда. Наприклад, антитіло анти-TfR, що становить інтерес, може йодуватися з використанням лактопероксидазного способу (Bennett and Horuk, Methods in Enzymology 288 pg.134-148 (1997)). Радіоактивно мічене антитіло анти-TfR очищують від вільного ^{125}I-Na за допомогою гель-фільтрації з використанням колонки NAP-5, і вимірюють його питому активність. Конкурентні реакційні суміші по 50 мкл, що містять фіксовану концентрацію йодованого антитіла і зменшувані концентрації послідовно розведеного неміченого антитіла, поміщають у 96-ямкові планшети. Клітини, які транзиторно експресують TfR, культивують у середовищах росту, що складаються з модифікованого за способом Дульбекко середовища Ігла (DMEM) (Genentech), доповненого 10 % FBS, 2 мМ L-глютаміну і 1 x пеніциліну-стрептоміцину, при 37 °C у 5 % CO_2. Клітини відділяють від чашок з використанням Sigma Cell Dissociation Solution і промивають буфером для зв'язування (DMEM з 1 % розчином бичачого сироваткового альбуміну, 50 мМ HEPES, pH 7,2 і 0,2 % азиду натрію). Промиті клітини додають при зразковій густині 200000 клітин у 0,2 мл буфера для зв'язування в 96-ямкові планшети, що містять по 50 мкл конкурентних реакційних сумішей. Кінцева концентрація неміченого антитіла при конкурентній реакції з клітинами змінюється, починаючи від 1000 нМ, а

потім зменшується за допомогою кратного розведення 1:2 для 10 концентрацій, і включаючи зразок, що містить тільки буфер з нульовим додаванням. Конкурентні реакції з клітинами для кожної концентрації неміченого антитіла аналізуються трикратно. Конкурентні реакції з клітинами інкубують протягом 2 годин при кімнатній температурі. Після 2-годинного інкубування, конкурентні реакції переносять на фільтрувальний планшет і промивають чотири рази буфером для зв'язування з метою поділу вільних і зв'язаних йодованих антитіл. Фільтри зчитують за допомогою гамма-лічильника, і дані по зв'язуванню оцінюють з використанням алгоритму підгонки Munson and Rodbard (1980) для визначення спорідненості зв'язування антитіла.

Ілюстративний аналіз BIACORE® з використанням композиції за даним винаходом може бути здійснений у такий спосіб. Kd вимірюють з використанням аналізу поверхневого плазмонного резонансу з використанням BIACORE®-2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C з використанням набору анти-Fc людини (BiAcore Inc., Piscataway, NJ). Коротко, біосенсорні чипи на основі карбоксиметилованого декстрану (CM5, BIACORE, Inc.) активують за допомогою N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду гідрохлориду (EDC) і N-гідроксисукциніміду (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Антитіло анти-Fc людини розводять за допомогою 10 мМ ацетату натрію, pH 4,0, до 50 мкг/мл перед інжекцією при швидкості потоку 5 мкл/хвилин з одержанням приблизно 10000 одиниць реакції (RU) зв'язаного білка. Після інжекції антитіла 1 М етаноламіну інжектують для блокування груп, які не прореагували. Для вимірювань кінетики моноспецифічні або мультиспецифічні варіанти антитіла анти-TfR інжектують у HBS-P з одержанням приблизно 220 RU (одиниць реакції), потім інжектують дворазові послідовні розведення MuTfR-His (від 0,61 нМ до 157 нМ) у HBS-P при 25 °C при швидкості потоку приблизно 30 мкл/хв. Швидкості асоціації (kon) і швидкості дисоціації (koff) обчислюють з використанням простої моделі зв'язування Ленгмюра 1:1 (BIACORE® Evaluation Software version 3.2) за допомогою одночасної підгонки сенсограм асоціації і дисоціації. Рівноважна константа дисоціації (Kd) обчислюється як відношення koff/kon. Дивися, наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999).

Відповідно до іншого варіанта здійснення, Kd вимірюють з використанням аналізу поверхневого плазмонного резонансу за допомогою пристрою BIACORE®-2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25 °C, з використанням набору анти-Fc людини (BiAcore Inc., Piscataway, NJ). Коротко, біосенсорні чипи на основі карбоксиметилованого декстрану (CM5, BIACORE, Inc.) активуються за допомогою N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)-карбодііміду гідрохлориду (EDC) і N-гідроксисукциніміду (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Антитіло анти-Fc людини розводять 10 мМ ацетату натрію, pH 4,0, до 50 мкг/мл перед інжектуванням при швидкості потоку 5 мкл/хвилин з одержанням приблизно 10000 одиниць реакції (RU) зв'язаного білка. Після інжектування антитіла інжектують 1 М етаноламіну для блокування груп, які не прореагували. Для вимірювання кінетики варіанти антитіла анти-TfR інжектують у HBS-P з одержанням приблизно 220 RU, потім дворазові послідовні розведення TfR-His (від 0,61 нМ до157 нМ) інжектують у HBS-P при 25 °C при швидкості потоку приблизно 30 мкл/хв. Швидкості асоціації (kon) і швидкості дисоціації (koff) обчислюють з використанням простої моделі зв'язування Ленгмюра 1:1 (BIACORE ® Evaluation Software version 3.2) за допомогою одночасної підгонки сенсограм асоціації і дисоціації. Рівноважна константа дисоціації (Kd) обчислюється як відношення koff/kon. Дивися, наприклад, Chen et al, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999).

У даній галузі відомі кілька способів визначення IC50 для даної сполуки; звичайний підхід полягає в здійсненні аналізу конкурентного зв'язування, такого як описано в даному документі. У цілому, високе значення IC50 показує, що потрібно більше антитіла для інгібування зв'язування відомого ліганду, і таким чином, що спорідненість антитіла до цього ліганду є відносно низькою. Навпаки, низьке значення IC50 показує, що потрібно менше антитіла для інгібування зв'язування відомого ліганду, і таким чином, що спорідненість антитіла до цього ліганду є відносно високою.

Ілюстративний конкурентний аналіз ELISA для вимірювання значення IC50 являє собою аналіз, при якому зростаючі концентрації варіантів антитіл анти-TfR або анти-TfR/антиген головного мозку (тобто анти-TfR/BACE1, анти-TfR Abeta тощо) використовуються для конкуренції з біотинільованим відомим антитілом анти-TfR за зв'язування з TfR. Конкурентний аналіз ELISA анти-TfR здійснюють на планшетах Maxisorp (Neptune, N.J.), покритих 2,5 мкг/мл очищеного позаклітинного домену TfR мишачих у PBS при 4 °C протягом ночі. Планшети промивають за допомогою PBS/0,05 % Tween 20 і блокують з використанням блокуючого буфера Superblock у PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Титри кожного індивідуального антитіла анти-TfR або анти-TfR/антиген головного мозку (тобто анти-TfR/BACE 1 або анти-TfR/Abeta) (послідовні розведення - 1:3) поєднують з біотинільованим відомим антитілом анти-TfR (кінцева концентрація - 0,5 нМ) і додають на планшет протягом 1 години при кімнатній

температурі. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20 і додають на планшет HRP-стрептавідин (Southern Biotech, Birmingham), і інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20 і біотинільоване антитіло анти-TfR, зв'язане на планшеті, детектують із використанням субстрату TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

2. Фрагменти антитіл

У визначених варіантах здійснення, антитіло, запропоноване в даному документі, являє собою фрагмент антитіла.

Фрагменти антитіл включають, але не обмежуючись цим, фрагменти Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv і scFv і інші фрагменти, описані нижче. Відносно огляду визначених фрагментів антитіл, дивися Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003). Відносно огляду фрагментів scFv, дивися, наприклад, Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); дивися також WO 93/16185; і патенти США №№ 5571894 і 5587458. Відносно обговорення фрагментів Fab і $F(ab')_2$, що містять залишки епітопа зв'язування рецептора реутилізації і що мають підвищений час напівжиття in vivo, дивися патент США № 5869046.

Діатіла являють собою фрагменти антитіл із двома сайтами зв'язування антигену, що можуть бути бівалентними або біспецифічними. Дивися, наприклад, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); і Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993). Триатіла і тетратіла також описуються в Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Однодоменні антитіла являють собою фрагменти антитіл, що містять усі варіабельні домени важкого ланцюга або їхню частину або усі варіабельні домени легкого ланцюга антитіла або їхню частину. У визначених варіантах здійснення, однодоменне антитіло являє собою однодоменне антитіло людини (Domantis, Inc., Waltham, MA; дивися, наприклад, патент США № 6248516 B1).

Фрагменти антитіл можуть бути отримані за допомогою різних методик, включаючи, але не обмежуючись цим, протеолітичне переварювання інтактного антитіла, а також продукування за допомогою рекомбінантних клітин-хазяїнів (наприклад, E. coli або фага), як описано в даному документі.

3. Химерні і гуманізовані антитіла

У визначених варіантах здійснення, антитіло, запропоноване в даному документі, являє собою химерне антитіло. Визначені химерні антитіла описані, наприклад, у патенті США № 4816567; і Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:68 1-6855 (1984)). В одному з прикладів, химерне антитіло містить варіабельну область, що не належить людині (наприклад, варіабельну область, отриману від миші, щура, хом'яка, кролика або примата, відмінного від людини, такого як мавпа), і постійну область людини. Химерні антитіла, що становлять інтерес, у даному документі включають "приматизування" антитіла, що містять послідовності варіабельного домену, які зв’язують антиген, отримані від примата, відмінного від людини (наприклад, мартишкових, таких як бабуїн, макак-резус або мавпа циномолгус) і послідовності постійної області людини (патент США № 5693780). В іншому прикладі, химерне антитіло являє собою антитіло "з переключенням синтезу", у якого клас або підклас відрізняється від класу або підкласу вихідного антитіла. Химерні антитіла включають їхні фрагменти, що зв'язують антиген.

У визначених варіантах здійснення, химерне антитіло являє собою гуманізоване антитіло. Як правило, антитіло, що не належить людині, гуманізується для зменшення імуногенності для людини, у той же час, зберігаючи специфічність і спорідненість вихідного антитіла, що не належить людині. Як правило, гуманізоване антитіло містить один або декілька варіабельних доменів, у яких HVR, наприклад, CDR (або їх частини), одержують з антитіла, що не належить людині, а FR (або їх частини) одержують з послідовності антитіла людини. Гуманізоване антитіло необов'язкове буде також містити щонайменше частину постійної області людини. У деяких варіантах здійснення, деякі залишки FR у гуманізованому антитілі заміщаються відповідними залишками з антитіла, що не належить людині (наприклад, антитіла, з якого одержують залишки HVR), наприклад, для відновлення або поліпшення специфічності або спорідненості антитіла.

Гуманізовані антитіла і способи їхнього одержання обговорюються, наприклад, у Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008), і додатково описуються, наприклад, у Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); у патентах США №№ 5821337, 7527791, 6982321 і 7087409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (що описує щеплення області, яка визначає специфічність (SDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (що описує "зміну поверхні"); Dall'Acqua et al., Methods

36:43-60 (2005) (що описує "перемішування FR"); і Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) і Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (що описує підхід "спрямованої селекції" до перемішування FR).

Області каркаса людини, які можна використовувати для гуманізації, включають, але не обмежуючись цим: області каркаса, вибрані з використанням способу "найкращої підгонки" (дивися, наприклад, Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)); області каркаса, отримані з консенсусної послідовності антитіл людини з конкретної підгрупи варіабельних областей легкого або важкого ланцюга (дивися, наприклад, Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); і Presta et al. J. Immunol, 151:2623 (1993)); області дозрілого (який соматично мутував) каркаса людини або області зародкової лінії каркаса людини (дивися, наприклад, Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)); і з областей каркаса, отриманих при скринінгу FR бібліотек (дивися, наприклад, Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) і Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).

4. Антитіла людини

У визначених варіантах здійснення, антитіло, запропоноване в даному документі, являє собою антитіло людини. Антитіла людини можуть бути отримані з використанням різних технологій, відомих у даній галузі. Антитіла людини в цілому описані в van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001), і в Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008).

Антитіла людини можуть бути отримані за допомогою введення імуногена трансгенній тварині, що модифікується для продукування інтактних антитіл людини або інтактних антитіл із варіабельними областями людини у відповідь на антигенне провокування. Такі тварини, як правило, містять усі ті локуси імуноглобуліну людини, або їхню частину, що заміняють локуси ендогенного імуноглобуліну або що присутні екстрахромосомально або вбудовуються невпорядковано в хромосоми тварини. У таких трансгенних мишей локуси ендогенного імуноглобуліну, як правило, дезактивуються. Відносно огляду способів одержання антитіл людини від трансгенних тварин, дивися Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). Дивися також, наприклад, патенти США №№ 6075181 і 6150584, які описують методику XENOMOUSE™; патент США № 5770429, що описує методику HUMAB®; патент США № 7041870, що описує методику K-M MOUSE®, і публікацію заявки на патент № US 2007/0061900, що описує методику VELOCIMOUSE®). Варіабельні області людини від інтактних антитіл, генерованих такими тваринами, можуть додатково модифікуватися, наприклад, за допомогою об'єднання з іншою постійною областю людини.

Антитіла людини можуть також бути отримані за допомогою способів, основаних на гібридомі. Описано лінії клітин мієломи людини і гетеромієломи миші-людини для продукування моноклональних антитіл людини. (Дивися, наприклад, Kozbor J. Immunol, 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); і Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991). Антитіла людини, генеровані за допомогою методики гібридоми В-лімфоцитів людини, також описуються в Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006). Додаткові способи включають ті, які описані, наприклад, у патенті США № 7189826 (що описують одержання моноклональних антитіл IgG людини з ліній клітин гібридоми) і Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (що описує гібридоми людина-людина). Методика гібридоми людини (методика Trioma) також описана в Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005), і в Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005).

Антитіла людини можуть також генеруватися за допомогою ізолювання послідовностей варіабельного домену клону Fv, вибраних з бібліотек фагових дисплеїв, отриманих від людини. Такі послідовності варіабельного домену можуть потім поєднуватися з бажаним постійним доменом людини. Методики вибору антитіл людини з бібліотек антитіл описані нижче.

5. Антитіла, отримані з бібліотек

Антитіла за даним винаходом можуть ізолюватися за допомогою скринінгу комбінаторних бібліотек відносно антитіл з бажаною активністю або активностями. Наприклад, у даній галузі відомі різні способи генерування бібліотек фагових дисплеїв і скринінгу таких бібліотек відносно антитіл, що мають бажані характеристики зв'язування. Такі способи обговорюються, наприклад, у Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001), і додатково описуються, наприклад, у McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992); Marks and Bradbury, у Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al, J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004);

Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); і Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132(2004).

У визначених способах фагового дисплея, репертуари генів VH і VL клонуються окремо за допомогою ланцюгової реакції полімерази (PCR) і рекомбінують випадковим чином у фагових бібліотеках, які потім можуть проглядатися відносно фага, що зв'язує антиген, як описано в Winter et al., Ann. Rev. Immunol, 12:433-455 (1994). Фаговий дисплей, як правило, відображає фрагменти антитіл, або як одноланцюжкові Fv (scFv) фрагменти, або як Fab фрагменти. Бібліотеки від імунізованих джерел забезпечують антитіла з високою спорідненістю до імуногену без вимоги конструювання гібридом. Альтернативно, може клонуватися наївний репертуар (наприклад, від людини) для одержання антитіл з одного джерела для широкого діапазону не своїх, а також своїх антигенів без якої-небудь імунізації, як описано Griffiths et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). Нарешті, наївні бібліотеки можуть також бути отримані синтетично за допомогою клонування неперегрупованих сегментів V-генів від стовбурових клітин і з використанням праймерів PCR, що містять випадкову послідовність, для кодування сильно варіабельних областей CDR3 і для здійснення перегрупування in vitro, як описано Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol, 227:381-388 (1992). Патентні публікації, що описують фагові бібліотеки антитіл людини, включають, наприклад: патент США № 5750373 і публікації патентів США №№ 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 і 2009/0002360.

Антитіла або фрагменти антитіл, ізольованих з бібліотек антитіл людини, розглядаються в даному документі як антитіла людини або фрагменти антитіл людина.

6. Мультиспецифічні антитіла

У визначених варіантах здійснення, антитіло, запропоноване в даному документі, являє собою мультиспецифічне антитіло, наприклад, біспецифічне антитіло. Мультиспецифічні антитіла являють собою моноклональні антитіла, що мають специфічність зв'язування щонайменше для двох різних сайтів. У визначених варіантах здійснення, одна зі специфічностей зв'язування призначена для TfR, а інша - для будь-якого іншого антигену. У визначених варіантах здійснення, біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися з двома різними епітопами TfR. Біспецифічні антитіла можуть також використовуватися для локалізації цитотоксичних агентів у клітинах, які експресують TfR. Біспецифічні антитіла можуть бути отримані як повнорозмірні антитіла або фрагменти антитіла.

Методики одержання мультиспецифічних антитіл включають, але не обмежуючись цим, рекомбінантне спільне експресування двох пар важкий ланцюг - легкий ланцюг імуноглобуліну, що мають різні специфічності (дивися Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983)), WO 93/08829 і Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991)), і генну інженерію "виступ у западину" (дивися, наприклад, патент США № 5731168). Мультиспецифічні антитіла можуть також бути отримані за допомогою конструювання електростатичних керуючих ефектів для одержання Fc-гетеродимерних молекул антитіл (WO 2009/089004A1); перехресного зв'язування двох або більше антитіл або фрагментів (дивися, наприклад, патент США № 4676980 і Brennan et al., Science, 229:81 (1985)); використання лейцинових "блискавок" для одержання біспецифічних антитіл (дивися, наприклад, Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)); використання методики "діатіл" для одержання біспецифічних фрагментів антитіл (дивися, наприклад, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)) і використання одноланцюжкових димерів Fv (sFv) (дивися, наприклад Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)); і приготування триспецифічних антитіл, як описано, наприклад, у Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991).

Антитіло або фрагмент у даному документі також включає "Fab подвійної дії" або "DAF", що містить сайт зв'язування антигену, що зв'язується з TfR, а також з іншим, відмінним від нього антигеном (дивися, наприклад, US 2008/0069820).

Відповідно до одного з варіантів здійснення даного винаходу, "зв'язування" здійснюється за допомогою генерування мультиспецифічного антитіла (наприклад, біспецифічного антитіла). Мультиспецифічні антитіла являють собою моноклональні антитіла, що мають специфічності зв'язування щонайменше до двох різних антигенів або епітопів. В одному з варіантів здійснення, мультиспецифічне антитіло містить перший сайт зв'язування антигену, що зв'язує TfR, і другий сайт зв'язування антигену, що зв'язує антиген головного мозку, такий як бета-секретаза 1 (BACE1) або Abeta, і інші антигени головного мозку, описані в даному документі.

Ілюстративний антиген головного мозку, що зв'язується за допомогою мультиспецифічного/біспецифічного антитіла, являє собою BACE1, і ілюстративне антитіло, що зв'язується з ним, являє собою антитіло YW412.8.31 на Фігурах 16A-B у даному документі.

В іншому варіанті здійснення, антиген головного мозку являє собою Abeta, приклади таких антитіл описані в WO 2007068412, WO 2008011348, WO 20080156622 і WO 2008156621, у

явному вигляді, що включаються в даний документ як посилання, при цьому ілюстративне антитіло до Abeta включає антитіло IgG4 MABT5102A, що містить послідовності амінокислот важкого і легкого ланцюга, на фігурах 11A і 11B, відповідно.

Методики одержання мультиспецифічних антитіл включають, але не обмежуючись цим, рекомбінантне спільне експресування двох пар важкий ланцюг - легкий ланцюг імуноглобуліну, що мають різні специфічності (дивися Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983)), WO 93/08829, і Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991)) і генну інженерію "виступ у западину" (дивися, наприклад, патент США № 5731168). Мультиспецифічні антитіла можуть також бути отримані за допомогою конструювання електростатичних керуючих ефектів для одержання Fc-гетеродимерних молекул антитіл (WO 2009/089004A1); перехресного зв'язування двох або більше антитіл або фрагментів (дивися, наприклад, патент США № 4676980 і Brennan et al., Science, 229:81 (1985)); використання лейцинових ‘блискавок’ для одержання біспецифічних антитіл (дивися, наприклад, Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)); використання методики "діатіл" для одержання біспецифічних фрагментів антитіл (дивися, наприклад, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)) і використання одноланцюжкових димерів Fv (sFv) (дивися, наприклад Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)) і приготування триспецифічних антитіл, як описано, наприклад, у Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991).

Отримані за допомогою генної інженерії антитіла з трьома або більше функціональними сайтами зв'язування антигену, включаючи "антитіла-восьминоги" або "імуноглобуліни з двома варіабельними доменами" (DVD), також включаються в даний документ (дивися, наприклад, US 2006/0025576A1 і Wu et al. Nature Biotechnology (2007)).

7. Варіанти антитіл

У визначених варіантах здійснення, розглядаються варіанти послідовностей амінокислот антитіл, запропонованих у даному документі. Наприклад, може бути бажаним поліпшення спорідненості зв'язування і/або інших біологічних властивостей антитіла. Варіанти послідовності амінокислот антитіла можуть бути отримані за допомогою уведення відповідних модифікацій у послідовність нуклеотидів, що кодує антитіло, або за допомогою пептидного синтезу. Такі модифікації включають, наприклад, делеції і/або інсерції і/або заміщення залишків у послідовностях амінокислота антитіла. Може здійснюватися будь-яке сполучення делецій, інсерцій і заміщень для одержання кінцевого конструкта, за умови, що кінцевий конструкт має бажані характеристики, наприклад, зв'язує антиген.

а) Варіанти заміщень, інсерцій і делецій

У визначених варіантах здійснення пропонуються варіанти антитіл, що мають одне або кілька заміщень амінокислот. Сайти, що становлять інтерес, для мутагенезу за допомогою заміщень, включають HVR і FR. Консервативні заміщення показані в Таблиці 2 під заголовком "Переважні заміщення". Більш істотні зміни наводяться в Таблиці 2 під заголовком "Ілюстративні заміщення" і додатково описуються нижче з посиланнями на класи бічних ланцюгів амінокислот. Заміщення амінокислот можуть вводитися в антитіло, що становить інтерес, і в продукти, що переглядаються відносно бажаної активності, наприклад, збереження/поліпшення зв'язування антигену, зменшення імуногенності або поліпшення ADCC або CDC.

Таблиця 2

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

Амінокислоти можуть групуватися відповідно до загальних властивостей бічних ланцюгів:
(1) гідрофобні: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, He;
(2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gin;
(3) кислотні: Asp, Glu;
(4) основні: His, Lys, Arg;
(5) залишки, що впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro;
(6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміщення будуть давати заміну елемента одного з цих класів на інший клас.

Один з типів варіантів із заміщенням включає заміщення одного або декількох залишків гіперваріабельної області вихідного антитіла (наприклад, гуманізованого антитіла або антитіла людини). Як правило, отриманий у результаті варіант (варіанти) вибраний для подальших досліджень, буде мати модифікації (наприклад, поліпшення) визначених біологічних властивостей (наприклад, підвищену спорідненість, знижену імуногенність) порівняно з вихідним антитілом і/або буде мати по суті збережені визначені біологічні властивості вихідного антитіла. Ілюстративний варіант із заміщенням являє собою антитіло з дозрілою спорідненістю, що може бути зручно генерувати, наприклад, з використанням методик дозрівання спорідненості на основі фагового дисплея, таких як ті, які описані в даному документі. Коротко, один або кілька залишків HVR мутують, і варіанти антитіл одержують за допомогою фагового

дисплея і переглядають на конкретну біологічну активність (наприклад, спорідненість зв'язування).

Зміни (наприклад, заміщення) можуть здійснюватися, наприклад, у HVR, для поліпшення спорідненості антитіла. Такі зміни можна здійснювати в "гарячих точках" HVR, тобто на залишках, кодованих кодонами, що піддаються мутаціям з високою частотою протягом процесу соматичного дозрівання (дивися, наприклад, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)), і/або на залишках, що вступають у контакт з антигеном, при цьому отриманий у результаті варіант VH або VL досліджують на спорідненість зв'язування. Дозрівання спорідненості за допомогою конструювання і повторного вибору з вторинних бібліотек описано, наприклад, у Hoogenboom et al. Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001). У деяких варіантах здійснення дозрівання спорідненості, уводиться різноманіття у варіабельні гени, вибрані для дозрівання, за допомогою будь-якого з різноманітних способів (наприклад, PCR зі схильністю до помилок, перемішування ланцюгів або олігонуклеотид-спрямованого мутагенезу). Потім створюється вторинна бібліотека. Потім здійснюють скринінг бібліотеки для ідентифікації будь-яких варіантів антитіла з бажаною спорідненістю. Інший спосіб уведення різноманіття включає HVR-спрямовані підходи, при яких рандомізуються кілька залишків HVR (наприклад, 4-6 залишків за один раз). Залишки HVR, залучені в зв'язування з антигеном, можуть бути специфічно ідентифіковані, наприклад, з використанням аланін-скануючого мутагенезу або моделювання. Зокрема, мішенями часто є CDR-H3 і CDR-L3.

У визначених варіантах здійснення, заміщення, інсерції або делеції можуть здійснюватися в одній або декількох HVR остільки, поскільки такі зміни не зменшують істотно здатності антитіла до зв'язування антигену. Наприклад, у HVR можна здійснювати консервативні зміни (наприклад, консервативні заміщення, як пропонується в даному документі), що не зменшують істотно спорідненості зв'язування. Такі зміни можуть знаходитися, наприклад, поза залишками, що вступають у контакт з антигеном, у HVR. У визначених варіантах здійснення варіантів VH і VL послідовностей, запропонованих вище, кожна HVR або залишається незмінною, або містить не більше одного, двох або трьох заміщень амінокислот.

Корисний спосіб для ідентифікації залишків або областей антитіла, що можуть бути мішенями для мутагенезу, називається "аланін-скануючий мутагенез", як описано в Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085. У цьому способі, залишок або група цільових залишків (наприклад, заряджені залишки, такі як arg, asp, his, lys і glu) ідентифікуються і заміняються нейтральною або негативно зарядженою амінокислотою (наприклад, аланіном або поліаланіном) для визначення того, чи впливає це на взаємодію антитіла з антигеном. Додаткові заміщення можуть вводитися в положеннях амінокислот, що демонструють функціональну чутливість до початкових заміщень. Альтернативно або на додаток до цього, кристалічна структура комплексу антиген-антитіло може використовуватися для ідентифікації точок контакту між антитілом і антигеном. Такі контактні залишки і сусідні з ними залишки можуть бути зроблені мішенями або усунуті як кандидати на заміщення. Можна здійснити скринінг варіантів для визначення того, чи містять вони бажані властивості.

Інсерції в послідовності амінокислот включають аміно- і/або карбоксил-кінцеві злиття, що знаходяться в межах довжини від одного залишку до поліпептидів, що містять сотню або більше залишків, а також інсерції усередині послідовності з одного або множини залишків амінокислот. Приклади кінцевих інсерцій включають антитіло з N-кінцевим метіонільним залишком. Інші варіанти інсерцій для молекули антитіла включають злиття з N- або C-закінченням антитіла ферменту (наприклад, ADEPT) або поліпептиду, що збільшує час напівжиття антитіла в сироватці.

b) Варіанти з глікозилуванням

У визначених варіантах здійснення, антитіло, запропоноване в даному документі, змінюється для збільшення або зменшення того ступеня, до якого антитіло глікозиловано. Додавання або видалення сайтів глікозилування в антитіло може бути зручно здійснювати за допомогою такої зміни послідовності амінокислот, при якій створюється або видаляється один або декілька сайтів глікозилування.

Коли антитіло містить Fc-область, вуглевод, приєднаний до неї, може змінюватися. Нативні антитіла, продуковані клітинами ссавців, як правило, містять розгалужений, двоантенарний олігосахарид, що, як правило, приєднаний за допомогою N-зв'язку до Asn297 домену CH2 Fc-області. Дивися, наприклад, Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997). Олігосахарид може містити різноманітні вуглеводи, наприклад, манозу, N-ацетил глюкозамін (GlcNAc), галактозу і сіалову кислоту, а також фукозу, з'єднану з GlcNAc, у "стеблі" двоантенарної структури олігосахариду. У деяких варіантах здійснення, можуть здійснюватися модифікації олігосахариду в антитілі за даним винаходом для створення варіантів антитіла з визначеними поліпшеними властивостями.

В одному з варіантів здійснення, пропонуються варіанти антитіла, що мають структуру вуглеводу, у якому відсутня фукоза, приєднана (прямо або побічно) до Fc-області. Наприклад, кількість фукози в такому антитілі може становити від 1 % до 80 %, від 1 % до 65 %, від 5 % до 65 % або від 20 % до 40 %. Кількість фукози визначається за допомогою обчислення середньої кількості фукози в цукровому ланцюзі на Asn297, відносно суми всіх глікоструктур, приєднаних до Asn297 (наприклад, комплексних, гібридних структур і структур з високим вмістом манози), як вимірювано за допомогою мас-спектрометрії MALDI-TOF, як описано, наприклад, у WO 2008/077546. Asn297 стосується аспарагінового залишку, розташованого біля положення 297 у Fc-області (ЕС нумерація залишків Fc-області); однак, Asn297 може також розташовуватися приблизно за ±3 амінокислоти до або після положення 297, тобто між положеннями 294 і 300, через малий розкид послідовностей в антитілах. Такі варіанти з фукозилуванням можуть мати поліпшену функцію ADCC. Дивися, наприклад, публікації патентів США №№ 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (yowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Приклади публікацій, що стосуються "дефукозилованим" або "фукоза-дефіцитних" варіантів антитіл, включають: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/01 10282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki et al. J. Mol.Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004). Приклади ліній клітин, здатних продукувати дефукозиловані антитіла, включають лінію клітин Lec13CHO, дефіцитну по фукозилуванню білка (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); заявка на патент США № 2003/0157108 Al, Presta, L; і WO 2004/056312 Al, Adams et al., зокрема, Приклад 11), і лінії нокаутованих клітин, такі як клітини з геном альфа-1,6-фукозилтрансферази, FUT8, нокаутовані клітини CHO (дивися, наприклад, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006) і WO 2003/08107).

Крім того, пропонуються варіанти антитіл з розділеними навпіл олігосахаридами, наприклад, у яких двоантенарний олігосахарид, приєднаний до Fc-області антитіла, поділяється навпіл за допомогою GlcNAc. Такі варіанти антитіл можуть мати знижене фукозилування і/або поліпшену функцію ADCC. Приклади таких варіантів антитіл описані, наприклад, у WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); у патенті США № 6602684 (Umana et al.); і в US 2005/0123546 (Umana et al.). Варіанти антитіл щонайменше з одним залишком галактози в олігосахариді, приєднаному до Fc-області, також пропонуються. Такі варіанти антитіл можуть мати поліпшену функцію CDC. Такі варіанти антитіл описані, наприклад, у WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); і WO 1999/22764 (Raju, S.).

c) Варіанти Fc-області

У визначених варіантах здійснення, одна або кілька модифікацій амінокислот можуть вводитися в Fc-область антитіла, запропонованого в даному документі, тим самим генеруючи варіант Fc-області. Варіант Fc-області може містити послідовність Fc-області людини (наприклад, Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 людини), що містить модифікацію амінокислот (наприклад, заміщення) в одному або декількох положеннях амінокислот.

У визначених варіантах здійснення, даний винахід розглядає варіант антитіла, що має деякі, але не всі ефекторні функції, що роблять його бажаним кандидатом для застосувань, у яких є важливим час напівжиття антитіла in vivo, і при цьому визначені ефекторні функції (такі як активування комплементу і ADCC) є непотрібними або шкідливими. Можуть здійснюватися аналізи цитотоксичності in vitro і/або in vivo, щоб підтвердити зменшення/збідніння активностей CDC і/або ADCC. Наприклад, можуть здійснюватися аналізи зв'язування Fc-рецептора (FcR), щоб переконатися, що для антитіла відсутнє зв'язування FcγR (отже, ймовірно відсутня активність ADCC), але зберігається здатність зв'язування FcRn. Первинні клітини для опосередкування ADCC, NK клітини експресують тільки FcγRIII, у той час як моноцити експресують FcγRI, FcγRII і FcγRIII. Експресування FcR у гематопоетичних клітинах наводиться в Таблиці 3 на сторінці 464 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Необмежувальні приклади аналізів in vitro для оцінки активності ADCC молекули, що становить інтерес, описані в патенті США № 5500362 (дивися, наприклад Hellstrom, I. et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) і Hellstrom, I et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5821337 (дивися Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Альтернативно, можна використовувати методи нерадіоактивних аналізів (дивися, наприклад, нерадіоактивний аналіз цитотоксичності ACTI™ для проточної цитометрії (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); і нерадіоактивний аналіз цитотоксичності CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Корисні ефекторні клітини для таких аналізів включають мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) і природні клітини-кілери (NK). Альтернативно, або на додаток до цього, активність

ADCC молекули, що становить інтерес, може оцінюватися in vivo, наприклад, на тваринній моделі, такій, як та, яка описується в Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Аналіз зв'язування C1q може також здійснюватися для підтвердження того, що антитіло не здатне зв'язувати C1q, і, отже, у нього відсутня активність CDC. Дивися, наприклад, аналіз ELISA зв'язування C1q і C3c у WO 2006/029879 і WO 2005/100402. Для оцінки активування комплементу може бути здійснений аналіз CDC (дивися, наприклад, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); і Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). Зв'язування FcRn і визначення виведення/часу напівжиття in vivo також можуть здійснюватися з використанням способів, відомих у даній галузі (дивися, наприклад, Petkova, S.B. et al., Intl. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Необмежувальні приклади антитіл зі зменшеною ефекторною функцією включають антитіла із заміщенням одного або декількох залишків 238, 265, 269, 270, 297, 327 і 329 Fc-області (патент США № 6737056). Такі Fc-мутанти включають Fc-мутанти з заміщеннями в двох або більше положеннях амінокислот 265, 269, 270, 297 і 327, включаючи так званий Fc-мутант "DANA" із заміщенням залишків 265 і 297 аланіном (патент США № 7332581).

Описано визначені варіанти антитіл з поліпшеним або зменшеним зв'язуванням з FcR. (Дивися, наприклад, патент США № 6737056; WO 2004/056312 і Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).

У визначених варіантах здійснення, варіант антитіла містить Fc-область з одним або декількома заміщеннями амінокислот, що поліпшують ADCC, наприклад, заміщеннями в положеннях 298, 333 і/або 334 Fc-області (нумерація залишків EC).

У деяких варіантах здійснення, здійснюють зміни в Fc-області, що дають у результаті зміну (тобто або поліпшення, або погіршення) зв'язування C1q і/або комплемент-залежної цитотоксичності (CDC), наприклад, як описано в патенті США № 6194551, WO 99/51642 і в Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000).

Антитіла зі збільшеними часами напівжиття і поліпшеним зв'язуванням з неонатальним Fc-рецептором (FcRn), що є відповідальним за перенесення материнських IgG фетусу (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) і Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), описані в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Ці антитіла містять Fc-область з одним або декількома заміщеннями в ній, що поліпшують зв'язування Fc-області з FcRn. Такі, необмежувальні варіанти Fc включають варіанти з заміщеннями в одному або декількох залишках Fc-області: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434, наприклад, заміщення залишку 434 Fc-області (патент США № 7371826).

Дивися також Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821 і WO 94/29351 відносно інших прикладів варіантів Fc-області.

d) Отримані за допомогою генної інженерії цистеїнові варіанти антитіл

У визначених варіантах здійснення, може бути бажаним створення отриманих за допомогою генної інженерії цистеїнових антитіл, наприклад, "thioMAb", у яких один або кілька залишків антитіла заміщені цистеїновими залишками. У конкретних варіантах здійснення, заміщені залишки з'являються на доступних сайтах антитіла. За допомогою заміщення цих залишків цистеїном, реакційноздатні тіольні групи позиціонуються тим самим на доступних сайтах антитіла і можуть використовуватися для кон'югування антитіла з іншими залишками, такими як залишки лікарських засобів або залишки лінкер-лікарський засіб, для створення імунокон'югата, як додатково описується в даному документі. У визначених варіантах здійснення, будь-які один або декілька з наступних залишків можуть бути заміщені цистеїном: V205 (нумерація Kabat) легкого ланцюга; A118 (нумерація EC) важкого ланцюга; і S400 (нумерація EC) Fc-області важкого ланцюга.

Отримані за допомогою генної інженерії цистеїнові антитіла можуть генеруватися, як описано, наприклад, у патенті США № 7521541.

e) Похідні антитіл

У визначених варіантах здійснення, антитіло, запропоноване в даному документі, може додатково модифікуватися, щоб воно містило додаткові небілкові залишки, що відомі в даній галузі і є легкодоступними. Залишки, придатні для дериватизації антитіла, включають, але не обмежуючись цим, водорозчинні полімери. Необмежувальні приклади водорозчинних полімерів включають, але не обмежуючись цим, поліетиленгліколь (PEG), співполімери етиленгліколь/пропіленгліколь, карбоксиметилцелюлозу, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, полі-1,3-діоксолан, полі-1,3,6-триоксан, співполімер етилен/малеїновий ангідрид, поліамінокислоти (або гомополімери, або неупорядковані співполімери) і декстран або полі(н-вінілпіролідон)поліетиленгліколь, гомополімери пропіленгліколю, співполімери

пропілпропіленоксид/етиленоксид, поліоксіетиловані поліоли (наприклад, гліцерол), полівініловий спирт і їхні суміші.

Пропіональдегід поліетиленгліколю може мати переваги при виробництві, завдяки його стабільності у воді. Полімер може мати будь-яку молекулярну масу і може бути розгалуженим або нерозгалуженим.

Кількість полімерів, приєднаних до антитіла, може змінюватися, і якщо приєднано більше одного полімеру, вони можуть являти собою однакові або різні молекули. Як правило, кількість і/або тип полімерів, використовуваних для дериватизації, може визначатися на основі розумінь, що включають, але не обмежуючись цим, конкретні властивості або функції антитіла, що повинні бути поліпшені, то, чи буде похідне антитіла використовуватися в терапії при визначених станах тощо.

В іншому варіанті здійснення, пропонуються кон'югати антитіла і небілкового залишку, що можуть селективно нагріватися при експонуванні для випромінювання. В одному з варіантів здійснення, небілковий залишок являє собою вуглецеву нанотрубку (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605 (2005)). Випромінювання може мати будь-яку довжину хвилі, і вони включають, але не обмежуючись цим, довжини хвиль, що не ушкоджують звичайні клітини, але які нагрівають небілковий залишок до такої температури, при якій клітини, що знаходяться поруч з антитілом-небілковим залишком, гинуть.

B. Рекомбінантні способи і композиції

Антитіла можуть продукуватися з використанням рекомбінантних способів і композицій, наприклад, як описано в патенті США № 4816567. В одному з варіантів здійснення, пропонується ізольована нуклеїнова кислота, що кодує антитіло анти-TfR, описане в даному документі. Така нуклеїнова кислота може кодувати послідовність амінокислот, що містить VL, і/або послідовність амінокислот, що містить VH антитіла (наприклад, легкий і/або важкий ланцюги антитіла). В іншому варіанті здійснення, пропонуються один або кілька векторів (наприклад, векторів експресії), що містять таку нуклеїнову кислоту. В іншому варіанті здійснення пропонується клітина-хазяїн, що містить таку нуклеїнову кислоту. В одному з таких варіантів здійснення, клітина-хазяїн містить (наприклад, трансформується з його допомогою): (1) вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує послідовність амінокислот, що містить VL антитіла, і послідовність амінокислот, що містить VH антитіла, або (2) перший вектор, що містить нуклеїнову кислоту, що кодує послідовність амінокислот, що містить VL антитіла, і другий вектор, що містить нуклеїнову кислоту, що кодує послідовність амінокислот, що містить VH антитіла. В одному з варіантів здійснення, клітина-хазяїн є еукаріотичною, наприклад, являє собою клітину яєчника китайського хом'ячка (CHO) або лімфоїдну клітину (наприклад, клітину Y0, NS0, Sp20). В одному з варіантів здійснення, пропонується спосіб одержання антитіла анти-TfR, де спосіб включає культивування клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло, як наведено вище, при умовах, придатних для експресування антитіла, і необов'язково, витягнення антитіла з клітини-хазяїна (або культурного середовища клітини-хазяїна).

Для рекомбінантного продукування антитіла анти-TfR, нуклеїнова кислота, що кодує антитіло, наприклад, як описано вище, ізолюється і вставляється в один або кілька векторів для подальшого клонування і/або експресування в клітині-хазяїні. Така нуклеїнова кислота може легко бути ізольована і секвенована з використанням звичайних процедур (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, що здатні специфічно зв'язуватися з генами, які кодують важкі і легені ланцюги антитіла).

Клітини-хазяїни, придатні для клонування або експресування векторів, що кодують антитіло, включають прокаріотичні або еукаріотичні клітини, описані в даному документі. Наприклад, антитіла можуть продукуватися в бактеріях, зокрема, коли не потрібні глікозилування і Fc-ефекторна функція. Відносно експресії фрагментів антитіла і поліпептидів у бактерій, дивися, наприклад, патенти США №№ 5648237, 5789199 і 5840523. (Дивися також Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, що описує експресування фрагментів антитіл у E. coli.) Після експресування антитіло може ізолюватися з пасти бактеріальних клітин у вигляді розчинної фракції і може додатково очищуватися.

На додаток до прокаріотів, еукаріотичні мікроби, такі як нитковидні грибки або дріжджі, є придатними для використання хазяїнами для клонування або експресування векторів, що кодують антитіло, включаючи штами грибків і дріжджів, де шляхи глікозилування є "германізованими", що дає в результаті продукування антитіла зі структурою глікозилування, що частково або повністю відповідає людині. Дивися Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004) і Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006).

Клітини-хазяїни придатні для експресування глікозилованого антитіла також виходять з багатоклітинних організмів (безхребетних тварин і хребетних тварин). Приклади клітин безхребетних включають клітини рослин і клітини комах. Ідентифіковано численні бакуловірусні штами, що можуть використовуватися в зв'язку з клітинами комах, зокрема, для трансфікування клітин Spodoptera frugiperda.

Культури клітин рослин також можуть використовуватися як хазяїни. Дивися, наприклад, патенти США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 і 6417429 (які описують методику PLANTIBODIES™ для продукування антитіл у трансгенних рослинах).

Клітини хребетних можна також використовувати як хазяїни. Наприклад, корисними можуть бути лінії клітин ссавців, що адаптовані для росту в суспензії. Інші приклади корисних ліній клітин-хазяїнів ссавців являють собою лінію клітин CV1 нирок мавп, трансформовану за допомогою SV40 (COS-7); лінію клітин нирок ембріона людини (293 або клітини 293 як описано, наприклад, у Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клітини нирок дитинчати хом'яка (BHK); клітини Сертолі миші (клітини TM4, як описано, наприклад, у Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клітини нирок мавпи (CV1); клітини нирок африканської зеленої мавпи (VERO-76); клітини карциноми шийки матки людини (HELA); клітини нирок собачих (MDCK); клітини печінки щура бафало (BRL 3A); клітини легень людини (W138); клітини печінки людини (Hep G2); пухлина молочної залози миші (MMT 060562); клітини TRI, як описано, наприклад, у Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982); клітини MRC 5 і клітини FS4. Інші корисні лінії клітин-хазяїнів ссавців включають клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO), включаючи клітини DHFR⁻CHO (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)) і лінії клітин мієломи, такі як Y0, NSO і Sp2/0. Відносно огляду визначених ліній клітин-хазяїнів ссавців, придатних для продукування антитіл, дивися, наприклад, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

С. Аналізи

Антитіла анти-TfR, запропоновані в даному документі, можуть ідентифікуватися, проглядатися або характеризуватися відносно їх фізичних/хімічних властивостей і/або біологічних активностей за допомогою різноманітних аналізів, відомих у даній галузі.

1. Аналіз зв'язування й інші аналізи

Доступні різноманітні методики для визначення зв'язування антитіла з TfR. Один з таких аналізів являє собою імуносорбентний аналіз за допомогою зв'язаного ферменту (ELISA) для підтвердження здатності зв'язування з TfR людини (і з антигеном головного мозку). Відповідно до цього аналізу, планшети, покриті антигеном (наприклад, рекомбінантним TfR), інкубують разом зі зразком, що містить антитіло анти-TfR, і визначають зв'язування антитіла з антигеном, що становить інтерес.

В одному з аспектів, антитіло за даним винаходом досліджують відносно його активності зв'язування антигену, наприклад, за допомогою відомих способів, таких як ELISA, Western blot тощо.

В іншому аспекті, можна використовувати конкурентні аналізи для ідентифікації антитіла, що конкурує з будь-яким з антитіл за даним винаходом за зв'язування з TfR. У визначених варіантах здійснення, таке конкуруюче антитіло зв'язується з таким же епітопом (наприклад, з лінійним або конформаційним епітопом), як зв'язаний з будь-яким з антитіл за даним винаходом, більш конкретно, з будь-яким з епітопів, специфічно зв'язаних з антитілами в класі I, класі II, класі III або класі IV, як описано в даному документі (дивися, наприклад, Приклад 1 і Таблицю 4). Докладні ілюстративні способи картування епітопа, з яким зв'язується антитіло, наведені в Morris (1996) "Epitop Mapping Protocols", in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

В ілюстративному конкурентному аналізі, іммобілізований TfR інкубують у розчині, що містить перше мічене антитіло, що зв'язується з TfR (наприклад, одне або декілька з антитіл, описаних у даному документі), і друге немічене антитіло, яке досліджують на його здатність конкурувати з першим антитілом за зв'язування з TfR. Друге антитіло може бути присутнім у супернатанті гібридоми. Як контроль, іммобілізований TfR інкубується в розчині, що містить перше мічене антитіло, але не друге немічене антитіло. Після інкубування при умовах, що дають можливість для зв'язування першого антитіла з TfR, надлишок незв'язаного антитіла видаляють, і вимірюють кількість мітки, зв'язану з іммобілізованим TfR. Якщо кількість мітки, асоційованої з іммобілізованим TfR, істотно зменшується в досліджуваному зразку порівняно з контрольним зразком, це показує, що друге антитіло конкурує з першим антитілом за зв'язування з TfR. Дивися Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Аналізи активності

В одному з аспектів, пропонуються аналізи для ідентифікації антитіл анти-TfR, що мають біологічну активність. Біологічна активність може включати, наприклад, перенесення сполуки, асоційованої/кон'югованої з антитілом, через BBB у головний мозок і/або CNS. Також пропонуються антитіла, що мають таку біологічну активність in vivo і/або in vitro.

У визначених варіантах здійснення, антитіло за даним винаходом досліджується на таку біологічну активність.

D. Імунокон'югати

Даний винахід також пропонує імунокон'югати, що містять антитіло анти-TfR за даним документом, кон'юговане з одним або декількома цитотоксичними агентами, такими як хіміотерапевтичні агенти або лікарські засоби, агенти для інгібування росту, токсини (наприклад, білкові токсини, ферментативно активні токсини бактеріального, грибкового, рослинного або тваринного походження або їхні фрагменти) або радіоактивні ізотопи.

В одному з варіантів здійснення, антитіло анти-TfR за даним документом зв'язано з лікарським засобом проти неврологічного розладу, хіміотерапевтичним агентом і/або агентом для одержання зображень для більш ефективного перенесення лікарського засобу, хіміотерапевтичного агента і/або радіофармацевтичного засобу через BBB.

Ковалентне кон'югування може бути або прямим, або через лінкер. У визначених варіантах здійснення, пряме кон'югування здійснюється за допомогою конструювання білка злиття (тобто за допомогою генетичного злиття двох генів, що кодують антитіло анти-TfR, і, наприклад, лікарський засіб проти неврологічного розладу, і експресування їх у вигляді одного білка). У визначених варіантах здійснення, пряме кон'югування здійснюється за допомогою утворення ковалентного зв'язку між реакційноздатною групою на одній із двох частин антитіла анти-TfR і відповідною групою або акцептором, наприклад, на неврологічному лікарському засобі. У визначених варіантах здійснення, пряме кон'югування здійснюється за допомогою модифікування (тобто генетичного модифікування) однієї з двох молекул, що повинні кон'югуватися, для включення реакційноздатної групи (як необмежувальні приклади, сульфгідрильної групи або карбоксильної групи), що утворює ковалентне приєднання до іншої молекули, що повинна кон'югуватися, при відповідних умовах. Як один із необмежувальних прикладів, молекула (наприклад, амінокислота) з бажаною реакційноздатною групою (наприклад, цистеїновим залишком) може вводитися в антитіло анти-TfR, і утворюється дисульфідний зв'язок, наприклад, з неврологічним лікарським засобом. Способи ковалентного кон'югування нуклеїнових кислот з білками також відомі в даній галузі (тобто фотозв'язування, дивися, наприклад, Zatsepin et al. Russ. Chem. Rev. 74:77-95 (2005)).

Нековалентне кон'югування може являти собою будь-які засоби нековалентного приєднання, включаючи гідрофобні зв'язки, іонні зв'язки, електростатичні взаємодії тощо, як можна легко зрозуміти фахівцю в даній галузі.

Кон'югування також може здійснюватися з використанням різноманітних лінкерів. Наприклад, антитіло анти-TfR і неврологічний лікарський засіб можуть кон'югуватися з використанням різних біфункціональних білкових зв'язувальних агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеімідометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоефірів (таких як диметиладипімідат HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глютаральдегід), біс-азидо сполуки (такі як біс(п-азидобензоїл)гександіамін), біс-діазонієві похідні (такі як біс-(п-діазонійбензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол 2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, рициновий імунотоксин може бути приготовлений, як описано в Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Мічена вуглецем-14 1-ізотіоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) являє собою ілюстративний хелатуючий агент для кон'югування радіоактивного нуклеотиду з антитілом. Дивися W094/11026. Пептидні лінкери, що складаються з однієї-двадцяти амінокислот, з'єднаних пептидними зв'язками, також можуть використовуватися. У визначених таких варіантах здійснення, амінокислоти вибираються з двадцяти амінокислот, що зустрічаються в природі. У визначених інших таких варіантах здійснення, одна або кілька амінокислот вибираються з гліцину, аланіну, проліну, аспарагіну, глютаміну і лізину. Лінкер може являти собою "відщеплюваний лінкер", що полегшує вивільнення неврологічного лікарського засобу при доставці в головний мозок. Можна використовувати, наприклад, кислотно-лабільний лінкер, пептидаза-чутливий лінкер, фотолабільний лінкер, диметиловий лінкер або дисульфід-вмісний лінкер (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); патент США № 5208020).

Даний винахід у явному вигляді розглядає, але не обмежуючись цим, кон'югати, отримані за допомогою крос-лінкерних реагентів, включаючи, але не обмежуючись цим, BMPS, EMCS,

GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC і сульфо-SMPB, і SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон)бензоат), що є комерційно доступними (наприклад, від Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

В одному з варіантів здійснення, імунокон'югат являє собою кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC), у якому антитіло кон'югується з одним або декількома лікарськими засобами, включаючи але не обмежуючись цим, майтансиноїд (дивися патенти США №№ 5208020, 5416064 і Європейський патент EP 0425235 B1); ауристатин, такий як залишки DE і DF лікарського засобу монометилауристатину (MMAE і MMAF) (дивися патенти США №№ 5635483 і 5780588, і 7498298); доластатин; каліхіміцин або його похідне (дивися патенти США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 і 5877296; Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); і Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)); антрациклін, такий як дауноміцин або доксорубіцин (дивися Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002); і патент США № 6630579); метотрексат; віндезин; таксан, такий як доцетаксель, паклітаксель, ларотаксель, тезетаксель і ортатаксель; трихотхецин і CC1065.

В іншому варіанті здійснення, імунокон'югат містить антитіло, як описано в даному документі, кон'юговане з ферментативно активним токсином або його фрагментом, включаючи але не обмежуючись цим, ланцюг А дифтерії, активні фрагменти токсину дифтерії, що не зв'язуються, ланцюг А екзотоксину (з Pseudomonas aeruginosa), ланцюг А рицину, ланцюг А абрину, ланцюг А модецину, альфа-сарцин, білки Aleurites fordii, білки діантини, білки Phytolaca americana (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор momordica charantia, курцин, кротин, інгібітор sapaonaria officinalis, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трикотецени.

В іншому варіанті здійснення, імунокон’югат містить антитіло, як описано в даному документі, кон'юговане з радіоактивним атомом з утворенням радіоактивного кон'югата. Доступні різноманітні радіоактивні ізотопи для одержання радіоактивних кон'югатів. Приклади включають At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} і радіоактивні ізотопи Lu. Коли для детектування використовують радіоактивний кон'югат, він може містити радіоактивний атом для сцинтиграфічних досліджень, наприклад, tc99m або I^{123}, або спінову мітку для одержання зображень за допомогою ядерного магнітного резонансу (ЯМР) (також відомого як магнітна резонансна томографія, MRI), таку, знову ж, як йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

E. Способи і композиції діагностики і детектування

У визначених варіантах здійснення, будь-яке з антитіл анти-TfR, запропонованих у даному документі, є корисними для детектування присутності TfR у біологічному зразку. Термін "детектування", як використовується в даному документі, охоплює кількісне або якісне детектування. У визначених варіантах здійснення, біологічний зразок містить клітину або тканину, наприклад, кров (наприклад, незрілі еритроцити), CSF і тканину, що містить BBB.

В одному з варіантів здійснення, пропонується антитіло анти-TfR для використання в способі діагностики або детектування. В іншому аспекті, пропонується спосіб детектування присутності TfR у біологічному зразку. У визначених варіантах здійснення, спосіб включає вступ у контакт біологічного зразка з антитілом анти-TfR, як описано в даному документі, при умовах, що дають можливість для зв'язування антитіла анти-TfR з TfR і для детектування того, чи утвориться комплекс між антитілом анти-TfR і TfR. Такий спосіб може являти собою спосіб in vitro або in vivo. В одному з варіантів здійснення, антитіло анти-TfR використовується для вибору суб'єктів, придатних для терапії за допомогою антитіла анти-TfR, наприклад, коли TfR являє собою біомаркер для вибору пацієнтів.

Ілюстративні розлади, що можуть діагностуватися з використанням антитіла за даним винаходом, включають розлади за участю незрілих еритроцитів, завдяки тому факту, що TfR експресується в ретикулоцитах і з цієї причини є детектованим за допомогою будь-яких антитіл за даним винаходом. Такі розлади включають анемію й інші розлади, що виникають через знижені рівні ретикулоцитів, або уроджену поліцитемію або справжню неопластичну поліцитемію, де підвищені кількості еритроцитів через гіперпроліферацію, наприклад, ретикулоцитів, дає в результаті загущення крові і супутні фізіологічні симптоми.

У визначених варіантах здійснення пропонуються мічені антитіла анти-TfR. Мітки включають, але не обмежуючись цим, мітки або залишки, що детектуються безпосередньо (наприклад, флуоресцентні, хромофорні, електронно-оплотні, хемілюмінесцентні і радіоактивні мітки), а також, такі залишки, як ферменти або ліганди, що детектуються опосередковано,

наприклад, за допомогою ферментативної реакції або молекулярної взаємодії. Ілюстративні мітки включають, але не обмежуючись цим, радіоізотопи ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H і ^{131}I, флюорофори, такі як хелати рідкоземельних металів або флуоресцеїн і їхні похідні, родамін і його похідні, данзил, умбеліферон, люциферази, наприклад, люциферазу світлячків і бактеріальну люциферазу (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофталазиндіони, пероксидазу хрону (HRP), лужну фосфатазу, β-галактозидазу, глюкоамілазу, лізозим, сахаридоксидази, наприклад, глюкозаоксидазу, галактозаоксидазу і глюкоза-6-фосфатдегідрогеназу, гетероциклічні оксидази, такі як уриказа і ксантиноксидаза, зв'язані з ферментом, що використовує перекис водню для окислювання попередника барвника, такого як HRP, лактопероксидазу або мікропероксидазу, біотин/авідин, спінові мітки, бактеріофагові мітки, стабільні вільні радикали тощо.

В одному з варіантів здійснення, у інтактного антитіла відсутня ефекторна функція. В іншому варіанті здійснення, інтактне антитіло має знижену ефекторну функцію. В іншому варіанті здійснення, інтактне антитіло одержують за допомогою генної інженерії, щоб воно мало знижену ефекторну функцію. В одному з аспектів, антитіло являє собою Fab. В іншому аспекті, антитіло має одну або декілька Fc-мутацій, що зменшують або усувають ефекторну функцію. В іншому аспекті, антитіло має модифіковане глікозилування, наприклад, завдяки продукуванню антитіла в системі, у якій відсутні нормальні ферменти глікозилування людини. В іншому аспекті, основний ланцюг Ig модифікується до ланцюга, що природним способом має знижену ефекторну функцію або взагалі її не має.

Доступні різноманітні методики для визначення зв'язування антитіла з TfR. Один з таких аналізів являє собою імуносорбентний аналіз за допомогою зв'язаного ферменту (ELISA) для підтвердження здатності до зв'язування з TfR людини (і з антигеном головного мозку). Відповідно до цього аналізу, планшети, покриті антигеном (наприклад, рекомбінантним TfR), інкубуються разом зі зразком, що містить антитіло анти-TfR, і визначається зв'язування антитіла з антигеном, що становить інтерес.

Аналізи для оцінки споживання антитіла, що системно вводиться, і іншої біологічної активності антитіла можуть здійснюватися, як описано в прикладах або як відомо для антитіла анти-антиген CNS, що становить інтерес.

В одному з аспектів, пропонуються аналізи для ідентифікації антитіл анти-TfR, кон'югованих (або ковалентно, або нековалентно) з антитілами анти-BACE1, що мають біологічну активність. Біологічна активність може включати, наприклад, інгібування активності аспартилпротеази BACE1. Також пропонуються антитіла, що мають таку ж біологічну активність in vivo і/або in vitro, наприклад, як оцінюється за допомогою гомогенного флуоресцентного аналізу HTRF з розрізненням за часом або мікрогідродинамічного капілярного електрофоретичного аналізу (MCE) з використанням синтетичних пептидів як субстрата або in vivo у лініях клітин, що експресують субстрати BACE1, такі як APP.

F. Фармацевтичні препарати

Фармацевтичні препарати для анти-TfR, як описано в даному документі, готують за допомогою змішування такого антитіла, що має бажаний ступінь чистоти, з одним або декількома необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями, наповнювачами або стабілізаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), у формі ліофілізованих препаратів або водних розчинів. Фармацевтично прийнятні носії, наповнювачі або стабілізатори є, як правило, нетоксичними для реципієнтів при використовуваних дозуваннях і концентраціях і включають, але не обмежуючись цим: буфери, такі як фосфатний, цитратний і інші органічні кислоти; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензиламонійхлорид; гексаметонійхлорид; бензалконійхлорид, бензетонійхлорид; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол і м-крезол); низькомолекулярні (менше приблизно ніж 10 залишків) поліпептиди; білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глютамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди й інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, такі як EDTA; цукри, такі як сахароза, манітол, трегалоза або сорбітол; протиіони, що формують солі, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, комплекси Zn-білок) і/або неіонні поверхнево-активні речовини, такі як поліетиленгліколь (PEG). Ілюстративні фармацевтично прийнятні носії за даним документом додатково включають агенти для диспергування лікарських засобів у кишечнику, такі як розчинні нейтрально-активні глікопротеїни гіалуронідази (sHASEGP), наприклад, розчинні глікопротеїни гіалуронідази людини PH-20, такі як rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Визначені ілюстративні sHASEGPs і їхні способи використання, включаючи rHuPH20, описані в публікаціях патентів

США № 2005/0260186 і 2006/0104968. В одному з аспектів, sHASEGP поєднується з однією або декількома додатковими глікозаміногліканазами, такими як хондроїтинази.

Ілюстративні ліофілізовані препарати антитіла описані в патенті США № 6267958. Водні препарати антитіла включають ті, які описані в патенті США № 6171586 і в WO 2006/044908, останні препарати включають гістидин-ацетатний буфер.

Препарат за даним документом може також містити кілька активних інгредієнтів, як необхідно для конкретного показання, що лікується, переважно, інгредієнтів із комплементарними активностями, що не впливають негативно один на одного. Наприклад, було б бажаним запропонувати один або кілька активних інгредієнтів для лікування невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, розладу очного захворювання, епілептичного розладу, лізосомної хвороби нагромадження, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, розладу поведінки або запалення CNS. Такі ілюстративні лікарські препарати обговорюються в даному документі нижче. Такі активні інгредієнти присутні відповідним чином у сполученні, у кількостях, що є ефективними для передбачуваної мети.

Активні інгредієнти можуть бути захоплені в приготовлені мікрокапсули, наприклад, за допомогою методик коацервації, або за допомогою полімеризації на границі розділу, наприклад, мікрокапсул з гідроксиметилцелюлози або желатину і полі(метилметакрилатних) мікрокапсул, відповідно, у колоїдних системах доставки лікарських засобів (наприклад, у ліпосомах, альбумінових мікросферах, мікроемульсіях, наночастинках і нанокапсулах) або в макроемульсіях. Такі методики описані, наприклад, у Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Один або кілька активних інгредієнтів можуть інкапсулюватися в ліпосомах, що з'єднані антитілами анти-TfR, описаними в даному документі (дивися, наприклад, публікацію заявки на патент США № 20020025313).

Можуть бути приготовлені препарати із затримкою вивільнення. Відповідні приклади препаратів із затримкою вивільнення включають напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло; ці матриці мають форму формованих виробів, наприклад плівок або мікрокапсул. Необмежувальні приклади матриць із затримкою вивільнення включають складні поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксіетил-метакрилат) або полі(вініловий спирт)), поліактиди (патент США № 3773919), співполімери L-глютамінової кислоти і γ етил-L-глютамату, недеградований етиленвінілацетат, деградовані співполімери молочна кислота - гліколева кислота, такі як LUPRON DEPOT™ (мікросфери для ін'єкцій, що складаються із співполімеру молочна кислота - гліколева кислота і леупроліду ацетату) і полі-D-(-)-3-гідроксимасляної кислоти.

Препарати, що повинні використовуватися для введення in vivo, як правило, є стерильними. Стерильність може бути легко отримана, наприклад, за допомогою фільтрування через мембрани для стерильного фільтрування.

G. Терапевтичні способи і композиції

Будь-яке з антитіл анти-TfR, запропонованих у даному документі, можна використовувати в терапевтичних способах. В одному з аспектів пропонується антитіло анти-TfR для застосування як лікарського препарату. Наприклад, даний винахід пропонує спосіб перенесення терапевтичної сполуки через гематоенцефалічний бар'єр зі зменшенням або усуненням впливу на популяції еритроцитів, що включає експонування антитіла анти-TfR, зв'язаного з терапевтичною сполукою (наприклад, мультиспецифічного антитіла, що зв'язується як з TfR, так і з антигеном головного мозку), для BBB таким чином, що антитіло переносить терапевтичну сполуку, зв’язану з ним, через BBB. В іншому прикладі, даний винахід пропонує спосіб перенесення лікарського засобу проти неврологічного розладу через гематоенцефалічний бар'єр, що включає експонування антитіла анти-TfR за даним винаходом, зв'язаного з лікарським засобом проти розладу головного мозку (наприклад, мультиспецифічного антитіла, що зв'язується як з TfR, так і з антигеном головного мозку), для BBB таким чином, що антитіло переносить лікарський засіб проти неврологічного розладу, зв'язаний з ним, через BBB зі зменшенням або усуненням впливу на популяції еритроцитів. В одному з варіантів здійснення, BBB є в ссавця (наприклад, людини), наприклад, такого, який має неврологічний розлад, включаючи, без обмеження: хворобу Альцгеймера (AD), інсульт, деменцію, м'язову дистрофію (MD), множинний склероз (MS), бічний аміотрофічний склероз (ALS), кістозний фіброз, синдром Ейнджелмена, синдром Лідла, хворобу Паркінсона, хворобу Піка, хворобу Педжета, рак, травматичне ушкодження головного мозку тощо.

В одному з варіантів здійснення, неврологічний розлад вибирається з: невропатичного розладу, амілоїдозу, раку (наприклад, включаючи рак CNS або рак головного мозку), очного захворювання або розладу, вірусної або мікробної інфекції, запалення (наприклад, CNS або головного мозку), ішемії, нейродегенеративного захворювання, епілепсії, розладу поведінки,

лізосомної хвороби нагромадження тощо. Антитіла за даним винаходом є особливо корисними для лікування таких неврологічних розладів завдяки їх здатності переносити один або кілька асоційованих активних інгредієнтів/зв'язаних терапевтичних сполук через BBB і в CNS/головний мозок, де такі розлади знаходять їх молекулярну, клітинну або вірусну/мікробну основу.

Невропатичні розлади являють собою захворювання або порушення нервової системи, що відрізняються невідповідною або неконтрольованою передачею нервових сигналів або її відсутністю, і включають, але не обмежуючись цим, хронічний біль (включаючи ноцицептивний біль), біль, який викликається ушкодженням тканин організму, включаючи біль, пов'язаний з раком, невропатичний біль (біль, який викликається порушеннями в нервах, спинному мозку або в головному мозку) і психогенний біль (повністю або здебільшого пов'язаний з психологічним розладом), цефалгію, мігрень, невропатію і симптоми і синдроми, що часто супроводжують невропатичні розлади, такі як запаморочення або нудота.

Для невропатичного розладу може бути вибраний неврологічний лікарський засіб, що являє собою анальгетик, включаючи, але не обмежуючись цим, наркотичний/опіоїдний анальгетик (тобто морфін, фентаніл, гідрокодон, меперидин, метадон, оксиморфон, пентазоцин, пропоксифен, трамадол, кодеїн і оксикодон), нестероїдний протизапальний лікарський засіб (NSAID) (тобто ібупрофен, напроксен, диклофенак, дифлунізал, етодолак, фенопрофен, флурбіпрофен, індометацин, кеторолак, мефенамову кислоту, мелоксикам, набуметон, оксапрозин, піроксикам, суліндак і толметин), кортикостероїд (тобто кортизон, преднізон, преднізолон, дексаметазон, метилпреднізолон і триамцинолон), агент проти мігрені (тобто суматриптин, алмотриптам, фроватриптам, суматриптам, ризатриптам, елетриптам, золмітриптам, дигідроерготамін, елетриптам і ерготамін), ацетамінофен, саліцилат (тобто аспірин, холін саліцилат, магній саліцилат, дифлунізал і салсалат), анти-конвульсант (тобто карбамазепін, клоназепам, габапентин, ламотригін, прегабалін, тіагабін і топірамат), болезаспокійливі засоби (тобто ізофлуран, трихлоретилен, галотан, севофлуран, бензокаїн, хлорпрокаїн, кокаїн, циклометикаїн, диметокаїн, пропоксикаїн, прокаїн, новокаїн, пропаракаїн, тетракаїн, артикаїн, бупівакаїн, картикаїн, цинхокаїн, етидокаїн, левобупівакаїн, лідокаїн, мепівакаїн, піперокаїн, прилокаїн, ропівакаїн, тримекаїн, сакситоксин і тетродотоксин) і інгібітор cox-2 (тобто целококсиб, рофекоксиб і валдекоксиб). Для невропатичного розладу із запамороченнями може бути вибраний неврологічний лікарський засіб, що являє собою агент проти запаморочення, включаючи, але не обмежуючись цим, меклізин, дифенгідрамін, прометазин і діазепам. Для невропатичного розладу з нудотою може бути вибраний неврологічний лікарський засіб, що являє собою агент проти нудоти, включаючи, але не обмежуючись цим, прометазин, хлорпромазин, прохлорпемазин, триметобензамід і метоклопрамід.

Амілоїдози являють собою групу захворювань і розладів, пов'язаних із позаклітинними білковими відкладеннями в CNS, включаючи, але не обмежуючись цим, вторинний амілоїдоз, віковий амілоїдоз, хворобу Альцгеймера (AD), помірні когнітивні порушення (MCI), деменцію з тільцями Леві, синдром Дауна, спадковий крововилив у мозок з амілоїдозом (Голландського типу); Гуамський комплекс хвороба Паркінсона - деменція, церебральну амілоїдну ангіопатію, хворобу Хантингтона, прогресуючий супрануклеарний параліч, множинний склероз; хворобу Крейтцфельда-Якоба, хворобу Паркінсона, трансмісивну губчату енцефалопатію, деменцію, пов'язану з ВІЛ, аміотропний латеральний склероз (ALS), міозит із включеними тільцями (IBM) і очні захворювання, пов'язані з відкладеннями бета-амілоїдів (тобто дистрофію жовтої плями, пов'язану з друзами невропатію зорового нерва і катаракту).

Проти амілоїдозу може бути вибраний неврологічний лікарський засіб, що включає, але не обмежуючись цим, антитіло або іншу молекулу, що зв'язується (включаючи, але не обмежуючись цим, малу молекулу, пептид, аптамер або інший білковий зв’язувальний агент), яка специфічно зв'язується з мішенню, вибраною з: бета секретази, тау, презеніліну, білка-попередника амілоїду або його частин, пептиду бета амілоїду або їх олігомерів або фібрил, рецептора загибелі 6 (DR6), рецептора кінцевих продуктів посиленого глікозилування (RAGE), паркіну і хантингтину; інгібітор холінестерази (тобто галантамін, донепезил, ривастигмін і такрин); антагоніст рецептора NMDA (тобто мемантин), деплетор моноаміну (тобто тетрабеназин); ерголоїд мезилат; антихолінергічний антипаркінсонічний агент (тобто проклідин, дифенгідрамін, тригексилфенідил, бензтропін, біпериден і тригексилфенідил); дофамінергічний антипаркінсонічний агент (тобто ентакапон, селегілін, праміпексол, бромкриптин, ротиготин, селегілін, ропінірорл, расагілін, апоморфін, карбідопа, леводопа, перголід, толкапон і амантадин); тетрабеназин; протизапальний лікарський засіб (включаючи, але не обмежуючись цим, нестероїдний протизапальний лікарський засіб (тобто індометацин і інші сполуки, перераховані вище); гормон (тобто естроген, прогестерон і леупролід); вітамін (тобто фолат і

нікотинамід); димеболін; гомотаурин (тобто 3-амінопропансульфонову кислоту; 3 APS); модулятор активності рецепторів серотоніну (тобто ксаліпроден); інтерферон і глюкокортикоїд.

Ракові захворювання CNS відрізняються аберантною проліферацією однієї або декількох клітин CNS (тобто нервових клітин) і включають, але не обмежуючись цим, гліому, гліобластому мультиформ, менінгіому, астроцитому, невриному слухового нерва, хондрому, олігодендрогліому, медулобластому, гангліогліому, шваному, нейрофіброму, нейробластому і екстрадуральні, інтрамедулярні або інтрадуральні пухлини.

Проти раку може бути вибраний неврологічний лікарський засіб, що являє собою хіміотерапевтичний агент. Приклади хіміотерапевтичних агентів включають алкілуючі агенти, такі як тіотепа і циклофосфамід CYTOXAN®; алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азиридини, такі як бензодопа, карбоквон, метуредопа й уредопа; етиленіміни і метиламеламіни, включаючи альтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфор-амід і триметилоломеламін; ацетогеніни (зокрема, булатацин і булатацинон); дельта-9-тетрагідроканабіол (дронабінол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхіцини; бетулінову кислоту; камптотецин (включаючи синтетичний аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (іринотекан, CAMPTOSA ®), ацетилкамптотецин, скополектин і 9-амінокамптотецин); бріостатин; калістатин; CC-1065 (включаючи його синтетичні аналоги адозелезин, карзелезин і бізелезин); подофілотоксин; подофілінову кислоту; теніпозид; криптофіцини (зокрема, криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги, KW-2189 і CB1-TM1); елеутеробін; панкратистатин; саркодиктиїн; спонгістатин; азотні гірчиці, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретам, мехлоретам оксид гідрохлорид, мелфалан, новембіхін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урацилову гірчицю; нітрозосечовини, такі як кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, німустин і ранімнустин; антибіотики, такі як енедіїнові антибіотики (наприклад, каліхіміцин, зокрема, каліхіміцин гамма1I і каліхіміцин омега1I (дивися, наприклад, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)); динеміцин, включаючи динеміцин A; есперамiцин; а також неокарциностатиновий хромофор і споріднені хромопротеїнові енединові антибіотичні хромофори), аклациномізини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, сактиноміцин, карабіцин, карміноміцин, карзинофілін, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубіцин ADRIAMYCIN® (включаючи морфоліно-доксорубіцин, ціаноморфоліно-доксорубіцин, 2-піроліно-доксорубіцин і діоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцеломіцин, мітоміцини, такі як мітоміцин C, мікофенолова кислота, ногаламіцин, олівоміцини, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, хеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, зиностатин, зорубіцин; анти-метаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуринові аналоги, такі як флударабін, 6-меркатопурин, триаміприн, тіогуанін; піримідинові аналоги, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидеоксіуридин, доксифлуридин, еноцитабін, фіоксуридин; андрогени, такі як калустерон, дромостанолон пропіонат, епітіостанол, мепітіостан, тестолактон; агенти проти пухлини надниркових залоз, такі як аміно, мітотан, трилостан; поповнювач фолієвої кислоти, такий як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфамід глікозид; амінолевулінову кислоту; енілурацил; амсакрин; бестрабуцил; бісантрен; едатраксат; дефофамін; демеколцин; діазихінон; елфорнітин; еліптиній ацетат; епотилон; етоглюцид; галій нітрат; гідроксисечовину; лентинан; лонідаїнін; майтансиноїди, такі як майтансин і ансамітоцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопіданмол; нітраерин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лосоксантрон; 2-етилгідразид; прокарбазин; полісахаридний комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофіран; спірогерманій; тенуазонову кислоту; триазихон; 2,2',2"-трихлортриетиламін; трихотецени (зокрема, токсин T-2, веракурин A, роридин A і ангуїдин); уретан; віндезин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; маномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид ("Ara-C"); тіотепа; таксоїди, наприклад, паклітаксель TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE^{TM}, що не містить кремофору, отриманий за допомогою генної інженерії препарат паклітакселю в наночастинках альбуміну (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois) і доксетаксель TAXOTERE® (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлоранбуцил; генцитабін (GEMZAR®); 6-тіогуанін; меркатопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин (VELBAN®); платину; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоксантрон; вінкристин (ONCOVIN®); оксаліплатин; лейкововін; вінорельбін (NAVELBINE®); новатрон; едатрексат; дауноміцин; аміноптерин; ібандронат; інгібітор топоізомерази RFS 2000; дифторметилорнітин (DMFO); ретиноїди, такі як ретиноєва кислота; капецитабін (XELODA®); фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-яких із зазначених вище сполук; а

також сполучення двох або більше із зазначених вище сполук, такі як CHOP, скорочене найменування препарату для сполученої терапії з циклофосфаміду, доксорубіцину, вінкристину і преднізолону, і FOLFOX, скорочене найменування для режиму лікування за допомогою оксаліплатину (ELOXATF TM), об'єднаного з 5-FU і лейкововіном.

У це визначення також включаються хіміотерапевтичні агенти, що являють собою антигормональні агенти, що діють для регулювання, зменшення, блокування або інгібування впливу гормонів, що можуть сприяти росту раку і часто мають форму системного або призначеного для лікування організму в цілому препарату. Вони самі можуть являти собою гормони. Приклади включають анти-естрогени і селективні модулятори рецепторів естрогенів (SERM), включаючи, наприклад, тамоксифен (включаючи тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен EVISTA®, дролоксифен, 4-гідроксітамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, опаристон і тореміфен FARESTON®; анти-прогестерони; даун-регулятори рецепторів естрогенів (ERD); агенти, що функціонують для пригнічення або вимикання яєчників, наприклад, агоністи гормону, що вивільняє леутинізуючий гормон (LHRH), такі як леупролід ацетат LUPRON® і ELIGARD®, гозерелін ацетат, бусерелін ацетат і триптерелін; інші анти-андрогени, такі як флутамід, нілутамід і бікалутамід; і інгібітори ароматази, що інгібують фермент ароматазу, що регулює продукування естрогенів у надниркових залозах, такі, наприклад, як 4(5)-імідазоли, аміноглютетимід, мегестрол ацетат MEGASE®, екземестан AROMASIN®, formestanie, фадрозол, ворозол RIVISOR®, летрозол FEMARA® і анастрозол ARIMIDEX®. На додаток до цього, таке визначення хіміотерапевтичних агентів включає бісфосфонати, такі як клодронат (наприклад, BONEFOS® або OSTAC®), етидронат DIDROCAL®, NE-58095, золедронову кислоту/золедронат ZOMETA®, алендронат FOSAMAX®, памідронат AREDIA®, тилудронат SKELID® або ризедронат ACTONEL®; а також троксацитабін (аналог 1,3-діоксолан нуклеозиду цитозину); антисмислові олігонуклеотиди, зокрема, ті, які інгібують експресування генів у шляхах передачі сигналів, що беруть участь в аберантній проліферації клітин, такі, наприклад, як PKC-альфа, Raf, H-Ras і рецептор епідермального фактора росту (EGF-R); вакцини, такі як вакцина THERATOPE®, і вакцини для генної терапії, наприклад, вакцина ALLOVECTF®, вакцина LEUVECTIN® і вакцина VAXID®; інгібітор топоізомерази 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; лапатиніб дитозилат (подвійний низькомолекулярний інгібітор тирозинкінази ErbB-2 і EGFR, також відомий як GW572016) і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-яких із зазначених вище сполук.

Інша група сполук, що можуть бути вибрані як неврологічні лікарські засоби для лікування або запобігання раку, являють собою протиракові імуноглобуліни (включаючи, але не обмежуючись цим, транстузумаб, петузумаб, бевацизумаб, алемтуксумаб, цетуксимаб, гемтузумаб озогаміцин, ібритумомаб тіуксетан, панітумаб і ритуксимаб). У деяких випадках, антитіла в кон'югуванні з токсичною міткою або кон'югатом можна використовувати для націлювання і знищення бажаних клітин (тобто ракових клітин), включаючи, але не обмежуючись цим, тозитумомаб разом з радіоізотопною міткою ^{131}I або транстузумаб емтанзин.

Очні захворювання або розлади являють собою захворювання або розлади очей, що для цілей даного документа вважаються органами CNS, відділеними за допомогою BBB. Очні захворювання або розлади включають, але не обмежуючись цим, розлади склери, рогівки, райдужної оболонки і війчастого тіла (тобто склерит, кератит, виразку рогівки, ерозію рогівки, сніжну сліпоту, опік очей, поверхневий точковий кератит Тайджесона, неоваскуляризацію рогівки, дистрофію Фукса, кератоконус, сухий кератокон'юнктивіт, запалення райдужної оболонки ока й увеїти), розлади кришталика (тобто катаракту), розлади судинної оболонки і сітківки ока (тобто відшарування сітківки, ретиношизис, гіпертонічну ретинопатію, діабетичну ретинопатію, ретинопатію, ретинопатію недоношених, вікову дистрофію жовтої плями, дистрофію жовтої плями (вологу або суху), епіретинальну мембрану, пігментну дистрофію сітківки і макулярний набряк), глаукому, плаваюче помутніння, розлади зорового нерва і зорових шляхів (тобто спадкову нейропатію зорового нерва Лебера і друзи диска зорового нерва), розлади очних м'язів/акомодації/рефракції бінокулярного руху (тобто косоокість, офтальмопарез, прогресуючу зовнішню офтальмоплегію, езотропію, екзотропію, далекозорість, короткозорість, астигматизм, анізометропію, старечу далекозорість і параліч очних м'язів), розлади зору і медичну сліпоту (тобто амбліопію, спадковий амвроз Левера, скотому, колірну сліпоту, повну колірну сліпоту, нікталопію, медичну сліпоту, річкову сліпоту і мікроофтальмію/колобому), червоне око, зіницю Аргіла Робертсона, кератомікоз, ксерофтальмію й анданіридію.

Проти очного захворювання або розладу може бути вибраний неврологічний лікарський засіб, що являє собою анти-ангіогенний офтальмологічний агент (тобто бевацизумаб, ранібізумаб і пегаптаніб), офтальмологічний агент проти глаукоми (тобто карбахол, епінефрин,

демекарійбромід, апраклонідин, бримонідин, бринзоламід, левобунолол, тимолол, бетаксолол, дорзоламід, біматопрост, картеолол, метипранолол, дипівефрин, травопрост і латанопрост), інгібітор вугільної ангідрази (тобто метазоламід і ацетазоламід), офтальмологічний антигістаміний засіб (тобто нафазолін, фенілефрин і тетрагідрозолін), змащувальну речовину для очей, офтальмологічний стероїд (тобто фторметолон, преднізолон, лотепреднол, дексаметазон, дифлупреднат, римексолон, флуоцинолон, медризон і триамцинолон), офтальмологічний анестетик (тобто лідокаїн, пропаракаїн і тетракаїн), офтальмологічний протиінфекційний засіб (тобто левофлоксацин, гатифлоксацин, ципрофлоксацин, моксифлоксацин, хлорамфенікол, бацитрацин/поліміксин b, сульфацетамід, тобраміцин, азитроміцин, безифіоксацин, норфлоксацин, сульфізоксазол, гентаміцин, ідоксуридин, еритроміцин, натаміцин, граміцидин, неоміцин, офлоксацин, трифлуридин, ганцикловір, відарабін), офтальмологічний протизапальний агент (тобто нерафенак, кеторолак, флурбіпрофен, супрофен, циклоспорин, триамцинолон, диклофенак і бромфенак) і офтальмологічний антигістамінний засіб або деконгестант (тобто кетотифен, олопатадин, епінастин, нафазолін, кромолін, тетрагідрозолін, пеміроласт, бепостатин, нафазолін, фенілефрин, недокромил, лодоксамід, фенілефрин, емедастатин і азеластин).

Вірусні або мікробні інфекції CNS включають, але не обмежуючись цим, інфекції вірусів (тобто грипу, ВІЛ, вірусу поліомієліту, краснухи), бактерій (тобто Neisseria sp., Streptococcus sp., Pseudomonas sp., Proteus sp., E. coli, S. aureus, Pneumococcus sp., Meningococcus sp., Haemophilus sp., і Mycobacterium tuberculosis) і інших мікроорганізмів, таких як грибки (тобто дріжджі, Cryptococcus neoformans), паразитів (тобто toxoplasma gondii), або амеб, що приводять у результаті до патофізіології CNS, включаючи, але не обмежуючись цим, менінгіт, енцефаліт, мієліт, васкуліт і абсцес, що можуть бути гострими або хронічними.

Проти вірусного або мікробного захворювання може бути вибраний неврологічний лікарський засіб, що включає, але не обмежуючись цим, противірусну сполуку (включаючи, але не обмежуючись цим, адамантановий противірусний лікарський засіб (тобто римантадин і амантадин), противірусний інтерферон (тобто пегінтерферон альфа-2b), антагоніст рецептора хемокінів (тобто маравірок), інгібітор перенесення ланцюга інтегрази (тобто ральтегравір), інгібітор нейрамінідази (тобто озельтамівір і занамівір), ненуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази (тобто ефавіренз, етравірин, делавірдин і невірапін), нуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази (тенофовір, абакавір, ламівудин, зидовудин, ставудин, ентекавір, емтрицитабін, адефовір, зальцитабін, тельбівудин і диданозин), інгібітор протеази (тобто дарунавір, атазанавір, фосампренавір, типранавір, ритонавір, нельфмавір, ампренавір, індинавір і саквінавір), пуриновий нуклеозид (тобто валацикловір, фамцикловір, ацикловір, рибавірин, ганцикловір, вальганцикловір і цидофовір) і різноманітні противірусні лікарські засоби (тобто енфувіртид, фоскарнет, палівізумаб і фомівірсен)), антибіотик (включаючи, але не обмежуючись цим, амінопеніцилін (тобто амоксицилін, ампіцилін, оксацилін, нафцилін, клоксацилін, диклоксацилін, флукоксацилін, темоцилін, азлоцилін, карбеніцилін, тицарцилін, мезлоцилін, піперацилін і бакампіцилін), цефалоспорин (тобто цефазолін, цефалексин, цефалотин, цефамандол, цефтриаксон, цефотаксим, цефподоксим, цефтазидим, цефадроксил, цефрадин, лоракарбеф, цефотетан, цефуроксим, цефрозил, цефаклор і цефокситин), карбапенем/пенем (тобто іміпенем, меропенем, ертапенем, фаропенем і дорипенем), монобактам (тобто азтреонам, тигеноман, норкардицин А і табтоксинін-бета-лактам, інгібітор бета-лактамази (тобто клавуланову кислоту, тазобактам і сульбактам) у кон'югуванні з іншим бета-лактамовим антибіотиком, аміноглікозид (тобто амікацин, гентаміцин, канаміцин, неоміцин, нетилміцин, стрептоміцин, тобраміцин і паромоміцин), ансаміцин (тобто гелданаміцин і гербіміцин), карбацефем (тобто лоракабеф), глікопептиди (тобто тейкопланін і ванкоміцин), макролід (тобто азитроміцин, кларитроміцин, диритроміцин, еритроміцин, рокситроміцин, тролеандоміцин, телітроміцин і спектиноміцин), монобактам (тобто азтреонам), хінолон (тобто ципрофлоксацин, еноксацин, гатифлоксацин, левофлоксацин, ломефлоксацин, моксифлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, тровафлоксацин, грепафлоксацин, спарфлоксацин і темафлоксацин), сульфонамід (тобто мафенід, сульфонамідохризоїдин, сульфацетамід, сульфадіазин, сульфаметизол, сульфаніламід, сульфасалазин, сульфізоксазол, триметоприм, триметоприм і сульфаметоксазол), тетрациклін (тобто тетрациклін, демеклоциклін, доксициклін, міноциклін і окситетрациклін), протипухлинний або цитотоксичний антибіотик (тобто доксорубіцин, мітоксантрон, блеоміцин, даунорубіцин, дактиноміцин, епірубіцин, ідарубіцин, плікаміцин, мітоміцин, пентостатин і вальрубіцин) і різноманітні антибактеріальні сполуки (тобто бацитрацин, колістин і поліміксин B)), протигрибкові засоби (тобто метронідазол, нітазоксанід, тинідазол, хлорохін, йодхінол і паромоміцин) і протипаразитарні засоби (включаючи, але не обмежуючись цим, хінін, хлорохін,

амодіахін, піриметамін, сульфадоксин, прогуаніл, мефлохін, атовахон, примахін, артемезинін, галофантрин, доксициклін, кліндаміцин, мебендазол, пірантел памоат, тіабендазол, діетилкарбамазин, івермектин, рифампін, амфотерицин B, мералсопрол, ефорнітин і альбендазол).

Запалення CNS включає, але не обмежуючись цим, запалення, що викликається ушкодженням CNS, що може являти собою фізичне ушкодження (тобто через нещасний випадок, хірургічну операцію, травму головного мозку, ушкодження спинного мозку, струс головного мозку) і ушкодження, викликане одним або декількома іншими захворюваннями або розладами CNS (тобто абсцесом, раком, вірусною або мікробною інфекцією) або пов'язане з ним.

Проти запалення CNS може бути вибраний неврологічний лікарський засіб, що відповідає самому запаленню (тобто нестероїдний протизапальний агент, такий як ібупрофен або напроксен), або такий, який лікує причину запалення (тобто противірусний або протираковий агент).

Ішемія CNS, як використовується в даному документі, стосується групи розладів, що стосуються аберантного кровотоку або судинної поведінки в головному мозку або викликаючих його, і включає, але не обмежуючись цим: місцеву ішемію головного мозку, загальну ішемію головного мозку, інсульт (тобто субарахноїдальний крововилив і внутрішньомозковий крововилив) і аневризму.

Проти ішемії може бути вибраний неврологічний лікарський засіб, що включає, але не обмежуючись цим, тромболітичний лікарський засіб (тобто урокіназу, альтеплазу, ретеплазу і тенеклеплазу), інгібітор агрегації тромбоцитів (тобто аспірин, цилостазол, клопідогрель, прасугрель і дипіридамол), статин (тобто ловастатин, правастатин, флувастатин, розувастатин, аторвастатин, симвастатин, церивастатин і пітавастатин) і сполука для поліпшення кровотоку або гнучкості судин, включаючи, наприклад, лікарські препарати проти підвищеного кров'яного тиску.

Нейродегенеративні захворювання являють собою групу захворювань і розладів, асоційованих із втратою функцій або загибеллю нервових клітин у CNS, і включають, але не обмежуючись цим: адренолейкодистрофію, хворобу Олександра, хворобу Альпера, бічний аміотрофічний склероз, атаксію-телеангіектазію, хворобу Баттена, кокаїновий синдром, кортикобазальну дегенерацію, дегенерацію, яка викликається амілоїдозом або асоційована з ним, атаксію Фрідрейха, лобово-скроневу лобарну дегенерацію, хворобу Кеннеді, множинну системну атрофію, множинний склероз, первинний латеральний склероз, прогресуючий супрануклеарний параліч, спінальну м'язову атрофію, поперечний мієліт, хворобу Рефсума і спінально-церебелярну атаксію.

Проти нейродегенеративного захворювання може бути вибраний неврологічний лікарський засіб, що являє собою гормон росту або нейротрофічний фактор; приклади включають але не обмежуючись цим, отриманий з головного мозку нейротрофічний фактор (BDNF), фактор росту нервових клітин (NGF), нейротрофін-4/5, фактор росту фібробластів (FGF)-2 і інші FGF, нейротрофін (NT)-3, еритропоетин (EPO), фактор росту гепатоцитів (HGF), фактор епідермального росту (EGF), трансформуючий фактор росту (TGF)-альфа, TGF-бета, фактор росту ендотелію судин (VEGF), антагоніст рецептора інтерлейкіну-1 (IL-1ra), циліарний нейротрофічний фактор (CNTF), гліальний нейротрофічний фактор (GDNF), нейртурин, тромбоцитарний фактор росту (PDGF), херегулін, нейрегулін, артемін, персефін, інтерлейкіни, нейротрофічний фактор гліальної клітинної лінії (GFR), фактор, що стимулює колонії гранулоцитів (CSF), CSF гранулоцитів-макрофагів, нетрини, кардіотрофін-1, білки хеджехоги, інгібіторний фактор лейкемії (LIF), мідкін, плейотрофін, морфогенетичні білки кісток (BMP), нетрини, сапозини, семафорини і фактор стовбурових клітин (SCF).

Захворювання епілепсії і розлади CNS включають невідповідну і/або аномальну електропровідність у CNS, і вони включають, але не обмежуючись цим епілепсію (тобто малий епілептичний напад, атонічний напад, доброякісну дитячу епілепсію, ювенільний абсанс, клонічні судоми, комплексні парціальні судоми, лобову епілепсію, пропасні судоми, дитячі судоми, ювенільну міоклонічну епілепсію, ювенільну абсансну епілепсію, синдром Леннокса-Гасто, синдром Ландау-Клефнера, синдром Драве, синдром Отахарі, синдром Веста, міоклонічні судоми, мітохондріальні розлади, прогресуючий міоклонічний епілептичний напад, психогенні судоми, рефлекторну епілепсію, синдром Расмусена, прості парціальні судоми, вторинні генералізовані судоми, скроневу епілепсію, тоноклонічні судоми, тонічні судоми, психомоторні епілептичні напади, лімбічну епілепсію, парціальні напади, генералізовані напади, епілептичний статус, абдомінальну епілепсію, акінетичні напади, спонтанні напади, масивні двосторонні міоклонічні судоми, катаменіальну епілепсію, судоми з падіннями, емоційні судоми,

фокальний епілептичний напад, епілептичні напади сміху, Джексонівську епілепсію, хворобу Лафора, моторні судоми, багатофокальний епілептичний напад, нічні епілептичні напади, фотогенну епілепсію, псевдоепілепсію, сенсорну епілепсію, слабовиражену епілепсію, лісову епілепсію, епілепсію при абстинентному синдромі і зорові рефлекторні епілептичні напади).

Проти епілептичного розладу може бути вибраний неврологічний лікарський засіб, що являє собою антиконвульсант або протиепілептик, включаючи, але не обмежуючись цим, барбітуратні антиконвульсанти (тобто примідон, метарбітал, мефобарбітал, алобарбітал, амобарбітал, апробарбітал, альфенал, барбітал, бралобарбітал і фенолбарбітал), бензодіазепінові антиконвульсанти (тобто діазепам, клоназепам і лоразепам), карбаматні антиконвульсанти (тобто фельбамат), антиконвульсанти на основі інгібітору вугільної ангідрази (тобто ацетозоламід, топірамат і зонізамід), дибензазепінові антиконвульсанти (тобто рафмамід, карбамазепін і окскарбазепін), антиконвульсанти на основі похідних жирних кислот (тобто дивалпроекс і вальпроєву кислоту), аналоги гамма-аміномасляної кислоти (тобто прегабалін, габапентин і вігабатрин), інгібітори повторного споживання гамма-аміномасляної кислоти (тобто тіагабін), інгібітори трансамінази гамма-аміномасляної кислоти (тобто вігабатрин), гідантоїнові антиконвульсанти (тобто дифенін, етотоїн, фосдифенін і медифенін), різноманітні антиконвульсанти (тобто лакозамід і сульфат магнію), прогестини (тобто прогестерон), оксазолідиндіонові антиконвульсанти (тобто параметадіон і триметадіон), піролідинові антиконвульсанти (тобто леветиракетам), сукцинімідні антиконвульсанти (тобто етосуксимід іметсуксимід), триазинові антиконвульсанти (тобто ламотригін) і сечовинні антиконвульсанти (тобто фенацемід і фенетурид).

Розлади поведінки і розлади CNS, що відрізняються аберантною поведінкою з боку підданого їм суб'єкта, включають, але не обмежуючись цим: розлади сну (тобто інсомнію, парасомнію, нічні страхи, розлади сну, пов'язані з циркодіанним ритмом і нарколепсію), розлади настрою (тобто депресію, суїцидальну депресію, страх, хронічні афективні розлади, фобії, напади паніки, обсесивно-компульсивний розлад, розлад гіперактивності з дефіцитом уваги (ADHD), розлад дефіциту уваги (ADD), синдром хронічної втоми, агорафобію, розлад пост-травматичного стресу, біполярний розлад), розлади харчування (тобто анорексію або булімію), психози, поведінкові розлади розвитку (тобто аутизм, синдром Ретта, синдром Аспергера), розлади особистості і психотичні розлади (тобто шизофренія, маревний розлад тощо).

Проти розладу поведінки може бути вибраний неврологічний лікарський засіб зі сполуки, що модифікує поведінку, включаючи, але не обмежуючись цим, атипічні антипсихотичні засоби (тобто рисперидон, аланзапін, априпіпразол, хетіапін, паліперидон, азенапін, клозапін, ілоперидон і зипразидон), фенотіазиновий антипсихотичний засіб (тобто прохлорпемазин, хлорпромазин, флуфеназин, перфеназин, трифлуоперазин, тіоридазин і мезоридазин), тіоксантеновий антипсихотичний засіб (тобто тіотиксен), різноманітні антипсихотичні засоби (тобто пімозид, літій, моліндон, галоперидол і локсапін), селективний інгібітор повторного споживання серотоніну (тобто циталопрам, есциталопрам, пароксетин, флуоксетин і сертралін), інгібітор повторного споживання серотоніну-норепінефрину (тобто дулоксетин, велафаксин, десвелафаксин, трициклічний антидепресант (тобто доксепін, кломіпрамін, амоксапін, нортриптилін, амітриптилін, триміпрамін, іміпрамін, протриплітин і дезипрамін), тетрациклічний антидепресант (тобто міртазапін і мапротилін), фенілпіперазиновий антидепресант (тобто тразодон і нефазодон), інгібітор моноаміноксидази (тобто ізокарбоксазид, фенелзин, селегілін і транілципромін), бензодіазепін (тобто алпразолам, естазолам, флуразептам, клоназепам, лоразепам і діазепам), інгібітор повторного споживання норепінефрину-допаміну (тобто бупропіон), стимулятор CNS (тобто фентермін, діетилпропіон, метамфетамін, декстроамфетамін, амфетамін, метилфенідат, дексметилфенідат, ліздексамфетамін, модафініл, пемсолін, фендиметразин, бензфетамін, фендиметразин, армодафініл, діетилпропіон, кофеїн, атомоксетин, доксапрам і мазиндол), анксіолітичний/седативний/снотворний засіб (включаючи, але не обмежуючись цим, барбітурат (тобто секобарбітал, фенобарбітал і мефобарбітал), бензодіазепін (як описано вище), і різноманітні анксіолітичні/седативні/снотворні засоби (тобто дифенгідрамін, натрій оксибат, залеплон, гідроксизин, хлораль гідрат, аолпідем, буспірон, доксепін, есзопіклон, рамелтеон, мепробамат і етхлорвінол)), секретин (дивися, наприклад, Ratliff-Schaub et al. Autism 9:256-265 (2005)), опіоїдний пептид (дивися, наприклад, Cowen et al., J. Neurochem. 89:273-285 (2004)) і нейорпептид (дивися, наприклад, Hethwa et al. Am. J. Physiol. 289:E301-305 (2005)).

Лізосомні розлади нагромадження являють собою метаболічні розлади, що у деяких випадках асоціюються з CNS або мають CNS-специфічні симптоми; такі розлади включають, але не обмежуючись цим: хворобу Тея-Сакса, хворобу Гоше, хворобу Фабрі, мукополісахаридоз (типи I, II, III, IV, V, VI і VII), хворобу нагромадження глікогену, GM1-гангліозидоз,

метахроматичну лейкодистрофію, хворобу Фарбера, лейкодистрофію Канавана і типи 1 і 2 нейронного цероїдного ліпофусцинозу, хворобу Німана-Піка, хворобу Помпі і хворобу Краббе.

Проти лізосомної хвороби нагромадження може бути вибраний неврологічний лікарський засіб, що сам по собі має активність ферменту, що ослаблюється при захворюванні, або іншим способом відтворює її. Ілюстративні рекомбінантні ферменти для лікування лізосомніх розладів нагромадження включають, але, не обмежуючись, ті, які наведені, наприклад, у публікації заявки на патент США № 2005/0142141 (тобто альфа-L-ідуронідазу, ідуронат-2-сульфатазу, N-сульфатазу, альфа-N-ацетилглюкозамінідазу, N-ацетил-галактозамін-6-сульфатазу, бета-галактозидазу, арилсульфатазу B, бета-глюкуронідазу, кислу альфа-глюкозидазу, глюкоцереброзидазу, альфа-галактозидазу A, гексозамінідазу A, кислу сфінгомієліназу, бета-галактоцереброзидазу, бета-галактозидазу, арилсульфатазу A, кислу церамідазу, аспартоацилазу, пальмітоїл-протеїнтіоестеразу 1 і трипептидиламінопептидазу 1).

В інших варіантах здійснення, захворювання, пов'язані з неправильним надпродукуванням еритроцитів або викликувані ним, або захворювання, де надпродукування еритроцитів є впливом захворювання, можуть запобігатися або лікуватися за допомогою впливу збідніння ретикулоцитів, що спостерігається в даному документі для антитіл анти-TfR, які зберігають щонайменше часткову ефекторну функцію. Наприклад, при спадковій або неопластичній справжній поліцитемії підвищені кількості еритроцитів через гіперпроліферацію, наприклад, ретикулоцитів, дають в результаті загущення крові і супутні фізіологічні симптоми (d'Onofrio et al., Clin. Lab. Haematol. (1996) Suppl. 1:29-34). Введення антитіла анти-TfR за даним винаходом, де щонайменше часткова ефекторна функція антитіла зберігається, зробило б можливим селективне видалення популяції незрілих ретикулоцитів без впливу на нормальне перенесення трансферину в CNS. Дозування такого антитіла модулювалося б таким чином, що гострі клінічні симптоми могли б зводитися до мінімуму (тобто за допомогою дозування при дуже низькій дозі або через великі часові інтервали), як добре відомо в даній галузі.

В одному з аспектів, антитіло за даним винаходом використовується для детектування неврологічного розладу до настання симптомів і/або для оцінки важкості або тривалості захворювання або розладу. В одному з аспектів, антитіло уможливлює детектування і/або одержання зображень неврологічного розладу, включаючи одержання зображень за допомогою радіографії, томографії або магнітної резонансної томографії (MRI).

В одному з аспектів, пропонується антитіло анти-TfR з низькою спорідненістю за даним винаходом для застосування як лікарського препарату. В інших аспектах, пропонується антитіло анти-TfR з низькою спорідненістю для застосування при лікуванні неврологічного захворювання або розладу (наприклад, хвороби Альцгеймера) без збідніння еритроцитів (тобто ретикулоцитів). У визначених варіантах здійснення, пропонується модифіковане антитіло анти-TfR з низькою спорідненістю для використання в способі лікування, як описано в даному документі. У визначених варіантах здійснення, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR з низькою спорідненістю, модифіковане для поліпшення його безпеки, для використання в способі лікування індивідуума, що має неврологічне захворювання або розлад, що включає введення індивідууму ефективної кількості антитіла анти-TfR (необов'язково, пов'язаного з лікарським засобом проти неврологічного розладу). В одному такому варіанті здійснення, спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента. В інших варіантах здійснення, даний винахід пропонує антитіло анти-TfR, модифіковане для поліпшення його безпеки, для використання при зменшенні або інгібуванні утворення амілоїдних бляшок у пацієнта, що має ризик неврологічного захворювання або розладу (наприклад, хвороба Альцгеймера) або страждає від нього. "Індивідуум" відповідно до будь-якого з розглянутих вище варіантів здійснення необов'язково являє собою людину. У визначених аспектах, антитіло анти-TfR за даним винаходом для використання в способах за даним винаходом поліпшує споживання лікарського засобу проти неврологічного розладу, з яким воно пов'язано.

В іншому аспекті, даний винахід пропонує для використання антитіла анти-TfR з низькою спорідненістю за даним винаходом при виробництві або приготуванні лікарського препарату. В одному з варіантів здійснення, лікарський препарат призначений для лікування неврологічного захворювання або розладу. В іншому варіанті здійснення, лікарський препарат призначений для використання в способі лікування неврологічного захворювання або розладу, що включає введення індивідууму, що має неврологічне захворювання або розлад, ефективної кількості лікарського препарату. В одному такому варіанті здійснення, спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента.

В іншому аспекті, даний винахід пропонує спосіб лікування хвороби Альцгеймера. В одному з варіантів здійснення, спосіб включає введення індивідууму, що має хворобу Альцгеймера, ефективної кількості мультиспецифічного антитіла за даним винаходом, що зв'язує як BACE1, так і TfR або як Abeta, так і TfR. В одному такому варіанті здійснення, спосіб додатково включає введення індивідууму ефективної кількість щонайменше одного додаткового терапевтичного агента. "Індивідуум" відповідно до будь-якого з розглянутих вище варіантів здійснення може являти собою людину.

Антитіла анти-TfR за даним винаходом можуть використовуватися при терапії або самі по собі, або в сполученні з іншими агентами. Наприклад, антитіло анти-TfR за даним винаходом може вводитися спільно щонайменше з одним додатковим терапевтичним агентом. У визначених варіантах здійснення, додатковий терапевтичний агент являє собою терапевтичний агент, ефективний при лікуванні такого ж або іншого неврологічного розладу, як той, для лікування якого використовується антитіло анти-TfR. Ілюстративні додаткові терапевтичні агенти включають, але не обмежуючись цим: різноманітні неврологічні лікарські засоби, описані вище, інгібітори холінестерази (такі як донепезил, галантамін, ровастигмін і такрин), антагоністи рецепторів NMDA (такі як мемантин), інгібітори агрегації пептидів амілоїду бета, антиоксиданти, модулятори γ-секретази, міметики фактора росту нервів (NGF) або генну терапію NGF, агоністи PPARγ, інгібітори редуктази HMS-CoA (статини), ампакіни, блокатори кальцієвих каналів, антагоністи рецепторів GABA, інгібітори глікогенсинтазакінази, внутрішньовенний імуноглобулін, агоністи мускаринових рецепторів, модулятори нікотинових рецепторів, активну або пасивну імунізацію пептиду амілоїду бета, інгібітори фосфодіестерази, антагоністи рецепторів серотоніну й антитіла анти-пептид амілоїду бета. У визначених варіантах здійснення щонайменше один додатковий терапевтичний агент вибирається по його здатності ослаблювати один або кілька побічних впливів неврологічного лікарського засобу.

Як ілюструється в даному документі, визначені антитіла анти-TfR можуть мати побічні впливи, що негативно впливають на популяції ретикулоцитів у суб'єкта, якого лікують за допомогою антитіла анти-TfR. Таким чином, у визначених варіантах здійснення щонайменше один додатковий терапевтичний агент, вибраний через його здатність ослаблювати такий негативний побічний вплив на популяції ретикулоцитів, уводиться разом з антитілом анти-TfR за даним винаходом. Приклади таких терапевтичних агентів включають, але не обмежуючись цим, агенти для збільшення популяції еритроцитів (тобто ретикулоцитів), агенти для підтримки росту і розвитку еритроцитів (тобто ретикулоцитів) і агенти для захисту популяції еритроцитів від впливів антитіла анти-TfR; такі агенти включають, але не обмежуючись цим, еритропоетин (EPO), добавки, що містять залізо, вітамін C, фолієву кислоту і вітамін B12, а також фізичне заповнення еритроцитів (тобто ретикулоцитів) за допомогою, наприклад, вливання подібних клітин, що можуть походити від іншого індивідуума з подібним типом крові або можуть попередньо витягатися в суб'єкта, якому вводять антитіло анти-TfR. Для фахівця в даній галузі буде зрозуміло, що в деяких випадках, агенти, призначені для захисту існуючих еритроцитів (тобто ретикулоцитів), переважно вводяться суб'єкту до терапії за допомогою антитіла анти-TfR або одночасно з нею, у той час як агенти, призначені для підтримки або ініціювання повторного росту/розвитку еритроцитів або популяцій клітин крові (тобто ретикулоцитів або популяції ретикулоцитів), переважно вводяться одночасно з терапією за допомогою антитіла анти-TfR або після неї, так що такі клітини крові можуть заповнюватися після лікування за допомогою антитіла анти-TfR.

У визначених інших таких варіантах здійснення щонайменше один додатковий терапевтичний агент вибирається через його здатність інгібувати або запобігати активуванню шляху комплементу при введенні антитіла анти-TfR. Приклади таких терапевтичних агентів включають, але не обмежуючись цим, агенти, що негативно впливають на здатність антитіла анти-TfR до зв'язування або активування шляху комплементу, і агенти, що інгібують одну або кілька молекулярних взаємодій зі шляхом комплементу, і описуються в цілому, у Mollnes and Kirschftnk (2006) Molec. Immunol. 43:107-121, зміст якої в явному вигляді включається в даний документ як посилання.

Такі сполучені терапії, відзначені вище, у даному документі охоплюють сполучене введення (коли два або більше терапевтичні агенти включаються в той самий або в різні препарати) і роздільне введення, у цьому випадку, введення антитіла за даним винаходом може здійснюватися до, під час і/або після введення додаткового терапевтичного агента і/або допоміжної речовини. В одному з варіантів здійснення, введення антитіла анти-TfR і введення додаткового терапевтичного агента здійснюється з різницею за часом у межах приблизно одного місяця або в межах приблизно одного, двох або трьох тижнів, або в межах приблизно одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти або шести днів. Антитіла за даним винаходом можуть також

використовуватися в сполученні з іншими видами інтервенційної терапії, такими як, але не обмежуючись цим, радіаційна терапія, поведінкова терапія або інші види терапії, відомі в даній галузі і відповідні неврологічному розладу, що повинен лікуватися або запобігатися.

Антитіло анти-TfR за даним винаходом (і будь-який додатковий терапевтичний агент) може вводитися за допомогою будь-яких придатних для використання засобів, включаючи парентеральне, інтрапульмонарне і інтраназальне введення, і, за бажанням, місцевого лікування, внутрішньоранового введення. Парентеральні вливання включають внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревинне або підшкірне введення. Дозування може здійснюватися за допомогою будь-якого придатного для використання способу, наприклад, за допомогою ін'єкцій, таких як внутрішньовенні або підшкірні ін'єкції, залежно, почасти, від того, чи є введення коротким або хронічним. У даному документі передбачаються різноманітні часові графіки дозування, включаючи, але не обмежуючись цим, однократне або множинне введення в різні моменти часу, уведення болюсу й імпульсне вливання.

Антитіла за даним винаходом можуть готуватися, дозуватися і вводитися способом, що відповідає хорошій медичній практиці. Фактори для розгляду в цьому контексті включають конкретний розлад, що лікується, конкретного ссавця, що лікується, клінічний стан індивідуального пацієнта, причину розладу, місце доставки агента, спосіб уведення, часовий графік введення й інші фактори, відомі медичним працівникам. Антитіло не повинне готуватися, але необов'язково готується разом з одним або декількома агентами, використовуваними в даний час для запобігання або лікування розглянутого розладу або для запобігання, ослаблення або полегшення одного або декількох побічних впливів введення антитіла. Ефективна кількість таких інших агентів залежить від кількості антитіла, що присутній у препараті, типу розладу або лікування і від інших факторів, обговорюваних вище. Вони, як правило, використовуються при таких же дозуваннях і за допомогою таких же способів уведення, як описується в даному документі, або в межах приблизно від 1 до 99 % дозувань, описаних у даному документі, або при будь-якому дозуванні і за допомогою будь-якого способу, що емпірично/клінічно визначається як відповідний.

Для запобігання або лікування захворювання, відповідне дозування антитіла за даним винаходом (коли воно використовується окремо або в сполученні з одним або декількома іншими додатковими терапевтичними агентами) буде залежати від типу захворювання, що повинне лікуватися, типу антитіла, важкості і перебігу захворювання, від того, чи вводиться антитіло для превентивних або терапевтичних цілей, від попередньої терапії, від клінічної історії пацієнта і від реакції на антитіло, і від судження спостерігаючого лікаря. Антитіло уводиться відповідним чином пацієнту за один раз або протягом ряду сеансів лікування. Залежно від типу і важкості захворювання, приблизно від 1 мкг/кг до 15 мг/кг (наприклад, 0,1 мг/кг - 10 мг/кг) антитіла може являти собою початкове пробне дозування для введення пацієнту, наприклад, за допомогою одного або декількох окремих уведень, або за допомогою безперервного вливання. Одна типова щоденна доза може знаходитися в межах приблизно від 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більше, залежно від факторів, розглянутих вище. Для багаторазових уведень протягом декількох днів або довше, залежно від стану, лікування, як правило, може бути продовжене доти, поки не відбудеться бажаного пригнічення симптомів захворювання. Одне ілюстративне дозування антитіла може знаходитися в межах приблизно від 0,05 мг/кг приблизно до 40 мг/кг. Таким чином, пацієнту можуть вводитися одна або кілька доз приблизно по 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг, 5,0 мг/кг, 7,5 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 35 мг/кг або 40 мг/кг (або будь-яке їхнє сполучення). Такі дози можуть уводитися з проміжками, наприклад, щотижня або кожні три тижні (наприклад, таким чином, що пацієнт приймає приблизно від двох приблизно до двадцяти доз або, наприклад, приблизно шість доз антитіла). Можна вводити початкову більш високу навантажувальну дозу, за якої слідують одна або декілька більш низьких доз. Однак можуть бути корисними й інші режими дозування. Буде очевидно, що один зі способів зменшення впливу на популяції ретикулоцитів за допомогою введення антитіла анти-TfR полягає в модифікації кількості доз або часового режиму дозування таким чином, що в кровотоці присутні в цілому більш низькі кількості циркулюючого антитіла для взаємодії з ретикулоцитами. В одному з необмежувальних прикладів, може вводитися більш низька доза антитіл анти-TfR з більшою частотою, ніж це було б при більш високій дозі. Використовувана доза може відповідати балансу між кількістю антитіла, що повинне доставлятися в CNS (що саме по собі зв'язане зі спорідненістю з CNS антиген-специфічною частиною антитіла), спорідненістю цього антитіла до TfR і тим, чи вводиться сполука (сполуки), що захищає еритроцити (тобто ретикулоцити), що стимулює ріст і розвиток або інгібує шлях комплементу,

разом з антитілом або послідовно. Хід цієї терапії легко відслідковується за допомогою звичайних методик і аналізів, як описано в даному документі і як відомо в даній галузі.

Зрозуміло, що будь-який із зазначених вище препаратів або терапевтичних способів, може здійснюватися з використанням імунокон'югата за даним винаходом замість антитіла анти-TfR або на додаток до нього.

Н. Промислові вироби

В іншому аспекті даного винаходу, пропонується промисловий виріб, що містить матеріали корисні при лікуванні, запобіганні і/або діагностиці розладів, описаних вище. Промисловий виріб містить контейнер і мітку або вставку в упакування, на контейнері, або пов'язану з ним. Придатні для використання контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони, шприци, мішки з розчинами для внутрішньовенного ведення тощо. Контейнери можуть бути сформовані з різноманітних матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнер містить композицію, що сама по собі або в сполученні з іншою композицією є ефективною для лікування, запобігання і/або діагностики стану, і може мати вузол стерильного доступу (наприклад, контейнер може являти собою мішок з розчином для внутрішньовенного уведення або флакон, що має пробку, яка проколюється за допомогою голки для гіподермічних ін'єкцій). Щонайменше один активний агент у композиції являє собою антитіло за даним винаходом. Етикетка або вставка в упакування показує, що композиція використовується для лікування вибраного стану. Крім того, промисловий виріб може містити: (a) перший контейнер з композицією, що міститься в ньому, де композиція містить антитіло за даним винаходом; і (b) другий контейнер з композицією, що міститься в ньому, де композиція містить додатковий цитотоксичний або інший терапевтичний агент. Промисловий виріб у цьому варіанті здійснення даного винаходу може додатково містити вставку в упакування, що показує, що композиції можна використовувати для лікування конкретного стану. Альтернативно або на додаток до цього, промисловий виріб може додатково містити другий (або третій) контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWFI), фосфатний сольовий буфер, розчин Рінгера і розчин декстрози. Він може додатково містити інші матеріали, бажані з промислової точки зору і з погляду користувача, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприци.

Зрозуміло, що будь-який із зазначених вище промислових виробів може містити імунокон'югат за даним винаходом замість антитіла анти-TfR або на додаток до нього.

Приклади

Приклад 1: Генерування, характеризація і гуманізація перехресно-реактивних антитіл анти-TfR людини/цино

Спочатку здійснюють процес фагового пенінгу наївних антитіл у спробі ідентифікації антитіл перехресно-реактивних відносно як до TfR людини, так і до TfR мавпи циномолгус ("цино"), що надалі не конкурують з TfR за зв'язування з TfR (Lee et al. JMB (2004) 1073-1093). Такого перехресно-реактивного, що не конкурує з TfR, клону не ідентифікують у цьому процесі фагового пенінгу. Однак ідентифікують два антитіла, що є корисними при характеризації генерованих згодом клонів гібридоми.

Ідентифікують види перехресно-реактивного антитіла, що конкурує з TfR за зв'язування з TfR людини або цино (TfR-конкуруюче антитіло). Епітоп іншого клону, специфічний для TfR людини, картується в апікальному домені huTfR з використанням химерних рецепторів TfR миші/людини (Фігура 1). Цей клон, що зв'язується з апікальним доменом, втрачає зв'язок з huTfR, коли послідовність TfR миші в апікальному домені заміщають у положенні huTfR.

Потім здійснюють оснований на імунізації підхід до генерування перехресно-реактивних антитіл анти-TfR людини/цино. Позаклітинний домен TfR людини ("ecd"), що містить N-кінцеву мітку His і білок гемахроматозу людини ("HFE"), експресують і очищують, як описано (Bennet et al., Nature (2000) 403, 46-53). Одержують анологічний конструкт ecd TfR цино. TfR цино експресують і очищують подібним способом. Перехресно-реактивні антитіла TfR людини і цино генерують за допомогою імунізації 5 мишей Balb/C у підошву лапи за допомогою 6 доз (два рази в тиждень), що містять по 2 мкг, кожна, ecd cynoTf і huTfR. Усі сироватки мишей є позитивними по FACS, і усі миші є злитими. З 1632 переглянутих гібридом 111 є позитивними згідно з ELISA відносно зв'язування з TfR як людини, так і цино.

Отримані в результаті ELISA-позитивні гібридоми переглядають за допомогою FACS у присутності 1 мкМ голо-TfR людини на зв'язування з 293 клітинами, які транзиторно експресують TfR людини або цино. Коротко, аналіз FACS здійснюють із використанням 293 клітин, трансфікованих повнорозмірним TfR людини або цино з використанням ліпофектаміну 2000 плюс (Invitrogen) за 48-72 години перед аналізом FACS. Нетрансфіковані (контрольні) і трансфіковані 293 клітини промивають два рази буфером FACS (PBS, що містить 1 % BSA), додають 50 мкл супернатанта гібридоми (нормованого на 10 мкг/мл) до клітин 293 у присутності

1 мкМ голо-TfR людини і інкубують на льоду протягом 30 хв. Клітини промивають два рази буфером FACS, додають 50 мкл PE-кози-анти-Fcγ мишачих (Jackson ImmunoResearch) до клітин, і інкубують їх на льоду протягом 30 хв. Клітини промивають буфером FACS і повторно суспендують у 100 мкл буфера FACS для аналізу.

14 клонів є позитивними відносно зв'язування TfR як людини, так і цино (Фігури 2A і 2B). Ці клони додатково субклонують і оцінюють на зв'язування з TfR як людини, так і цино, за допомогою ELISA, і картують епітоп на huTfR з використанням клону фага з апікальним зв'язуванням, ідентифікованого вище. Коротко, конкурентний аналіз ELISA фага з апікальним доменом здійснюють на планшетах Maxisorp, покритих 2 мкг/мл очищеного TfR людини або цино, у PBS при 4 °C протягом ночі. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20 і блокують із використанням Superblock з казеїном (Thermo Scientific, Hudson, NH). У кожну ямку додають 30-мкл аліквоту супернатанта гібридоми (нормованого на 10 мкг/мл) протягом 45 хв. За цим слідує додавання 30 мкл фага, що зв'язується з апікальним доменом, при OD (оптичної густини) 0,05 протягом 15 хв. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20, і додають на планшет розведене 1:1000 HRP-миші-анти M13 (GE healthcare) і інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети промивають PBS/0,05% Tween 20, і зв'язаний фаг детектують із використанням субстрату TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). Дев'ять з чотирнадцяти клонів, як виявлено, блокують зв'язування антитіла з апікальним зв'язуванням, згідно з фаговим дисплеєм (дивися Фігуру 2C).

Спорідненість антитіл вимірюють із використанням поверхневого плазмонного резонансу ("SPR") (Biacore™, GE Healthcare). Антитіло анти-His (Qiagen) зв'язується на чотирьох різних проточних комірках сенсорного чипа CM5 BIACORE™ (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) при значенні в межах між 6000 і 8000 RU. Іммобілізація здійснюється за допомогою неупорядкованого зв'язування через аміно групи з використанням протоколу, що постачається виробником. 10X HBS-P (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) розводять у воді і використовують як буфер для розведення і проточного буфера. Очищений TfR людини або цино захоплюється, після цього інжектують 3-кратні послідовні розведення IgG або Fab, при швидкості потоку 30 мл/хв. із використанням способу одноциклової кінетики. Постійні спорідненості визначають із використанням простої моделі зв'язування Ленгмюра 1:1 або з використанням стаціонарної моделі, коли k_{on} або k_{off} знаходяться нижче меж детектування. Рівноважну константу дисоціації (K_D) обчислюють як відношення константи швидкості асоціації (k_{on}) і константи швидкості дисоціації (k_{off}). Результати показані на Фігурі 2C.

Кожну гібридому клонують. РНК у цілому ізолюють від гібридом з використанням міні-набору RNeasy (Qiagen). cDNA генерують із використанням SMART 5' RACE cDNA Amplification kit (Clontech) на основі інструкцій виробника. Варіабельну область кожного антитіла ампліфікують із використанням UPM (5' оліго), що постачається в наборі, і 3' оліго, що відпалюється відносно постійної області. Потім продукт PCR у цілому клонують у вектор pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) для секвенування. Після аналізу послідовностей гібридоми можуть додатково підрозділятися на 4 групи (Фігури 3A-3D). Клони, що конкурують з антитілом з апікальним зв'язуванням, потрапляють у 3 споріднені класи послідовностей (Фігура 3A-C). 4 неапікальні клони (Фігура 3D) складаються з 2 споріднених клонів і 2 інших унікальних послідовностей. CDR легкого і важкого ланцюга кожного клону наводяться в Таблиці 3.

Таблиця 3

CDR Легких і важких ланцюгів перехресно-реактивних антитіл анти-TfR цино/людини

Назва клону	Важкий/ легкий	HVR1	SEQ ID №	HVR2	SEQ ID №	HVR3	SEQ ID №
7A4	Легкий	RASESVDSY GNSFMH	29	RASNLES	30	QQSNE APPT	31
	Важкий	DYAMH	32	GISTYFGRTN YNQKFKG	33	GLSGN YVM DY	34
8A2	Легкий	RASESVDSY GNSFMH	35	RASNLES	30	QQSNE GPPT	36
	Важкий	DYGMH	37	VISFYSGKTN YNQKFMG	38	GLSGN YVVDY	39
15D2	Легкий	RASESVDSY GNSFMH	35	RASNLES	30	QQSNE GPPT	36
	Важкий	DYAMH	32	VISPYSGRTN YNQNFKG	40	GLSGN YVMDY	34
10D11	Легкий	RASESVDSY GNSFMH	41	RASNLES	30	QHSNE DPPT	42
	Важкий	DYGMH	37	VISPYSGKTN YSQKFKG	43	GLSGN FVMDF	44
7B10	Легкий	RASESVDSY GNSFMH	29	RASNLES	30	QQSNE GPPT	31
	Важкий	DYAMH	32	GISTYFGRTN YNQKFKG	33	GLSGN YVMDY	34
CDR легких ланцюгів консенсусного класу I		RASESVD(S/ D)YG(N/P) SFMH	45	RASNLES	30	Q(Q/H) SNE(A/ G/D)PP T	46
CDR важких ланцюгів консенсусного класу I		DY(A/G)MH	47	(G/V)IS(T/F/P) Y(F/S)G(R/K)T NY(N/S)Q(K/N)F(K/M)G	48	GLSGN(Y/F)V (M/V)D(Y/F)	49
15G11	Легкий	RASDNLYSNL A	50	DATNLAD	51	QHFWG TPLT	52
	Важкий	SYWMH	53	EINPTNGRTN Y1EKFKS	54	GTRAY HY	55
16G5	Легкий	RASENIYSNL A	56	AATDLAD	57	QHFWG TPLT	52
	Важкий	SYWMH	53	EINPTNGRTN YNENFKS	58	GTRAY HF	59
13C3	Легкий	RASDNIYSNL A	60	AATNLAD	61	QHFWG TPLM	62
	Важкий	SYWMH	53	EINPINGRTN YSEKFKK	63	GTRAY HY	55
16G4	Легкий	RASDNIYSNL A	60	AVTNLAD	64	QHFWG TPLT	52

Продовження таблиці 3

	Важкий	SYWMH	53	EINPSNGRTNYNETFKS	65	GTRAYHY	55
CDR легких ланцюгів консенсусного класу II		RAS(E/D)N(L/1)YSNLA	66	(D/A)(A/V)T(N/D)LAD	67	QHFWGTPL(T/M)	68
CDR важких ланцюгів консенсусного класу II		SYWMH	53	EINP(T/I/S)NGRTNY(I/N/S)E(K/N/T)FK(S/K)	69	GTRAYH(Y/F)	70
16F6	Легкий	RASKSISKYLA	71	SGSTLQS	72	QQHNEYPWT	73
	Важкий	SEYAWN	74	YISYSGTTSYNPSLKS	75	YGYGNPATRYFDV	76
7G7	Легкий	RAROSVSTSSYSFMH	77	YASIQES	78	QHTWEIPFT	79
	Важкий	SYWMH	80	NIYPGSGSTKYDERFKS	81	GGYDSRAWFAY	82
4C2	Легкий	RARQSVSTSSYSFMH	77	YASIQES	78	QHTWEIPFT	79
	Важкий	SYWMH	80	NIYPGSGSTKYDEKFKS	83	GGYDSRAWFAH	84
1B12	Легкий	TTSSSVPSSYEH	85	STSNLAS	86	HQYHRSPFT	87
	Важкий	DYYMY	88	SISNGGDNTYYPDTVKG	89	QGALYDGYYRGAMDY	90
13D4	Легкий	RAGQDITNYLN	91	YTSRLHS	92	QQANTLPYT	93
	Важкий	NYWIE	94	EILPGSGSTKYNEKFKG	95	RGGYGYDGEFAY	96

Продовження таблиці 3

CDR легких ланцюгів консенсусного класу IV	(R/T)(A/T)(R/S/G)(Q/S)(S/-)(V/-)(S/-)(T/-)(S/V/D)(S/P/I)(Y/S/T)(S/N)(F/Y)(M/F/L)(H/N)	97	(Y/S)(A/T)S(I/N/R)(Q/L)(E/A/H)S	98	(Q/H)(H/Q)(T/Y/A)(W/H/N)(E/R/T)(I/S/L)P(F/Y)T	99
CDR важких ланцюгів консенсусного класу IV	(S/D/N)Y(W/Y)(M/I)(H/Y/E)	100	(N/S/E)I(Y/S/L)(P/N)G(S/G)(G/D)(S/N)T(K/Y)Y(D/P/N)(E/D)(R/K/T)(F/V)K(S/G)	101	(G/Q/R)G(Y/A/G)(D/L/Y)(S/Y/G)(R/D/Y)(A/G/D)(W/Y/G)(F/Y/E)(R/F/-)(G/-)(A/-)(M/-(A/D)(Y/H)	102

Репрезентативні клони з кожного класу (15G11, 7A4, 16F6 і 7G7) наводяться для ілюстрації в даному документі з метою гуманізації і додаткової характеризації. Гуманізація здійснюється з використанням щеплень HVR разом із включенням вибраних верньєрних положень, як зображено, нижче, на Фігурах 4A-4E. 15G11 гуманізують за допомогою щеплення HVR у варіабельних доменах людини IGKV1-NL1*01 і IGHV1-3*01. Сполучення різних верньєрних положень миші включаються в гуманізовані варіанти, як зображено на Фігурі 4E. Гуманізований варіант 15G11 15G11.v5 містить вибрані верньєрні положення в VL (положення 43 і 48) і VH (положення 48, 67, 69, 71 і 73), як зображено на Фігурі 4A. На додаток до цього, N-закінчення VH змінене з Q на E. Для гуманізації 7A4 роблять щеплення HVR з використанням HVR важкого ланцюга 7A4 і легкого ланцюга 8A2 (7A4 і 8A2 являють собою споріднені клони, Фігура 3A). HVR прищеплюють у варіабельних доменах людини IGKV4-1*01 і IGHV1-2*02. Сполучення різних верньєрних положень миші включаються в гуманізовані варіанти, як зображено на Фігурі 4E. Гуманізований варіант 7A4 7A4.v15 містить вибрані верньєрні положення в VL (положення 68) і VH (положення 24 і 71) і зміну CDR-L3 G94A, як зображено на Фігурі 4B. 7G7 гуманізують за допомогою щеплення HVR у консенсусних варіабельних доменах людини каппа 4 і підгрупи I разом з вибраними верньєрними положеннями в VH (положення 93), як зображено на Фігурі 4C. Це гуманізований варіант називається 7G7.v1. 16F6 гуманізують за допомогою щеплення HVR у варіабельних доменах людини IGKV1-9*01 і IGHV4-59*01. Сполучення різних верньєрних положень миші включають у гуманізовані варіанти, як зображено на Фігурі 4E. Гуманізований варіант 16F6 16F6.v4 містить 2 зміни в VL (148L і F71Y), а також вибрані верньєрні положення в VL (положення 43 і 44) і VH (положення 71 і 78), як зображено на Фігурі 4D.

Таблиця 4

CDR легкого і важкого ланцюга гуманізованих антитіл/Fab

Назва клону	Важкий/ легкий	CDR1	SEQ ID №	CDR2	SEQ ID №	CDR3	SEQ ID №
15G11.v5	Легкий	RASDNLYSNLA	50	DATNLAD	51	QHFWGTPLT	52
	Важкий	SYWMH	53	EINPTNGRTNYIEKFKS	54	GTRAYHY	55
7A4.v15	Легкий	RASESVDSYGNSFMH	29	RASNLES	30	QQSNEAPPT	127
	Важкий	DYAMH	32	GISTYFGRTNYNQKFKG	33	GLSGNYVMDY	34
7G7.v1	Легкий	RAROSVSTSSYSFMH	77	YASIQES	78	QHTWEIPFT	79
	Важкий	SYWMH	80	NIYPGSGSTKYDERFKS	81	GGYDSRAWFAY	82
16F6.v4	Легкий	RASKSISKYLA	71	SGSTLQS	72	QQHNEYPWT	73
	Важкий	SEYAWN	74	YISYSGTTSYNPSLKS	75	YGYGNPATRYFDV	76

Спорідненість гуманізованих варіантів відносно TfR людини і цино визначають за допомогою SPR як IgG (Фігура 4E). Вибрані клони також аналізують за допомогою SPR як Fab для оцінки одновалентної спорідненості (Таблиця 7). В обох випадках, експерименти SPR здійснюють, як описано вище.

Таблиця 5

Дані Biacore по зв'язуванню вибраних Fab-форматованих варіантів

	HuTfR			CynoTfR			Відношення Cy/hu
Зразок	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
Mu15G11.Fab	1,38E+06	4,65E-03	3,37E-09	1,07E+06	6,23E-03	5,81E-09	1,72
Mu15G11.Fab	6,34E+05	1,52E-03	2,41E-09	4,85E+05	3,68E-03	7,57E-09	3,15
Hu15G11.v1.Fab	6,38E+05	0,006986	1,09E-08	5,05E+05	0,0373	7,39E-08	
Hu15G11.v3.Fab	6,42E+05	0,004657	7,26E-09	4,83E+05	0,0201	1,09E-08	
Hu15G11.v5.Fab	4,56E+05	0,004063	8,91E-09				
hu15G11.v5.Fab	7,76E+05	0,003643	4,70E-09	1,41E+06	0,02184	1,56E-08	3,4
Mu7A4.Fab	1,65E+06	3,13E-04	1,90E-10	1,14E+06	8,45E-04	7,41E-10	3,9
Hu7A4.v5.Fab	2,24E+06	1,53E-03	6,86E-10	1,18E+06	6,41E-03	5,44E-09	
Hu7A4.v8.Fab	9,28E+05	1,07E-03	1,15E-09	7,97E+05	6,81E-03	8,55E-09	
Hu7A4.v9.Fab	1,71E+06	6,86E-04	4,01E-10	8,08E+05	3,42E-03	4,23E-09	
Hu7A4.v12.Fab	3,32E+06	8,44E-04	2,55E-10	1,74E+06	3,31E-03	1,90E-09	
hu7A4.v15.Fab	9,10E+05	3,17E-04	3,48E-10	3,78E+05	0,001618	4,28E-09	11
Hu7G7.v1 Fab	1,44E+05	0,006594	4,58E-08	3,84E+04	0,007231	1,88E-07	4,4
Mu16F6.Fab	6,07E+04	1,90E-04	3,13E-09	5,11E+04	1,37E-03	2,68E-08	8,56
Hu16F6.v4.Fab	1,31E+05	1,69E-04	1,29E-09	9,89E+04	2,44E-03	2,47E-08	19,1

Епітопи зв'язування для антитіл підтверджуються повторно в такий спосіб. Здійснюють ELISA із блокуванням Tf-TfR на планшетах Maxisorp, покритих 2 мкг/мл очищеного TfR людини в PBS, при 4 °C протягом ночі. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20 і блокують з використанням блокуючого буфера Superblock у PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). На

планшети додають 50 мкл 12,5 мкМ голо-TfR людини (R&D Systems, Minneapolis, MN) протягом 40 хв. На планшети додають 50-мкл титри hu7A4.v15, hu15G11.v5, антитіла, що конкурує з TfR і hu7G7.v1 (починаючи з 10 мкг/мл, послідовні розведення 1:3), і інкубують протягом 20 хв. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20, і додають розведене 1:1000 HRP-кози-анти Fcγ людини (Jackson ImmunoResearch) на планшет і інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20 і детектують із використанням субстрату TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

Здійснюють аналіз ELISA зв'язування HFE-TfR на планшетах Maxisorp, покритих 1 мкг/мл HFE у PBS, при 4 °C протягом ночі. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20 і блокують з використанням блокуючого буфера Superblock у PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Титр TfR людини (починаючи при 100 мкг/мл, послідовне розведення 1:3) додають на планшет і інкубують протягом 1 години. 1 мкг/мл hu15G11.v5, hu7A4.v15 або hu7G7.v1 додають потім на планшет протягом 1 години. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20, і додають на планшет розведене 1:1000 HRP-кози-анти Fcγ людини (Jackson ImmunoResearch), і інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20 і детектують з використанням субстрату TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). Здійснюють аналіз ELISA із блокуванням HFE-TfR на планшетах Maxisorp, покритих 1 мкг/мл HFE у PBS, при 4 °C протягом ночі. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20 і блокують з використанням блокуючого буфера Superblock у PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). На планшеті NUNC™, титр hu7A4.v15, hu15G11.v5, антитіла конкуруючого з Tf, голо-TfR людини і контрольний IgG (400 мкг для всіх антитіл, 8000 мкг/мл для голотрансферину, послідовне розведення 1:3) поєднують з 2 мкг/мл біотинільованого TfR людини і інкубують протягом 1 години. Суміш потім додають на планшет, покритий HFE, протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20, і розведене 1:1000 HRP-стрептавідин (SouthernBiotech, Birmingham) додають на планшет і інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20, і детектують біотинільований TfR людини, зв'язаний на планшеті з використанням субстрату TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

На зв'язування цих гуманізованих варіантів з TfR не робить впливу присутність 6,3 мкМ голо-TfR, у той час як зв'язування антитіла, що конкурує з Tf, що зв'язується із сайтом зв'язування Tf на TfR, інгібується (Фігура 5). Крім того, гуманізовані 7A4.v15, 15G11.v5 і 7G7.v1, як і раніше, можуть зв'язувати HFE, захоплений huTfR, показуючи, що на них не впливає зв'язування huTfR з іммобілізованим HFE (Фігура 6A). У спорідненому експерименті, 7A4.v15 і 15G11.v5 не блокують зв'язування біотинільованого TfR з іммобілізованим HFE. На противагу цьому, ця взаємодія блокується антитілом, що конкурує з Tf і голо-TfR (Фігура 6B). HFE і Tf, як відомо, мають загальний епітоп, подібний з TfR (Bennet et al., Nature (2000) 403, 46-53).

Іммобілізовані 15G11v.5 і анти-TfR оцінюють на зв'язування з ECD біотинільованого TfR людини або з одновалентним фагом M13, що здійснює фаговий дисплей апікального домену TfR людини. Анти-TfR^{C12} одержують з фагової бібліотеки синтетичних антитіл, для яких здійснюють пенінг відносно ECD TfR людини, і воно зв'язується із сайтом на TfR людини, що конкурує зі зв'язуванням трансферину. Антитіла наносять у вигляді покриття при 1 мкг/мл у PBS на планшети Maxisorp. Зв'язаний біотинільований ECD TfR людини або фаг апікального домену TfR детектують за допомогою HRP-стрептавідину (GE health care, RPN 4401V) або HRP-анти-M13 (GE health care, 27-9421-01), відповідно. Фігура 25 показує, що 15G11v.5 зв'язується з апікальним доменом TfR людини. Сайт зв'язування 15G11v.5 картується в апікальному домені, це сайт, видалений від сайтів зв'язування лігандів TfR.

Приклад 2: Одержання за допомогою генної інженерії спорідненості перехресно-реактивних антитіл анти-TfR людини/цино

На додаток до гуманізованих варіантів, описаних вище, одержують додаткові, отримані за допомогою генної інженерії варіанти зі спорідненістю. У даному документі ілюструється одержання за допомогою генної інженерії спорідненості 15G11.v5 і 7A4.v15. Варіанти зі спорідненістю генерують за допомогою здійснення індивідуальних заміщень аланіну в CDR-L3 або CDR-H3 з використанням стандартних методик. Ці варіанти проглядаються як IgG за допомогою ELISA і SPR для ідентифікації положень, важливих для зв'язування TfR людини і цино; одновалентна спорідненість вибраних варіантів як Fab також визначається. Варіант зі скануванням Ala IgG або Fab експресуються в клітинах 293 і зв'язуються з TfR людини або цино, кількісно визначеним за допомогою ELISA на планшетах Maxisorp, покритих 1,8 мкг мл антитіла кози анти-Fcγ людини (Jackson ImmunoResearch) у PBS, при 4 °C протягом ночі. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20 і блокують з використанням блокуючого буфера Superblock у PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Супернатанти, що містять експресований IgG, послідовно розводять 1:5 і додають на планшет протягом 1 години. Очищені hu15G11.v5 або hu7A4.v15

використовують як страндарти (розведені 1:5, починаючи при 1 мкг/мл). Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20, і додають на планшет розведене 1:1000 HRP-кози-анти каппа (Southern Biotech), і інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20 і детектують з використанням субстрату TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). Зв'язування також оцінюють за допомогою SPR, як описано вище. Результати показані на Фігурах 7A (варіанти 15G11.v5) і 7B (варіанти 7A4.v15).

Додаткові варіанти 15G11.v5 з індивідуальними аланіновими заміщеннями в положеннях у CDR-L1, CDR-L2, CDR-H1 і CDR-H2 також генеруються, експресуються і спочатку проглядаються на зв'язування з TfR людини і цино за допомогою аналізу ELISA (Таблиця 6). Аналіз ELISA зв'язування Hu/Cy здійснюють на планшетах Maxisorp, покритих 2 мкг/мл очищеного TfR людини або цино в PBS при 4 °C протягом ночі. Планшети промивають PBS/0,05 % Tween 20 і блокують із використанням блокуючого буфера Superblock у PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Супернатанти культури клітин, що містять експресовані варіанти IgG з Ala-сканами, послідовно розводять 1:5 і додають у ямки протягом 1 години. Планшети промивають PBS/0,05% Tween 20, і додають на планшет розведене 1:1000 HRP-кози-анти Fcγ людини (Jackson ImmunoResearch), і інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі.

Планшети промивають PBS/0,05% Tween 20 і детектують із використанням субстрату TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

Таблиця 6

Аналіз ELISA Ala варіантів IgG hu15G11.v5

		EC50cynoTfR (нг/мл)	EC50HuTfR (нг/мл)	
HVR-H1		15G11.v5	1,8	0,8
		G26A	6,1	1,1
		Y27A	1467,1	21,1
		T28A	0,8	0,4
		F29A	12,5	1,5
		T30A	0,9	0,4
		S31A	0,1	0,05
		Y32A	1,4	0,4
		W33A	362,5	59,6
		M34A	1,1	0,4
		G49A	1,1	0,3
HVR-H2		E50A	409,7	20,6
		I51A	0,6	0,2
		N52A	0,9	0,3
		P52aA	8,1	3,9
		T53A	0,7	0,3
		R56A	5405,4	55,1
		N58A	80,4	6,3
		Y59A	0,7	0,3
		I60A	0,7	0,3
		E61A	0,6	0,2
		K62A	0,7	0,3
		F63A	0,6	0,4
		K64A	0,6	0,3
		S65A	0,7	0,2

Продовження таблиці 6

HVR-L1		R24A	0,4	0,1
		S26A	0,6	0,2
		D27A	0,8	0,2
		N28A	0,8	0,2
		L29A	0,9	0,3
		Y30A	1,0	0,3
		S31A	0,7	0,3
		N32A	4,0	1,6
		L33A	0,1	0,05
		ID50A	0,5	0,2
		T52A	0,3	0,2
		N53A	0,6	0,3
		L54A	0,6	0,4
		D56A	0,5	0,3

Потім вибрані варіанти очищуються, і їхню одновалентну спорідненість до TfR людини або цино оцінюють за допомогою SPR (Таблиця 7).

Таблиця 7

Одновалентний аналіз SPR вибраних аланінових варіантів Fab 15G11.v5

	HuTfR			CynoTfR			Відно-шення Cy/hu
	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
Hu15G11.v5 Fab	6,74E+05	4,74E-03	7,03E-09	4,51E+5	1,27E-02	2,82E-08	4,0
Hu15G11.HC32A Fab	2,38E+05	1,78E-03	7,47E-09	1,77E+05	8,51E-03	4,80E-08	6,4
Hu15G11.HC34A Fab	5,64E+05	4,03E-03	7,14E-09	3,04E+05	9,90E-03	3,26E-08	4,6
Hu15G11.HC52A Fab	5,30E+05	2,36E-02	4,44E-08	4,87E+05	5,67E-02	1,17E-07	2,6
Hu15G11.HC52A Fab	5,64E+05	1,96E-02	3,46E-08	ND	ND	ND	ND
Hu15G11.HC51A Fab	4,33E+05	1,04E-02	2,39E-08	3,13E+05	3,29E-02	1,05E-07	4,4
Hu15G11.HC53A Fab	8,90E+05	1,15E-02	1,29E-08	4,84E+05	2,50E-02	5,18E-08	4,0
Hu15G11.HC54A Fab	2,06E+05	8,71E-03	4,24E-08	2,80E+05	1,69E-02	6,02E-08	1,4

Приклад 3: Конструювання й аналіз in vitro біспецифічного антитіла анти-TfR людини

Визначені варіанти згаданих вище антитіл переформатуються як біспецифічні антитіла з другим плечем, що специфічно зв'язується з BACE1. Антитіла анти-TfR людини Hu15G11.v5, Hu15G11.LC92A, Hu15G11.HC52A і Hu15G11.HC53A використовуються для одержання за допомогою генної інженерії плеча для зв'язування TfR біспецифічного антитіла з використанням методики конструювання біспецифічного антитіла "виступ у западину" (Carter, P. (2001) J. Immunol. Methods 248, 7-15; Ridgway, J. B., Presta, L. G., and Carter, P. (1996) Protein Eng. 9, 617-621; Merchant, A. M., Zhu, Z., Yuan, J. Q., Goddard, A., Adams, C. W., Presta, L. G., and Carter, P. (1998) Nat. Biotechnol. 16, 677-681; Atwell, S., Ridgway, J. B., Wells, J. A., and Carter, P. (1997) J. Mol. Biol. 270, 26-35). На додаток до мутацій типу виступу і западини в Fc для анти-TfR (западина) і анти-BACE1 (виступ), усі половинки антитіл містять мутації в Fc-області, що анулюють ефекторну функцію (N297G) і Hu15G11.v5, і Hu15G11.LC92A містять додаткову мутацію Fc, що анулює ефекторну функцію (D265A). Половинки антитіл типу виступ і западина очищуються окремо від E.coli і поєднуються при відношенні 1:1,1 анти-TfR для запобігання утворенню гомодимерів анти-TfR. Зборка біспецифічного антитіла завершується за допомогою відновлювального відпалу протягом щонайменше трьох днів при кімнатній температурі в буфері, що містить відновлений глютатіон при відношенні 100x до антитіла і 200 мМ аргініну, pH 8,0. Після зборки біспецифічні антитіла очищують за допомогою хроматографії гідрофобних взаємодій. Зборка підтверджується за допомогою рідинної хроматографії - мас-спектрометрії і

SDS-PAGE. За допомогою ексклюзійної хроматографії і спектроскопії багатокутового лазерного розсіювання підтверджується, що очищені антитіла є гомогенними і монодисперсними.

Отримані в результаті біспецифічні антитіла називаються 15G11.v5 (анти-TfR^1), 15G11.W92A (15G11.LC92A або анти-TfR^2), Hu15G11.N52A (анти-TfR^{52A}) і Hu15G11.T53A (анти-TfR^{53A}). Одновалентна спорідненість і кінетика відносно TfR людини і цино визначаються для 115G11.v5 і 115G11.W92A за допомогою SPR, як вище (дивися Таблицю 9). Анти-TfR^1 і анти-TfR^2 мають спорідненість одновалентного зв'язування, подібну з анти-TfR^A і анти-TfR^D, відносно зв'язування з TfR миші (дивися Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3, 84ra43 (2011); Yu et al., Sci. Transl. Med. 25 May 2011:Vol. 3, Issue 84, p. 84ra44).

Таблиця 8

Одновалентний SPR аналіз 15G11.v5 (TfR^1) і 15G11.W92A (LC92A, TfR^2)

	HuTfR			CynoTfR			Відношення cyno/human
	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
Hu15G11.v5 Fab	6,74E+05	4,74E-03	7,03E-09	4,51E+05	1,27E-02	2,82E-08	4,0
Біспецифічні Hu15G11.W92A	1,28E+05	3,77E-02	2,95E-07	8,36E+04	5,20E-02	6,22E-07	2,1

На додаток до цього, спорідненість зв'язування анти-TfR^1, анти-TfR^2, біспецифічних антитіл Hu15G11.N52A і Hu15G11.T53A вимірюють відносно TfR людини і цино за допомогою SPR, як описано раніше. Як показано в Таблиці 9, нижче, анти-TfR^{52A} і анти-TfR^{53A} мають спорідненість зв'язування до TfR людини і цино в межах між значеннями для $TfR1^{hl5G11.v5}$ і $TfR2^{LC92A}$.

Таблиця 9

Антитіла анти-TfR цино/людини (нМ)		
	TfR людини	TfR цино
$TfR1^{hl5G11.v5}$	10	37
$TfR2^{LC92A}$	270	810
$TfR2^{52A}$	52	343
$TfR2^{53A}$	24	143

Приклад 4: Вплив моноспецифічних і біспецифічних антитіл, які містять ефектори і які не містять ефекторів, на лінію клітин еритролейкемії людини і на первинні мононуклеарні клітини кісткового мозку

Попередні дослідження на мишах визначили, що антитіла, що зв'язують TfR мишачих з ефекторною функцією і/або зі здібностями зв'язування комплементу, селективно збіднюють TfR-експресуючі ретикулоцити. Щоб переконатися, чи є збідніння, що спостерігається при дослідженнях на мишах, унікальним для системи мишачих, здійснюють додаткові експерименти з використанням анти-TfR, що зв'язуються з TfR людини.

Аналізи ADCC здійснюють з використанням мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC) від здорових донорів людей як ефекторних клітин. Лінія клітин еритролейкемії людини (HEL, ATCC) і первинні мононуклеарні клітини кісткового мозку людини (AllCells, Inc.) використовують як цільові клітини. Для зведення до мінімуму розкиду серед донорів, який потенційно міг би виникнути, через алотипічні розходження в залишку в 158 положенні в FcγRIIIA, донори крові обмежуються тими, які несуть генотип гетерозиготного RcγRIIIA (F/V158) у першому наборі експериментів (Фігура 8A-B). Для другого набору експериментів (Фігура 9A-B), як цільові клітини використовують тільки клітини HEL, з PBMC від здорових донорів людей, що несуть або генотип F/V158, або генотип FcγRIIIA V/V158. Генотип V/V158 також включається в цей аналіз, через відому асоціацію з підвищенням активності ADCC, опосередковуваної NK клітинами, а також здатності зв'язувати антитіла IgG4 (Bowles and Weiner, 2005; Bruhns et al.

2008). Клітини зчитують, і життєздатність визначають за допомогою Vi-CELL®(Beckman Coulter; Fullerton, CA) слідуючи інструкціям виробника.

PBMC ізолюють за допомогою центрифугування в градієнті густини з використанням пробірок для поділу крові Uni-Sep™ (Accurate Chemical & Scientific Corp.; Westbury, NY). Цільові клітини в 50 мкл середовища для аналізу (RPMI-1640 з 1 % BSA і 100 одиниць/мл пеніциліну і стрептоміцину) висівають у 96-ямковий круглодонний планшет при 4×10^4/ямка. На планшети, що містять цільові клітини, додають послідовні розведення досліджуваних і контрольних антитіл (50 мкл/ямка), з наступним інкубуванням при 37 °C при 5 % CO_2 протягом 30 хвилин, щоб уможливити опсонізацію. Кінцеві концентрації антитіл знаходяться в межах від 0,0051 до 10000 нг/мл після 5-кратних послідовних розведень у цілому для 10 точок даних. Після інкубування $1{,}0\times10^6$ ефекторних клітин PBMC у 100 мкл середовища для аналізу додають у кожну ямку з одержанням відношення ефекторні клітини:цільові клітини 25:1, і планшети інкубують протягом додаткових 4 годин. По закінченні інкубування планшети центрифугують, і супернатанти досліджують на активність лактатдегідрогенази (LDH) з використанням Cytotoxicity Detection Kit™ (Roche Applied Scinece; Indianapolis, B). Реакційну суміш LDH додають до супернатантів, і планшети інкубують при кімнатній температурі протягом 15 хвилин при постійному струшуванні. Реакцію завершують за допомогою 1 M H_3PO_4, і вимірюють коефіцієнт поглинання при 490 нМ (фон, вимірюваний при 650 нМ, віднімають для кожної ямки) з використанням зчитувального пристрою для мікропланшетів SpectraMax Plus. Коефіцієнт поглинання ямок, що містять тільки цільові клітини, служить як контроль для фону (низький контроль), при цьому ямки, що містять цільові клітини, лізовані за допомогою Triton-X100, забезпечують максимальний доступний сигнал (високий контроль). Незалежну від антитіл клітинну цитотоксичність (AICC) вимірюють у ямках, що містять цільові і ефекторні клітини без додавання антитіла. Ступінь питомої ADCC обчислюють у такий спосіб:

$$\%\ ADCC = 100 \times \frac{A_{490}(\text{зразок}) - A_{490}(AICC)}{A_{490}(\text{високий контроль}) - A_{490}(\text{низький контроль})}$$

Значення ADCC для розведень зразка зображають у вигляді графіка залежності від концентрації антитіла, і криві доза-реакція підганяють за допомогою чотирипараметричної моделі з використанням SoftMax Pro.

У першому наборі експериментів, активність ADCC різних конструктів TfR анти-людини оцінюють з використанням або лінії клітин еритролейкемії людини (клітини HEL), або первинних мононуклеарних клітин кісткового мозку людини як цільових клітин. Двовалентне антитіло анти-TfR 1 людини 15G11 компетентне відносно ефекторної функції IgG1 і біспецифічна форма цього антитіла з плечем анти-BACE1 у форматі IgG1 людини, що містить мутації D265A і N297G для анулювання ефекторної функції (дивися Приклад 3), досліджуються при різних концентраціях при аналізі ADCC, з використанням IgG1 анти-gD WT як негативного контролю і антитіла мишачих HLA людини (клас I) як позитивного контролю. Результати показані на Фігурах 8A і 8B. Або для клітин HEL як мішеней (Фіг. 8A), або для мононуклеарних клітин кісткового мозку як мішеней (Фіг. 8B), моноспецифічне ефектор-позитивне антитіло анти-TfR людини 15G11 демонструє значну активність ADCC. Ця активність є подібною з активністю антитіл анти-HLA людини позитивного контролю відносно клітин HEL і знаходиться на стійкому, але більш низькому рівні відносно позитивного контролю на мононуклеарних клітинах кісткового мозку. Трохи більш низький рівень, що спостерігається в експерименті з мононуклеарними клітинами кісткового мозку, імовірно, пов'язаний з тим фактом, що тільки частина гетерогенної суміші мієлоїдної і еритроїдної ліній клітин PBMC, використовуваних в експерименті, експресує високі рівні TfR, у той час як клітини HEL мають консистентно високе експресування TfR по популяції клональних клітин. Як різкий контраст, біспецифічне антитіло анти-TfR людини/BACE1, що не містить ефекторів, не демонструє ніякої активності ADCC ні в клітинах HEL, ні в мононуклеарних клітинах кісткового мозку, подібно негативному контролю.

В другому наборі експериментів, оцінюють вплив переключення ізотипу антитіла в цій системі аналізу. Процедура аналіз ADCC ідентичний тій, яка описана вище, з тим виключенням, що всі цільові клітини являють собою клітини HEL, а ефекторні клітини являють собою PBMC від здорових донорів людей, що несуть або гетерозиготний генотип FcγRIIIa-V/F158, або гомозиготний генотип FcγRIIIa-V/V158. Усі досліджувані антитіла анти-TfR людини є біспецифічними, з анти-gD на трьох різних основних ланцюгах Ig: IgG1 людини дикого типу,

IgG1 людини з мутацією N297G і IgG4 людини. Досліджують також антитіло анти-Abeta з основним ланцюгом IgG4 людини, і антитіла миші анти-HLA людини (клас I) служать як позитивний контроль. Результати показані на Фігурах 9A і 9B. Як очікувалося на основі відомої асоціації між активуванням ефекторної клітини і генотипом V/V158 (Bowles and Weiner 2005), активність ADCC більш стійко демонструється донором PBMC V/V158 (виявляється вплив ~45 % цільових клітин) порівняно з донорами FA/158 (виявляється вплив ~25 % цільових клітин) (порівняйте Фіг. 9A і Фіг. 9B). Антитіла анти-TfR/gD з IgG1 дикого типу індукують стійку ADCC у клітинах HEL, у той час як анти-TfR/gD з IgG1, що не містить ефекторів, не показують ніякої активності ADCC у клітинах HEL, відтворюючи результати з першого набору експериментів. Відзначимо, що при концентраціях 100 нг/мл або вище, антитіла анти-TfR/gD ізотипу IgG4 показують помірну активність ADCC. Ця активність не спостерігається в результатах для IgG4 анти-Abeta, показуючи, що для ADCC активності потрібно зв'язування TfR. Ці дані корелюють з попередніми повідомленнями, що IgG4 має мінімальну, але вимірювану ефекторну функцію (Adolffson et al., J. Neurosci. 32(28):9677-9689 (2012); van der Zee et al. Clin Exp. Immunol. 64:415-422 (1986)); Tao et al., J. Exp. Med. 173:1025-1028 (1991)).

Приклад 5: Оцінка in vivo біспецифічних антитіл анти-TfR людини/BACE1

А. Фармакокінетичні, фармакодинамічні дослідження і дослідження безпеки

Для оцінки концентрацій лікарських засобів, ефектів фармакодинаміки і безпеки біспецифічних антитіл анти-TfR людини in vivo, мавпи циномолгус (Macaca fascicularis) дозуються біспецифічними антитілами з використанням клону 15G11 антитіла анти-TfR, спареного з таким же плечем анти-BACE1, як використовується в попередніх прикладах (анти-TfR^1/BACE1), або клоном 15G11.LC92A, спареним з таким же плечем анти-BACE1, як використовується в попередніх прикладах (анти-TfR^2/BACE1), або Hu15G11.N52A (анти-TfR^{52A}/BACE1) і Hu15G11.T^{53A}(анти-TfR^{53A}/BACE1). Ці біспецифічні антитіла мають формат IgG1 людини з мутаціями N297G або D265A і N297G, що анулюють ефекторну функцію, як описано раніше. Як контроль використовують молекулу анти-gD на IgG1 людини. Це дослідження здійснюють на приматах, відмінних від людини, оскільки крос-реактивність цих антитіл анти-TfR обмежується приматами, відмінними від людини, і людьми. На додаток до цього, дослідження показали, що механізми перенесення лікарських засобів між відділами спинномозкової рідини (CSF) і плазми можуть бути подібними між людьми і приматами (Poplack et al., 1977). Антитіла вводяться за допомогою однократної внутрішньовенної (IV) ін'єкції болюсу в сафенну вену в дозі 30 мг/кг здоровим мавпам циномолгус зі стаціонарно встановленими катетерами в мозочковомозковій цистерні. У різні моменти часу до 60 днів після дозування відбирають зразки плазми, сироватки і (CSF). Аналіз зразків включає гематологію (цільної крові), клінічну хімію (сироватки), концентрацію антитіла (сироватки і CSF) і фармакодинамічну реакцію на антитіло (плазма і CSF). Дивися Фігуру 10 відносно докладної схеми відбору зразків.

Концентрації дозованих антитіл у сироватці і CSF мавп циномолгус вимірюють за допомогою аналізу ELISA з використанням покриття з антитіл вівці анти-IgG людини, абсорбованого мавпою, з наступним додаванням зразків сироватки, починаючи від розведення 1:100 і закінчуючи за допомогою додавання антитіла кози анти-IgG людини, кон’югованого з пероксидазою хрону, абсорбованого мавпою, для детектування. Аналіз має стандартний діапазон кривої 0,78-50 нг/мл і межу детектування 0,08 мкг/мл. Результати нижче цієї межі детектування повідомляються як не реєстровані (LTR).

Фігури 11A-B показують результати фармакокінетичного аналізу для антитіл анти-TfR^1/BACE1 і анти-TfR^2/BACE1. Фармакокінетичний профіль для антитіла анти-gD є таким, як очікується для типового антитіла IgG1 людини у мавпах циномолгус із середнім виведенням 3,98 мл/день/кг. Обидва антитіла анти-TfR/BACE1 виводяться швидше ніж анти-gD, імовірно, завдяки периферичному виведенню, опосередковуваному мішенню. Анти-TfR^1/BACE1 має більш швидке виведення, відповідно до того, що воно має найвищу спорідненість зв'язування з TfR, у той час як анти-TfR^2/BACE1 показує поліпшений фармакокінетичний профіль (тобто більш тривале експонування в сироватці) порівняно з анти-TfR^1/BACE1, імовірно, завдяки його зниженій спорідненості до TfR. Виведення для анти-TfR^1/BACE1 і анти-TfR^2/BACE1 становить 18,9 мл/день/кг і 8,14 мл/день/кг, відповідно. Всі антитіла детектуються в CSF приблизно при одній тисячній від концентрації в сироватці. Однак є високий розкид і, у цілому, детектованих розходжень у концентрації антитіл у CSF між молекулами немає.

Таблиця 10

Середні (±SD) оцінки параметра PK для всіх досліджуваних антитіл після однократного внутрішньовенного введення дози болюсу при 30 мг/кг мавпам циномолгус (n=5)

Антитіло	AUCall (день* мкг/мл)	AUCinf (день* мкг/мл)	C_{max} (мкг/мл)	CL (мл/день/кг)	V_{ss} (мл/кг)
анти-gDD	7640±1790	7930±1910	912±141	3,98±1,05	51,3±10,2
анти-TfR^1/BACE1	1610±240	1610±237	809±132	18,9±2,54	41,0±8,18
анти-TfR^2/BACE1	3750±528	3750±530	850±69,2	8,14±1,21	41,2±6,06

SD=стандартне відхилення; IV=внутрішньовенно; AUC_{all}=площа під кривою концентрація-час від часу 0 до часу останньої вимірюваної концентрації; AUQ_{inf}=площа під кривою концентрація-час, екстрапольованою до безкінечності; C_{max}= спостережувана максимальна концентрація в сироватці; CL=виведення; V_{ss}=об'єм розподілу в стаціонарному стані; min=мінімум, max=максимум.

Фігура 19 показує результати фармакокінетичного аналізу для антитіл анти-TfR^1/BACE1, анти-TfR^{52A}/BACE1 і анти-TfR^{53A}/BACE1. Всі антитіла анти-TfR/BACE1 виводяться швидше ніж анти-gD, імовірно, завдяки периферичному виведенню, опосередковуваному мішенню. Анти-TfR^1/BACE1 показує найшвидше виведення, що відповідає тому, що воно має найвищу спорідненість зв'язування з TfR, у той час як анти-TfR^{52A}/BACE1 і анти-TfR^{53A}/BACE1 показують поліпшений фармакокінетичний профіль (тобто більш тривале експонування в сироватці) порівняно з анти-TfR^1/BACE1, імовірно, завдяки зниженій спорідненості до TfR в анти-TfR^{52A}/BACE1 і анти-TfR^{53A}/BACE1.

Щоб побачити фармакодинамічний вплив у відповідь на дозування анти-TfR/BACE1, автори вимірювали рівні $Abeta_{1-40}$ і sAPPα і βAPPβ у плазмі і CSF мавп циномолгус. $Abeta_{1-40}$ вимірюють за допомогою ELISA з використанням специфічного поліклонального покриття з антитіл анти-$Abeta_{1-40}$, з наступним додаванням зразків і закінчують додаванням моноклонального антитіла миші анти-$Abeta_{1-40}$ людини, кон'югованого з пероксидазою хрону, для детектування. Аналіз має межу детектування 60 пг/мл для плазми і 140 пг/мл для CSF. Результати нижче цієї концентрації вважаються не детектованими (LTR). Концентрації в CSF sAPPα і sAPPβ визначають із використанням мультиспотового аналізу sAPPβ/sAPPα (Mesoscale Discovery (Gaithersburg, MD)). CSF відтаюють на льоду, потім розводять 1:10 у 1 % BSA у TBS-T (10 мМ Tris буфера, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 0,1 % Tween-20). Аналіз здійснюють відповідно до протоколу виробника. Аналіз має нижню межу значень кількісного визначення 0,05 нг/мл для sAPPα і 0,03 нг/мл для sAPPβ.

Фігури 12A-E наводять зведення фармакодинамічної поведінки антитіл. На периферії, рівні $Abeta_{1-40}$ у плазмі залишаються незмінними після введення анти-gD, але транзиторно зменшуються після введення анти-TfR/BACE1. Обидва варіанти знижують рівні $Abeta_{1-40}$ у плазмі, при максимальному інгібуванні 50 %, що досягається через 1 день після дозування. Рівні $Abeta_{1-40}$ у плазмі поступово відновлюються, при цьому тварини, що одержують анти-TfR^1/BACE1, повертаються до фонових рівнів $Abeta_{1-40}$ приблизно через 14 днів після дозування. Рівні $Abeta_{1-40}$ повертаються до фонових рівнів у межах між 21 і 30 днями після дозування у тварин, яких лікують анти-TfR^2/BACE1. Обидва антитіла анти-TfR/BACE1 знижують рівні $Abeta_{1-40}$ у CSF, при цьому змін не спостерігається у тварин, яким дозують анти-gD. Введення анти-TfR^1/BACE1 дає в результаті більш значне зменшення рівнів $Abeta_{1-40}$ у CSF (середнє максимальне інгібування 50 % від фонового), ніж для анти-TfR^2/BACE1 (середнє максимальне інгібування 20 % від фонового). Продукування sAPPβ інгібується у тварин, лікованих анти-TfR/BACE1, але не у тварин, що одержували анти-gD. Подібно результатам для Aβ40, анти-TfR^1/BACE1 має більш сильний інгібіторний вплив на продукування sAPPβ, ніж анти-TfR^2/BACE1, продукування sAPPα стимулюється під час інгібування BACE1 як анти-TfR^1/BACE1, так і анти-TfR^2/BACE1, і реакція має зворотну кореляцію з рівнем інгібування, що спостерігається для sAPPβ і $Abeta_{1-40}$. sAPPα і sAPPβ являють собою первинні продукти

процесування білка-попередника амілоїду (APP), і їхні рівні сильно скорельовані. Відношення sAPPβ/sAPPα нормує результати на потенційні зміни у фоновому експресуванні APP або потенційні переданалітичні розходження при зборі CSF і маніпуляціях з нею в ході досліджень. Відношення sAPPβ/sAPPα у CSF з анти-TfR^{1}/BACE1 демонструє більш стійкий ефект PD, ніж анти-TfR^{2}/BACE1. Таким чином, ці результати підтримують залученість мішені (тобто BACE1) для антитіл анти-TfR/BACE1.

Реакція PD для антитіл анти-TfR^{52A}/BACE1 і анти-TfR^{53A}/BACE1 також корелює з тривалістю експонування антитіла і зниженням спорідненості плеча до TfR показує збільшення зменшення Aβ40 (дані не показані). Ці дані також підтримують залученість мішені в цих біспецифічних антитілах.

У цілому, ці результати говорять, що біспецифічне антитіло анти-TfR/BACE1 зі спорідненістю до TfR людини в межах між спорідненістю анти-TfR^{1}/BACE1 і анти-TfR^{2}/BACE1, імовірно, мало би бажаний фармакокінетичний/фармакодинамічний баланс.

У даному дослідженні не спостерігається ніяких сигналів відносно безпеки. Немає ніяких доведених впливів на будь-які параметри гематології або клінічної хімії для мавп, що одержують 30 мг/кг будь-якого введеного біспецифічного антитіла, до 60 днів після дозування. Важливо, що рівні ретикулоцитів залишаються незмінними при лікуванні або анти-TfR^{1}/BACE1, або анти-TfR^{2}/BACE1 (Фігура 13), як і очікувалося, оскільки ці антитіла мають ослаблену ефекторну функцію, і середній рівень циркулюючих ранніх ретикулоцитів з високими рівнями TfR у нормальних приматів є дуже низьким (дивися Приклад 4).

Приклад 6: Оцінка біспецифічних антитіл анти-TfR/BACE1 людини in vivo

Для дослідження співвідношення між фармакодинамікою антитіла в CSF і фармакокінетикою в головному мозку, мавпам циномолгус (Macaca fascicularis) дозують біспецифічні антитіла анти-TfR^{1}/BACE1 або анти-TfR^{2}/BACE1, як у попередньому прикладі. Ці біспецифічні антитіла мають формат IgG1 людини з мутаціями D265A і N297G, що анулюють ефекторну функцію. Як контроль використовують молекулу анти-gD на IgG1 людини. Для порівняння, автори також дозують двовалентне антитіло анти-BACE1, що являє собою такий же клон, як використовується для біспецифічних антитіл. Антитіла вводяться за допомогою однократної внутрішньовенної (IV) ін'єкції болюсу в сафенну вену в дозі 30 мг/кг здоровим мавпам циномолгус зі стаціонарно встановленими катетерами в мозочковомозковій цистерні. Фонові зразки CSF збирають за 24 і 48 годин перед дозуванням, і інший зразок CSF збирають через 24 години після дозування (як показано схематично на Фігурі 14). Після збору CSF через 24 години після дозування здійснюють вливання сольового розчину твариним, і головний мозок збирають для аналізу концентрації антитіла. Різні області головного мозку гомогенізують у 1 % NP-40 (Cal-Biochem) у PBS, що містить таблетки повного міні-коктейлю інгібіторів протеаз, що не містить EDTA (Roche Diagnostics). Гомогенізовані зразки головного мозку обертають при 4 °C протягом 1 години перед центрифугуванням при 14000 об./хв. протягом 20 хвилин. Супернатант ізолюють для вимірювання рівнів антитіла в головному мозку з використанням способу ELISA, описаного в попередньому прикладі. Кров також збирають для підтвердження периферичного експонування і реакцій фармакодинаміки, що є подібними зі спостереженнями авторів у Прикладі 5.

Фармакодинамічні впливи анти-TfR^{1}/BACE1 і анти-TfR^{2}/BACE1, як оцінюється, у CSF також є подібними з ефектами, що спостерігаються в попередньому прикладі. Фігура 15 демонструє, що відношення sAPPβ/sAPPα у CSF стійко зменшується після дозування анти-TfR^{1}/BACE1. Анти-TfR^{2}/BACE1 не показує явного зменшення через 24 години після дозування при цих дослідженнях. Анти-BACE1 також не показує впливу. Аналіз концентрацій антитіла в головному мозку показує, що як контрольний IgG, так і антитіло анти-BACE1 мають обмежене споживання в головному мозку при рівнях, що ледве перевищують межу детектування в аналізі авторів (у середньому ~670 пМ). Анти-TfR^{2}/BACE1 має в ~3 рази поліпшене споживання в головному мозку порівняно з контрольним IgG (у середньому ~2 нМ), і анти-TfR^{1}/BACE1 має найкраще споживання в головному мозку, у ~15 разів більше, ніж контрольний IgG (у середньому ~10 нМ). Концентрації антитіла в головному мозку для різних антитіл корелюють з реакцією фармакодинаміки, що спостерігається в CSF у дослідженнях авторів, при цьому анти-TfR^{1}/BACE1 має найкраще споживання в головному мозку і найбільш стійкий вплив фармакодинаміки, і анти-TfR^{2}/BACE1 має менше споживання в головному мозку і більш помірний вплив.

Ці результати розширюють попередні дані авторів, демонструючи, що біспецифічні антитіла, що зв'язують TfR, поліпшують споживання в головному мозку приматів, відмінних від людини. У приматів, як і в мишей, імовірно, є оптимальна спорідненість до TfR, що найкраще балансує споживання в головному мозку і виведення, опосередковуване TfR. У прикладі авторів, анти-

TfR^1/BACE1 з більш високою спорідненістю демонструє хороше споживання в головному мозку, і на нього впливає периферичне виведення, опосередковуване мішенню. TfR^2/BACE1 зі зменшеною спорідненістю має поліпшені властивості при виведенні, але, напевно, має настільки низьке зв'язування з TfR, що не може ефективно переноситися за допомогою TfR (в основному таким же шляхом, коли антитіло анти-TfR TfR^E, що має низьку спорідненість, в патенті США US 2012/0171120 переходить через деякий поріг спорідненості, за яким спорідненість є занадто низькою, щоб уможливити достатню взаємодію між антитілом і TfR так, що антитіло залишалося б асоційованим з TfR, коли TfR починає процес транслокації). За результатами цього експерименту біспецифічне антитіло анти-TfR/BACE1 людини/цино, що має спорідненість до TfR у межах між TfR^1і TfR^2, відповідно до передбачень, повинне мати поліпшені властивості споживання і виведення порівняно або з анти-TfR^1/BACE1, або з анти-TfR^2/BACE1 у цій системі.

Приклад 7: Створення додаткових мутацій, які не містять ефекторів, у контексті біспецифічного антитіла рецептора трансферину

Інші мутації в Fc-області, які анулюють ефекторну функцію, на додаток до N297G і D26A, досліджуються на їхню здатність зменшувати або запобігати збідніння TfR-експресуючих ретикулоцитів. Конкретно, Fc-мутації L234A, L235A і P329G ("LALAPG"), що описані в публікації заявки на патент США № 2012/021531, що включається в даний документ як посилання, вводяться в антитіло анти-TfR^D/BACE1 (яке описано в публікації Міжнародної заявки на патент № 2013/177062, і яка включається в даний документ як посилання у всій своїй повноті).

Фармакокінетичний аналіз і кількість ретикулоцитів після однократного введення антитіла мишам здійснюють у такий спосіб. Самки мишей C57B/6 дикого типу у віці 6-8 тижнів використовуються для всіх досліджень. Догляд за тваринами здійснюється відповідно до офіційних інструкцій. Мишам дозують внутрішньовенно однократну дозу 50 мг/кг або антитіла анти-gD (IgG2a мишачих) з мутаціями LALAPG, антитіла анти-TfR^D/BACE1 (химера щура/мишачих) з мутаціями LALAPG. Загальний об'єм ін'єкції не перевищує 250 мкл і антитіла розводять у D-PBS, при необхідності (Invitrogen). Через 24 години цільну кров збирають перед вливанням у пробірки мікроконтейнери з EDTA (BD Diagnostics), дають можливість для осідання протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, і центрифугують при 5000x g протягом 10 хвилин. Верхній шар плазми переносять у нові пробірки для вимірювань антитіла.

Загальні концентрації антитіла в плазмі мишей вимірюють із використанням для ELISA антитіла анти-IgG2a миші (алотип a)/антитіла анти-IgG2a миші (алотип a). 384-ямкові імунопланшети Maxisorp NUNC (Neptune, NJ) покривають антитілом миші анти-IgG2a, алотип A, антитілом, специфічним до алотипу A (BD/Pharrnigen San Jose, CA), протягом ночі при 4 °C. Планшети блокуються за допомогою PBS, 0,5 % BSA протягом 1 години при 25 °C. Кожне антитіло (анти-gD і біспецифічні варіанти анти-TfR/BACE1) використовують як стандарт для кількісного визначення концентрації антитіла. Планшети промивають PBS, 0,05 % Tween-20 з використанням пристрою для промивання для мікропланшетів (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT), і стандарти і зразки, розведені в PBS, що містить 0,5 % BSA, 0,35 M NaCl, 0,25 % CHAPS, 5 мМ EDTA, 0,2 % BgG, 0,05 % Tween-20 і 15 м. ч. Proclin® (Sigma-Aldrich), додають протягом двох годин при 25 °C. Зв'язане антитіло детектують за допомогою біотин-кон'югованого антитіла миші анти-IgG2a, алотип A, антитіла специфічного до алотипу A (BD/Pharmigen San Jose, CA). Зв'язане антитіло, кон'юговане з біотином, детектують за допомогою стрептавідину, кон'югованого з пероксидазою хрону (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). Зразки виявляють з використанням 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (TMB) (KPL, Inc., Gaithersburg, MD), і коефіцієнт поглинання вимірюють на 450 нМ за допомогою пристрою для зчитування Multiskan Ascent (Thermo Scientific, Hudson, NH). Концентрації визначають зі стандартної кривої з використанням програми чотирипараметричної нелінійної регресії. Аналіз має нижню межу значення кількісного визначення (LLOQ) 78,13 нг/мл у плазмі. Статистичний аналіз розходжень між експериментальними групами здійснюють із використанням двохвостового непарного t-тесту.

При введенні антитіл анти-TfR^D/BACE1, що містять мутації Fc LALAPG, миші не демонструють клінічних симптомів, як спостерігалося раніше з використанням антитіл з повною ефекторною функцією. Дивися Couch et al., Sci. Trans. Med. 5:183ra57 (2013). Фігура 20 показує результати фармакокінетичного аналізу.

На додаток до цього, кількість незрілих ретикулоцитів і ретикулоцитів у цілому визначають із використанням Sysmex XT2000iV (Sysmex, Kobe, Japan) відповідно до інструкцій виробників. Через 24 години після дозування не спостерігається розходжень у частці незрілих ретикулоцитів або в загальній кількості ретикулоцитів порівняно з будь-яким досліджуваним антитілом, як видно на Фігурі 21. Ці результати говорять про те, що мутація LALAPG не тільки анулює

ефекторну функцію антитіла, але також зменшує зв'язування комплементу й опосередковуване комплементом виведення ретикулоцитів, видно навіть для каркаса антитіла, що не містить ефектора (Couch et al. 2013). Це відповідає іншому повідомленню про те, що включення мутації LALA у IgG1 людини може обмежувати зв'язування комплементу (Hessell et al. Nature 449:101-104 (2007)).

Приклад 8 - Одержання біспецифічних варіантів $FcRn^{HIGH}$

Для збільшення часу напівжиття біспецифічних антитіл, і тим самим, потенційного збільшення концентрації антитіла в головному мозку, одержують біспецифічні варіанти, що містять мутації в постійному домені IgG, а конкретно - у домені, що зв'язується з Fc-рецептором немовлят (FcRn) (мутації $FcRn^{HIGH}$). Домен зв'язування FcRn бере участь у перенесенні антитіл від матері до плоду. Дивися Story et al., J. Exp. Med., 180:2377 2381, 1994. Заміщення амінокислот у домені зв'язування FcRn збільшує спорідненість постійного домену до FcRn, збільшуючи тим самим час напівжиття антитіла.

Мутації домену зв'язування FcRn M252Y, S254T і T256E (YTE) як описано, збільшують зв'язування FcRn і, таким чином, збільшують час напівжиття антитіл. Дивися опубліковану заявку на патент США № 2003/0190311 і Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281:23514-23524 (2006). На додаток до цього, мутації домену зв'язування FcRn N434A і Y436I (AI), як описано, також збільшують зв'язування FcRn. Дивися Yeung et al., J. Immunol. 182:7663-7671 (2009). Мутації YTE (M252Y/S254T/T256E) і AI (N434/Y436I) включені в біспецифічні антитіла, як анти-TfR^{52A}/BACE1, так і анти-TfR^{2}/BACE1, що містять або WT IgG1 людини, або не містять ефекторів мутації LALAPG або N297G. На додаток до цього, мутації $FcRn^{HIGH}$ здійснюють в антитілі hIgG1 анти-gD, як контролі. Мутації конструюють з використанням мутагенезу по Кункелю, антитіла експресуються транзиторно в клітинах CHO, і білки очищуються з використанням хроматографії на білку A з наступною ексклюзійною хроматографією (SEC).

Зв'язування варіантів антитіл $FcRn^{HIGH}$ з FcRn вимірюється з використанням BIAcore. Білки FcRn людини і мавпи циномолгус експресуються в CHO і очищуються з використанням афінної хроматографії на IgG. Дані одержують на інструменті BIAcore T200. Сенсорний чип серії S CM5 (GE Healthcare, Cat. BR100530) активують за допомогою реагентів EDC і NHS відповідно до інструкцій постачальника, і антитіло анти-Fab (Human Fab capture kit, GE Health care Bio-science. AB SE-7 184, Uppsala, Sweden) зв'язують з одержанням приблизно 10000 одиниць відгуку (RU), з наступним блокуванням груп, які не прореагували, за допомогою 1 метаноламіну. Для вимірювань спорідненості спочатку здійснюють інжекцію антитіл при швидкості потоку 10 мкл/хв., для захоплення приблизно 1000 RU на 3 різних проточних комірках (FC), за винятком FC1 (для порівняння), а потім інжектують 2-кратні послідовні розведення FcRn людини (або FcRn цино) у буфері pH6 (0,1M фосфат натрію), від низьких концентрацій (1 нМ) до високих (25 мкМ) (швидкість потоку: 30 мкл/хв.), одне за іншим, у тому самому циклі без регенерації між ін'єкціями. Реєструють сенсограми і здійснюють віднімання для порівняння і буфера перед оцінкою з використанням BIAcore T200 Evaluation Software (version 2,0). Спорідненість визначають за допомогою аналізу рівня зв'язування в стаціонарному стані на підставі моделі зв'язування 1:1. Спорідненість зв'язування для варіантів LALAPG, N297G, LALAPG.YTE і LALAPG.AI антитіла анти-TfR^{52A}/BACE1 показані в Таблиці 11, нижче. Дані показують, що варіанти $FcRn^{HIGH}$ збільшують спорідненість при ендосомальних умовах (pH 6) до FcRn, як людини, так і цино.

Таблиця 11

Антитіло	Ефекторна функція	FcRn High	FcRn людини	FcRn цино
			KD при pH6 (мкМ)	KD при pH6 (мкМ)
Анти-TfR.52A/BACE1.hIgG1	WT	WT		
Анти-TfR.52A/BACE1.hIgG1.N297G	N297G	WT	1,3	2,1
Анти-TfR.52A/BACE1.h1gG1.LALAPG	LALAPG	WT	0,8	1,2
Анти-TfR.52A/BACE1.hIgG1.N297G.YTE	N297G	YTE		
Анти-TfR.52A/BACE1.hIgG1.LALAPG.YTE	LALAPG	YTE	0,2	0,2
Анти-TfR.52A/BACE1.hIgG1.N297G.AI	N297G	N434A/Y436I		
Анти-TfR.52A/BACE1.hIgLALAPG.AI	LALAPG	N434A/Y436I	0,6	0,4
Анти-TfR.52A/BACE1.hIgG1.N297G.A	N297G	N434A		

Продовження таблиці 11

Анти-TfR2/BACE1.hIgG1 N297G	N297G	WT	1,7	2,1
Анти-TfR2/BACE1.hIgG1.LALAPG	LALAPG	WT	1,1	1,2
Анти-TfR2/RAP.E1.hIgG1.LALAPG.YTE	LALAPG	YTE	0,3	0,2
Анти-gG.hIgG1	WT	WT	0,7	0,9
Анти-gG.hIgG1.YTE	WT	YTE		
Анти-gG.hIgG1.AI	WT	N434A/Y436I	0,3	0,4
Анти-gG.hIgG1.A	WT	N434A	0,1	0,7

Вибрані варіанти $FcRn^{HIGH}$ будуть досліджуватися на мавпах циномолгус для визначення того, чи може підвищення спорідненості до FcRn поліпшити фармакокінетичні властивості і/або збільшити експонування для головного мозку антитіла анти-TfR/BACE1.

Для оцінки безпеки мутацій, що не мають ефекторів, і мутацій $FcRn^{HIGH}$ визначені біспецифічні антитіла вводяться мишам, нокаутованим рецептором трансферину людинии, що експресують рецептору трансферину людини. Миші, нокаутовані huTfR, генеруються в такий спосіб. Конструкт для націлювання cDNA TfR людини на локус C57BL/6 Tfrc у клітинах ES одержують з використанням сполучення методик рекомбінування (Warming et al. Molecular and Cellular Biology vol. 26 (18) pp. 6913-22 2006; Liu et al. Genome Research (2003) vol. 13 (3) pp. 476-84) і стандартних методик молекулярного клонування.

Коротко, касета (cDNA TfR людини, SV40 pA і frt-PGK-em7-Neo-BGHpA-frt), фланкована за допомогою коротких гомологічних груп із геном Tfrc миші, використовується для модифікації Tfrc C57BL/6J BAC (бібліотека RP23 BAC) за допомогою рекомбінування. Касета cDNA TfR людини вставляється в ендогенну ATG, і залишок екзона 2 Tfrc плюс початку інтрона 2 видаляється. Цільова область у BAC потім повертається в pBlight-TK (Warming et al. Molecular and Cellular Biology vol. 26 (18) pp. 6913-22 2006) разом із фланкуючими геномними послідовностями Tfrc як гомологічними плечами для націлювання на клітини ES. Конкретно, 5' гомологічне плече, 2950 bp, відповідає (зборці NCBI37/mm9): chr.16:32,610,333-32,613,282 і 3' гомологічне плече, 2599 bp, відповідає chr.16:32,613,320-32,615,918. Кінцевий вектор підтверджується за допомогою секвенування ДНК.

Вектор Tfrc/TFRC KI лінеаризується за допомогою NotI і C57BL/6N C2 і націлюється на клітини ES з використанням стандартних способів (G418-позитивна і ганцикловір-негативна селекція). Позитивні клони ідентифікуються з використанням PCR і аналізу TaqMan і підтверджуються за допомогою секвенування модифікованого локусу. Правильно націлені клітини ES трансфікуються плазмідою Flpe для видалення Neo, і потім клітини ES уводяться як ін'єкція в бластоцисти з використанням стандартних методик. Зародкову передачу одержують після схрещування отриманих у результаті химер із самками C57BL/6N.

Конкретно, антитіла, перераховані в Таблиці, нижче, уводять мишам, нокаутованим huTfR, у вигляді однократної дози 50 мг/кг і через 24 години витягають кров і досліджують ретикулоцити, huIg1, N297G.

Таблиця 12

Антитіло	Ізотип	Кількість мишей
Анти-gD	hulg1, N297G	6
анти-TfR^{52A}/BACE1	hulgG1, N297G	6
анти-TfR^{52A}/BACE1	hulgG1, LALAPG	6
анти-TfR^{52A}/BAGE1	hulgG1, LALAPG/YTE	6
анти-TfR^{52A}/BACE1	hulgG1, LALAPG/AI	6

Після введення антитіл анти-TfR^{52A}/BACE1 LALAPG, LALAPG/YTE або LALAPG/AI (Групи 3-5 у Таблиці 12), миші, нокаутовані TfR людини, не виявляють клінічних симптомів або втрати ретикулоцитів (Фігура 22), як спостерігалося раніше з використанням антитіл анти-TfR з повною

ефекторною функцією (Couch et al. 2013). Ці результати показують, що включення мутацій LALAPG у каркас IgG1 людини також анулює ефекторну функцію і, крім того, говорить, що додавання мутацій або YTE, або AIFcRn^{HIGH} не впливає негативно на бажані властивості мутацій LALAPG, щоб зробити антитіло таким, що не містить ефекторів.

Здійснюють також аналізи ADCC для підтвердження статусу, що не містить ефекторів, сполучень мутацій LALAPG, LALAPG/YTE і LALAPG/AI у лінії клітин, отриманих від людини. Як і раніше, лінія клітин еритролейкемії людини (HEL, ATCC) використовується як клітини мішені з PBMC від здорових донорів-людей, що несуть або генотип F/V158, або генотип FcγRIIIA V/V158. Генотип V/V158 також включається в даний аналіз, через відому асоціацію зі збільшенням активності ADCC, опосередковуваної NK-клітинами, а також здатності зв'язувати антитіла IgG4 (Bowles and Weiner, 2005: Bruhns et al. 2008). Клітини зчитують, і їхня життєздатність визначається за допомогою Vi-CELL® (Beckman Coulter; Fullerton, CA), слідуючи інструкціям виробника.

PBMC ізолюють за допомогою центрифугування в градієнті густини з використанням пробірок для поділу крові Uni-Sep™ (Accurate Chemical & Scientific Corp.; Westbury, NY). Цільові клітини в 50 мкл середовища для аналізу (RPMI-1640 з 1 % BSA і 100 одиниць/мл пеніциліну і стрептоміцину) висівають у 96-ямковий круглодонний планшет при 4×10^4/ямка. Послідовні розведення досліджуваних і контрольних антитіл (50 мкл/ямка) додають у планшети, що містять цільові клітини, з наступним інкубуванням при 37 °C з 5 % CO_2 протягом 30 хвилин, щоб уможливити опсонізацію. Кінцеві концентрації антитіл у межах від 0,0051 до 10000 нг/мл вимірюють після 5-кратних послідовних розведень у цілому для 10 моментів часу. Після інкубування $1{,}0\times10^6$ ефекторних клітин PBMC у 100 мкл середовища для аналізу додають у кожну ямку для одержання відношення ефекторні клітини:цільові клітини 25:1, і планшети інкубують протягом додаткових 4 годин. Планшети центрифугують наприкінці інкубування, і супернатанти досліджують на активність лактатдегідрогенази (LDH) з використанням Cytotoxicity Detection Kit™ (Roche Applied Science; Indianapolis, У). Реакційну суміш з LDH додають до супернатантів, і планшети інкубують при кімнатній температурі протягом 15 хвилин при постійному струшуванні. Реакцію завершують за допомогою 1 M H_3PO_4, і коефіцієнт поглинання вимірюють при 490 нМ (фон, вимірюваний при 650 нМ, віднімають для кожної ямки) з використанням зчитувального пристрою для мікропланшетів SpectraMax Plus. Коефіцієнт поглинання ямок, що містять тільки цільові клітини, служить як контроль для фону (низький контроль), у той час як ямки, що містять цільові клітини, лізовані за допомогою Triton-X100, забезпечують максимальний доступний сигнал (високий контроль). Незалежну від антитіла клітинну цитотоксичність (AICC) вимірюють у ямках, що містять цільові і ефекторні клітини без додавання антитіла. Частка конкретних ADCC обчислюється в такий спосіб:

$$\%\ ADCC = 100 \times \frac{A_{490}(\text{зразок}) - A_{490}(AICC)}{A_{490}(\text{високий контроль}) - A_{490}(\text{низький контроль})}$$

Значення ADCC розведень зразка зображають у вигляді графіка залежності від концентрації антитіла, і криві доза-реакція підганяють до чотирипараметричної моделі з використанням SoftMax Pro.

Результати аналізу ADCC показані на Фігурі 23. Як і очікувалося, ефектор-позитивне антитіло анти-TfR людини (анти-TfR^1/gD IgG1 WT) демонструє значну активність ADCC на клітинах HEL. На протиавгу цьому, варіанти антитіла анти-TfR^{52A}/BACE1, що містять мутації LALAPG, LALAPG/YTE або LALAPG/AI, не демонструють ніякої активності ADCC на клітинах HEL, подібно негативному контролю, антитілу анти-TfR^{52A}/gD N297G.

Хоча викладений вище даний винахід описаний у деяких подробицях як ілюстрація і приклад для цілей ясності розуміння, описи і приклади не повинні розглядатися як такі, що обмежують рамки даного винаходу. Опис усієї патентної і наукової літератури, цитованої у даному документі, у явному вигляді включається у всій його повноті як посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> АНТИТІЛА АНТИ-РЕЦЕПТОР ТРАНСФЕРИНУ І СПОСОБИ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ
<130> P5641R1-WO

<140>
<141>

<150> 61/825,477
<151> 2013-05-20

<160> 175

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 760
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 1
Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu
1 5 10 15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp
20 25 30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Val Asp Glu Glu Glu Asn Ala
35 40 45

Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Val Thr Lys Pro Lys Arg Cys Ser Gly
50 55 60

Ser Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Val Phe Phe Leu Ile Gly
65 70 75 80

Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr
85 90 95

Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro
100 105 110

Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys
115 120 125

Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Ser Thr Asp Phe Thr Ser Thr Ile
130 135 140

Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln
145 150 155 160

Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe
165 170 175

Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val
180 185 190

Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg
195 200 205

Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys
210 215 220

Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys
225 230 235 240

Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile
245 250 255

Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu
260 265 270

Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe
275 280 285

Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly
290 295 300

Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln
305 310 315 320

Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr
325 330 335

Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp
340 345 350

Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser
355 360 365

Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile
370 375 380

Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp
385 390 395 400

His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala
405 410 415

Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met
420 425 430

Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile
435 440 445

Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr

450 455 460

Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr
465 470 475 480

Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val
485 490 495

Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn
500 505 510

Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp
515 520 525

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe
530 535 540

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp
545 550 555 560

Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu
565 570 575

Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu
580 585 590

Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn
595 600 605

Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp
610 615 620

Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln
625 630 635 640

Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu
645 650 655

Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys
660 665 670

Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro
675 680 685

Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser
690 695 700

Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys
705 710 715 720

Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala
725 730 735

Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp
740 745 750

Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
755 760

<210> 2
<211> 760
<212> БІЛОК
<213> Чорна макака

<400> 2
Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu
1 5 10 15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp
20 25 30

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

Asp Asn Asn Thr Lys Pro Asn Gly Thr Lys Pro Lys Arg Cys Gly Gly
50 55 60

Asn Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Ile Phe Phe Leu Ile Gly
65 70 75 80

Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr
85 90 95

Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Ala Arg Glu Glu Pro
100 105 110

Glu Glu Asp Phe Pro Ala Ala Pro Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys
115 120 125

Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Thr Thr Asp Phe Thr Ser Thr Ile
130 135 140

Lys Leu Leu Asn Glu Asn Leu Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln
145 150 155 160

Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Ile Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe
165 170 175

Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val
180 185 190

Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Gly
195 200 205

Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys
210 215 220

Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys
225 230 235 240

Lys Asp Phe Glu Asp Leu Asp Ser Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile
245 250 255

Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu
260 265 270

Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe
275 280 285

Pro Ile Val Lys Ala Asp Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly
290 295 300

Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln
305 310 315 320

Phe Pro Pro Ser Gln Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr
325 330 335

Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp
340 345 350

Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Lys Met Val Thr Ser
355 360 365

Glu Asn Lys Ser Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Thr
370 375 380

Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp
385 390 395 400

His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala
405 410 415

Ala Lys Ser Ser Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met
420 425 430

Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile
435 440 445

Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr
450 455 460

Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr
465 470 475 480

Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val
485 490 495

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

500 505 510

Val Lys His Pro Val Thr Gly Arg Ser Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp
515 520 525

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe
530 535 540

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp
545 550 555 560

Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu
565 570 575

Val Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu
580 585 590

Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Thr Glu Leu Asn
595 600 605

Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Leu Phe Leu Arg Asp
610 615 620

Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Val Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln
625 630 635 640

Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu
645 650 655

Thr Thr Asp Phe Arg Asn Ala Glu Lys Arg Asp Lys Phe Val Met Lys
660 665 670

Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr Tyr Phe Leu Ser Pro
675 680 685

Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser
690 695 700

Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Leu Glu Ser Leu Lys Leu Arg Arg
705 710 715 720

Gln Asn Asn Ser Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala
725 730 735

Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp
740 745 750

Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
755 760

<210> 3
<211> 763
<212> БІЛОК

<213> Mus musculus

<400> 3
Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu
1 5 10 15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp
20 25 30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Ala Asp Glu Glu Glu Asn Ala
35 40 45

Asp Asn Asn Met Lys Ala Ser Val Arg Lys Pro Lys Arg Phe Asn Gly
50 55 60

Arg Leu Cys Phe Ala Ala Ile Ala Leu Val Ile Phe Phe Leu Ile Gly
65 70 75 80

Phe Met Ser Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Arg Val Glu Gln Lys Glu
85 90 95

Glu Cys Val Lys Leu Ala Glu Thr Glu Glu Thr Asp Lys Ser Glu Thr
100 105 110

Met Glu Thr Glu Asp Val Pro Thr Ser Ser Arg Leu Tyr Trp Ala Asp
115 120 125

Leu Lys Thr Leu Leu Ser Glu Lys Leu Asn Ser Ile Glu Phe Ala Asp
130 135 140

Thr Ile Lys Gln Leu Ser Gln Asn Thr Tyr Thr Pro Arg Glu Ala Gly
145 150 155 160

Ser Gln Lys Asp Glu Ser Leu Ala Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Phe His
165 170 175

Glu Phe Lys Phe Ser Lys Val Trp Arg Asp Glu His Tyr Val Lys Ile
180 185 190

Gln Val Lys Ser Ser Ile Gly Gln Asn Met Val Thr Ile Val Gln Ser
195 200 205

Asn Gly Asn Leu Asp Pro Val Glu Ser Pro Glu Gly Tyr Val Ala Phe
210 215 220

Ser Lys Pro Thr Glu Val Ser Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly
225 230 235 240

Thr Lys Lys Asp Phe Glu Glu Leu Ser Tyr Ser Val Asn Gly Ser Leu
245 250 255

Val Ile Val Arg Ala Gly Glu Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn
260 265 270

Ala Gln Ser Phe Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Lys Asn
275 280 285

Lys Phe Pro Val Val Glu Ala Asp Leu Ala Leu Phe Gly His Ala His
290 295 300

Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His
305 310 315 320

Thr Gln Phe Pro Pro Ser Gln Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val
325 330 335

Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Lys Met Glu
340 345 350

Gly Ser Cys Pro Ala Arg Trp Asn Ile Asp Ser Ser Cys Lys Leu Glu
355 360 365

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Val Lys Leu Ile Val Lys Asn Val Leu Lys
370 375 380

Glu Arg Arg Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Tyr Glu Glu
385 390 395 400

Pro Asp Arg Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Leu Gly Ala
405 410 415

Gly Val Ala Ala Lys Ser Ser Val Gly Thr Gly Leu Leu Leu Lys Leu
420 425 430

Ala Gln Val Phe Ser Asp Met Ile Ser Lys Asp Gly Phe Arg Pro Ser
435 440 445

Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Thr Ala Gly Asp Phe Gly Ala Val
450 455 460

Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys
465 470 475 480

Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Val Val Leu Gly Thr Ser Asn
485 490 495

Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Met Gly Lys Ile
500 505 510

Met Gln Asp Val Lys His Pro Val Asp Gly Lys Ser Leu Tyr Arg Asp
515 520 525

Ser Asn Trp Ile Ser Lys Val Glu Lys Leu Ser Phe Asp Asn Ala Ala
530 535 540

Tyr Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe

545 550 555 560

Cys Glu Asp Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Arg Leu Asp Thr Tyr
565 570 575

Glu Ala Leu Thr Gln Lys Val Pro Gln Leu Asn Gln Met Val Arg Thr
580 585 590

Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Leu Ile Ile Lys Leu Thr His Asp Val
595 600 605

Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Met Tyr Asn Ser Lys Leu Leu Ser Phe
610 615 620

Met Lys Asp Leu Asn Gln Phe Lys Thr Asp Ile Arg Asp Met Gly Leu
625 630 635 640

Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Tyr Phe Arg Ala Thr
645 650 655

Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe His Asn Ala Glu Lys Thr Asn Arg Phe
660 665 670

Val Met Arg Glu Ile Asn Asp Arg Ile Met Lys Val Glu Tyr His Phe
675 680 685

Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Arg Glu Ser Pro Phe Arg His Ile Phe
690 695 700

Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Val Glu Asn Leu Lys
705 710 715 720

Leu Arg Gln Lys Asn Ile Thr Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn
725 730 735

Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Val Ala Asn Ala Leu
740 745 750

Ser Gly Asp Ile Trp Asn Ile Asp Asn Glu Phe
755 760

<210> 4
<211> 111
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 4
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Ala Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
100 105 110

<210> 5
<211> 111
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 5
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Gly Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 6
<211> 111
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело

<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 6
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Gly Pro Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 7
<211> 119
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 7
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15

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

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 119
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 8
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 119
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 9
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15

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

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 119
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 10
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15

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

Gly Met His Trp Val Lys Gln Ser His Thr Lys Ser Leu Gln Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Leu Ser Gly Asn Phe Val Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>

<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 12
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 12
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 13
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Met Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 14
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 14
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ala Val Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 15
<211> 116
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 15
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 116
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 16
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 116
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 17
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 116
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 18
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Thr Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 19
Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Thr Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro

65 70 75 80

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

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

<210> 20
<211> 122
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 20
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Ser Glu
20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Tyr Gly Asn Pro Ala Thr Arg Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 111
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 21
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Arg Gln Ser Val Ser Thr Ser

20 25 30

Ser Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Arg Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Ile Gln Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Ile Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 22
<211> 111
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 22
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Ser Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Ile Gln Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Ile Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 23
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний

поліпептид"

<400> 23
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Thr Ser Ser Ser Val Pro Ser Ser
20 25 30

Tyr Phe His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 24
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 24
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

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

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

<210> 25
<211> 120
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 25
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 26
<211> 120
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 26
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 27
<211> 124
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 27
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Ser Ile Ser Asn Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr 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 Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Gly Ala Leu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Arg Gly Ala Met Asp
100 105 110

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

<210> 28
<211> 121
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 28

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 29
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 29
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 30
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 30
Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний

пептид"

<400> 31
Gln Gln Ser Asn Glu Ala Pro Pro Thr
1 5

<210> 32
<211> 5
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 32
Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 33
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 33
Gly Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 34
<211> 10
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 34
Gly Leu Ser Gly Asn Tyr Val Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 35
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 36
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 36
Gln Gln Ser Asn Glu Gly Pro Pro Thr
1 5

<210> 37
<211> 5
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 37
Asp Tyr Gly Met His
1 5

<210> 38
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 38
Val Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 39
<211> 10
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 39
Gly Leu Ser Gly Asn Tyr Val Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 40
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 40
Val Ile Ser Phe Tyr Ser Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Met
1 5 10 15

Gly

<210> 41
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 41
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 42
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 42
Gln His Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr
1 5

<210> 43
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 43
Val Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Lys Thr Asn Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 44
<211> 10
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело

<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 44
Gly Leu Ser Gly Asn Phe Val Met Asp Phe
1 5 10

<210> 45
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (8)..(8)
<223> /замінити="Asp"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (11)..(11)
<223> /замінити="Pro"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності,
які не мають переваг відносно залишків в анотаціях
положень варіантів

<400> 45
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 46
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (2)..(2)
<223> /замінити="His"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (6)..(6)
<223> /замінити="Gly" или "Asp"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(9)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності,
які не мають переваг відносно залишків в анотаціях
положень варіантів

<400> 46
Gln Gln Ser Asn Glu Ala Pro Pro Thr
1 5

<210> 47
<211> 5
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (3)..(3)
<223> /замінити="Gly"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(5)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності, які не мають переваг відносно залишків в анотаціях положень варіантів

<400> 47
Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 48
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (1)..(1)
<223> /замінити="Val"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (4)..(4)
<223> /замінити="Phe" или "Pro"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (6)..(6)
<223> /замінити="Ser"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (8)..(8)
<223> /замінити="Lys"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (12)..(12)
<223> /замінити="Ser"

<220>

<221> ВАРІАНТ
<222> (14)..(14)
<223> /замінити="Asn"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (16)..(16)
<223> /замінити="Met"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(17)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності, які не мають переваг відносно залишків в анотаціях положень варіантів

<400> 48
Gly Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 49
<211> 10
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (6)..(6)
<223> /замінити="Phe"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (8)..(8)
<223> /замінити="Val"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (10)..(10)
<223> /замінити="Phe"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(10)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності, які не мають переваг відносно залишків в анотаціях положень варіантів

<400> 49
Gly Leu Ser Gly Asn Tyr Val Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 50
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело

<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 50
Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 51
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 51
Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 52
Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 53
<211> 5
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 53
Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 54
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 54
Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 55
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 55
Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr
1 5

<210> 56
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 56
Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 57
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 57
Ala Ala Thr Asp Leu Ala Asp
1 5

<210> 58
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 58
Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 59
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 59
Gly Thr Arg Ala Tyr His Phe
1 5

<210> 60
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 60
Arg Ala Ser Asp Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 61
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 61
Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 62
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 62
Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu Met
1 5

<210> 63
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 63
Glu Ile Asn Pro Ile Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ser Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Lys

<210> 64
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 64
Ala Val Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 65
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 65
Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Thr Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 66
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (4)..(4)
<223> /замінити="Asp"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (6)..(6)
<223> /замінити="Ile"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(11)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності,
які не мають переваг відносно залишків в анотаціях
положень варіантів

<400> 66
Arg Ala Ser Glu Asn Leu Tyr Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 67
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (1)..(1)
<223> /замінити="Ala"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (2)..(2)
<223> /замінити="Val"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (4)..(4)
<223> /замінити="Asp"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(7)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності, які не мають переваг відносно залишків в анотаціях положень варіантів

<400> 67
Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (9)..(9)
<223> /замінити="Met"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(9)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності, які не мають переваг відносно залишків в анотаціях положень варіантів

<400> 68
Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 69
<211> 17

<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (5)..(5)
<223> /замінити="Ile" або "Ser"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (12)..(12)
<223> /замінити="Asn" або "Ser"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (14)..(14)
<223> /замінити="Asn" або "Thr"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (17)..(17)
<223> /замінити="Lys"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(17)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності,
які не мають переваг відносно залишків в анотаціях
положень варіантів"

<400> 69
Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 70
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (7)..(7)
<223> /замінити="Phe"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(7)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності,
які не мають переваг відносно залишків в анотаціях
положень варіантів"

<400> 70
Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr

1 5

<210> 71
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 71
Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 72
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 72
Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 73
Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 74
<211> 6
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 74
Ser Glu Tyr Ala Trp Asn
1 5

<210> 75
<211> 16
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело

<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 75
Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 76
<211> 13
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 76
Tyr Gly Tyr Gly Asn Pro Ala Thr Arg Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 77
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 77
Arg Ala Arg Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 78
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 78
Tyr Ala Ser Ile Gln Glu Ser
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 79
Gln His Thr Trp Glu Ile Pro Phe Thr
1 5

<210> 80
<211> 5

<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 80
Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 81
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 81
Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asp Glu Arg Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 82
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 82
Gly Gly Tyr Asp Ser Arg Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 83
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 83
Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asp Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 84
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 84
Gly Gly Tyr Asp Ser Arg Ala Trp Phe Ala His
1 5 10

<210> 85
<211> 12
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 85
Thr Thr Ser Ser Ser Val Pro Ser Ser Tyr Phe His
1 5 10

<210> 86
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 86
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 87
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 87
His Gln Tyr His Arg Ser Pro Phe Thr
1 5

<210> 88
<211> 5
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 88
Asp Tyr Tyr Met Tyr
1 5

<210> 89
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 89
Ser Ile Ser Asn Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 90
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 90
Gln Gly Ala Leu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Arg Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 91
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 91
Arg Ala Gly Gln Asp Ile Thr Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 92
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 92
Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 93
Gln Gln Ala Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 94
<211> 5
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 94
Asn Tyr Trp Ile Glu
1 5

<210> 95
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 95
Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 96
<211> 12
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 96
Arg Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 97
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (1)..(1)
<223> /замінити="Thr"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (2)..(2)
<223> /замінити="Thr"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (3)..(3)
<223> /замінити="Ser" або "Gly"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (4)..(4)
<223> /замінити="Ser"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (5)..(8)
<223> /замінити=" "

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (9)..(9)
<223> /замінити="Val" або "Asp"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (10)..(10)
<223> /замінити="Pro" або "Ile"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (11)..(11)
<223> /замінити="Ser" або "Thr"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (12)..(12)
<223> /замінити="Asn"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (13)..(13)
<223> /замінити="Tyr"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (14)..(14)
<223> /замінити="Phe" або "Leu"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (15)..(15)
<223> /замінити="Asn"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності, які не мають переваг відносно залишків в анотаціях положень варіантів"

<400> 97
Arg Ala Arg Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 98
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (1)..(1)
<223> /замінити="Ser"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (2)..(2)
<223> /замінити="Thr"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (4)..(4)
<223> /замінити="Asn" або "Arg"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (5)..(5)
<223> /замінити="Leu"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (6)..(6)
<223> /замінити="Ala" або "His"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(7)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності, які не мають переваг відносно залишків в анотаціях положень варіантів"

<400> 98
Tyr Ala Ser Ile Gln Glu Ser
1 5

<210> 99
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (1)..(1)
<223> /замінити="His"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (2)..(2)
<223> /замінити="Gln"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (3)..(3)
<223> /замінити="Tyr" або "Ala"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (4)..(4)
<223> /замінити="His" або "Asn"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (5)..(5)
<223> /замінити="Arg" або "Thr"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (6)..(6)
<223> /замінити="Ser" або "Leu"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (8)..(8)
<223> /замінити="Tyr"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(9)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності, які не мають переваг відносно залишків в анотаціях положень варіантів"

<400> 99
Gln His Thr Trp Glu Ile Pro Phe Thr
1 5

<210> 100
<211> 5
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (1)..(1)
<223> /замінити="Asp" або "Asn"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (3)..(3)
<223> /замінити="Tyr"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (4)..(4)
<223> /замінити="Ile"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (5)..(5)
<223> /замінити="Tyr" або "Glu"

<220>

<221> misc_feature
<222> (1)..(5)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності, які не мають переваг відносно залишків в анотаціях положень варіантів"

<400> 100
Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 101
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (1)..(1)
<223> /замінити="Ser" або "Glu"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (3)..(3)
<223> /замінити="Ser" або "Leu"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (4)..(4)
<223> /замінити="Asn"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (6)..(6)
<223> /замінити="Gly"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (7)..(7)
<223> /замінити="Asp"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (8)..(8)
<223> /замінити="Asn"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (10)..(10)
<223> /замінити="Tyr"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (12)..(12)
<223> /замінити="Pro" або "Asn"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (13)..(13)
<223> /замінити="Asp"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (14)..(14)

<223> /замінити="Lys" або "Thr"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (15)..(15)
<223> /замінити="Val"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (17)..(17)
<223> /замінити="Gly"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(17)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності, які не мають переваг відносно залишків в анотаціях положень варіантів"

<400> 101
Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asp Glu Arg Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 102
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (1)..(1)
<223> /замінити="Gln" або "Arg"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (3)..(3)
<223> /замінити="Ala" або "Gly"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (4)..(4)
<223> /замінити="Leu" або "Tyr"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (5)..(5)
<223> /замінити="Tyr" або "Gly"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (6)..(6)
<223> /замінити="Asp" або "Tyr"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (7)..(7)
<223> /замінити="Gly" або "Asp"

<220>

<221> ВАРІАНТ
<222> (8)..(8)
<223> /замінити="Tyr" або "Gly"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (9)..(9)
<223> /замінити="Tyr" або "Glu"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (10)..(10)
<223> /замінити="Phe" або " "

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (11)..(13)
<223> /замінити=" "

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (14)..(14)
<223> /замінити="Asp"

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (15)..(15)
<223> /замінити="His"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> /примітка: залишки варіантів, наведені в послідовності, які не мають переваг відносно залишків в анотаціях положень варіантів"

<400> 102
Gly Gly Tyr Asp Ser Arg Ala Trp Phe Arg Gly Ala Met Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 103
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 103
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 Ser
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Glu 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 Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 104
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> Mus musculus

<400> 104
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 105
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 105
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 Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp 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 His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 106
<211> 112
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 106
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 107
<211> 116
<212> БІЛОК
<213> Mus musculus

<400> 107
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 108
<211> 116
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 108
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 109
<211> 113
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 109
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 110
<211> 111
<212> БІЛОК
<213> Mus musculus

<400> 110
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Gly Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 111
<211> 111
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 111
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Ala Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 112
<211> 112
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 112
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 113
<211> 119
<212> БІЛОК
<213> Mus musculus

<400> 113
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15

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

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 114
<211> 119
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 114
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 115

<211> 113
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 115
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 116
<211> 111
<212> БІЛОК
<213> Mus musculus

<400> 116
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Ser Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Arg Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Ile Gln Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Ile Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 117
<211> 111
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 117
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Arg Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Ser Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Pro Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Ile Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 118
<211> 112
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 118
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 119
<211> 120
<212> БІЛОК
<213> Mus musculus

<400> 119
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 120
<211> 120
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 120
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 121
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 121
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ala Ala Ser Thr 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 Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 122
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> Mus musculus

<400> 122
Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Thr Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 123
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 123
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp 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 Glu Tyr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 124
<211> 111
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 124
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Arg Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 125
<211> 122
<212> БІЛОК
<213> Mus musculus

<400> 125
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Ser Glu
20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Tyr Gly Asn Pro Ala Thr Arg Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 126
<211> 122
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 126
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Ser Glu

20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Gly Tyr Gly Asn Pro Ala Thr Arg Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

<210> 127
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 127
Gln Gln Ser Asn Glu Ala Pro Pro Thr
1 5

<210> 128
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 128
Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 129
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 129
Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 130
Gln Gln Ser Asn Glu Ala Pro Pro Thr
1 5

<210> 131
<211> 10
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 131
Gly Leu Ser Gly Asn Tyr Val Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 132
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<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 Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

<210> 133
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 133
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 Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

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

<210> 134
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 134
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 Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Gly Tyr Asn Asp Pro Pro
85 90 95

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

<210> 135
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 135
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 Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Ser Ser Thr Asp Pro Thr
85 90 95

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

<210> 136
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 136
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 Val Val Ala Asn Ser
20 25 30

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

Tyr Leu Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Asp Ala Thr Ser Pro Pro
85 90 95

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

<210> 137
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Ala Thr Asp Pro Pro
85 90 95

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

<210> 138
<211> 119
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 138
Glu Val Gln Leu Val 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 Gly Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 139
<211> 119
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 139
Glu Val Gln Leu Val 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 Leu Gly Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 140
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 140
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 Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr 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 Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

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

<210> 141
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 141
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 Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

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

Ser Trp Ala Ser Trp Leu Tyr 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 Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

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

<210> 142
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 142
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 Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

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

Trp Tyr Ala Ser Trp Leu Tyr 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 Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

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

<210> 143
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 143
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 Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

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

Trp Trp Ala Ser Ser Leu Tyr 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 Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

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

<210> 144
<211> 126
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 144
Glu Val Gln Leu Val 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 Asn Phe Tyr Tyr Ser
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala
100 105 110

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 145
<211> 438
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 145
Glu Val Gln Leu Val 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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
115 120 125

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
180 185 190

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
210 215 220

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
305 310 315 320

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395 400

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435

<210> 146
<211> 219
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 146
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 147
<211> 10
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 147
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 148
<211> 10
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 148
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Met His
1 5 10

<210> 149
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
пептид"

<400> 149
Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 150
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 150
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 Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp 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 His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 151
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 151
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 Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp 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 His Phe Ala Gly Thr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 152
<211> 116
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 152
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 153
<211> 116
<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 153
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 154
<211> 116
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 154
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 155
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 155
Gln His Phe Ala Gly Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 156
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 156
Glu Ile Ala Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 157
<211> 17
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 157
Glu Ile Asn Pro Ala Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 158
<211> 214
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 158
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 Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp 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 His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 159
<211> 446
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело

<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 159

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

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

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

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

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

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 160
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 160
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 Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp 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 His Phe Ala Gly Thr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 161
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 161
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asp Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 162
<211> 15
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний пептид"

<400> 162
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Pro Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 163
<211> 112
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 163
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

<210> 164
<211> 125
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 164
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

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

<210> 165
<211> 113
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 165
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Ile Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro

<210> 166
<211> 125
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 166
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr

115 120 125

<210> 167
<211> 113
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 167
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Met Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro

<210> 168
<211> 125
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 168
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ile Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ser Glu Lys Phe

50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

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

<210> 169
<211> 119
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 169
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Thr Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
115

<210> 170
<211> 113
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний

поліпептид"

<400> 170
Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Thr Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro

<210> 171
<211> 131
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 171
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Ser Glu
20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Tyr Gly Asn Pro Ala Thr Arg Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

Ser Val Tyr
130

<210> 172
<211> 123
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 172
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr
115 120

<210> 173
<211> 123
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 173
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr
115 120

<210> 174
<211> 127
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 174
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Ser Ile Ser Asn Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr 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 Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Gly Ala Leu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Arg Gly Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
115 120 125

<210> 175
<211> 124
<212> БІЛОК
<213> штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> примітка: опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 175
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

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

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Ізольоване антитіло, яке зв'язується з рецептором трансферину людини (TfR) і TfR приматів, де антитіло не інгібує зв'язування трансферину з TfR, де антитіло включає HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, які відповідно включають послідовності амінокислот SEQ ID NO: 53, 156 та 55; і включає HVR-L1, HVR-L2 та HVR-L3, які відповідно включають послідовності амінокислот SEQ ID NO: 50, 51 та 52.

2. Ізольоване антитіло, яке зв'язується з TfR людини і TfR приматів, де антитіло не інгібує зв'язування трансферину з TfR, і де одна або кілька властивостей антитіла модифікуються для зменшення або усунення впливу антитіла на ретикулоцити і/або зменшення тяжкості або присутності гострих клінічних симптомів у суб'єкта або ссавця, яких лікують за допомогою антитіла, де одна або більше властивостей вибрані з: ефекторної функції Fc-області антитіла та функції активування комплементу антитіла, і де ефекторна функція або функція активації комплемента зменшується або усувається відносно антитіла дикого типу того ж самого ізотипу, і де антитіло включає HVR-H1, HVR-H2 та HVR-H3, які відповідно включають послідовності амінокислот SEQ ID NO: 53, 156 та 55; і включає HVR-L1, HVR-L2 та HVR-L3, які відповідно включають послідовності амінокислот SEQ ID NO: 50, 51 і 52.

3. Антитіло за п. 1 або 2, яке являє собою моноклональне антитіло.

4. Антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, яке являє собою антитіло людини, гуманізоване антитіло або химерне антитіло.

5. Антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, яке являє собою фрагмент антитіла, що зв'язує TfR людини і TfR приматів.

6. Антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, де антитіло містить:

a) VH послідовність, що має щонайменше 95 % ідентичність послідовності з послідовністю амінокислот SEQ ID NO: 153; або

b) VL послідовність, що має щонайменше 95 % ідентичність послідовності з послідовністю амінокислот SEQ ID NO: 105; або

c) VH послідовність як у (a) і VL послідовність як у (b).

7. Антитіло, яке містить VH послідовність SEQ ID NO: 153 і VL послідовність SEQ ID NO: 105, де антитіло зв'язується з TfR людини і TfR приматів.

8. Антитіло за п. 2, де ефекторна функція зменшується або усувається за допомогою способу, вибраного зі зменшення глікозилування антитіла, модифікації ізотипу антитіла до ізотипу, який природним способом має зменшену або усунуту ефекторну функцію, і модифікації Fc-області.

9. Антитіло за п. 8, де глікозилування антитіла зменшується за допомогою способу, вибраного із: продукування антитіла в навколишньому середовищі, яке не дає можливості для глікозилування дикого типу; видалення вуглеводних груп, що вже є присутніми на антитілі; і модифікації антитіла таким чином, що не виникає глікозилування дикого типу.

10. Антитіло за п. 9, де антитіло виробляється у системі виробництва клітин не-ссавців, або де антитіло виробляється синтетично.

11. Антитіло за п. 9, де Fc-область антитіла містить мутацію в положенні 297 так, що аспарагіновий залишок дикого типу в цьому положенні замінюється іншою амінокислотою, яка негативно впливає на глікозилування в цьому положенні.

12. Антитіло за п. 8, де ефекторна функція зменшується або усувається за допомогою щонайменше однієї модифікації Fc-області.

13. Антитіло за п. 12, де ефекторна функція зменшується або усувається за допомогою делеції всієї Fc-області або її частини, або шляхом одержання за допомогою генної інженерії антитіла так, що воно не містить Fc-область або містить Fc-область, не компетентну відносно ефекторної функції або функції активування комплементу.

14. Антитіло за п. 12, де модифікація вибирається із: точкової мутації Fc-області для ослаблення зв'язування з одним або декількома рецепторами Fc, вибраної з наступних положень: 234, 235, 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 і 439; точкової мутації Fc-області для ослаблення зв'язування з C1q,

вибраної з наступних положень: 270, 322, 329 і 321; усунення деякої частини або всієї Fc-області і точкової мутації в положенні 132 домену CH1.

15. Антитіло за п. 14, де модифікація являє собою щонайменше одну точкову мутацію Fc-області для зменшення зв’язування з одним або більше рецепторами Fc, де щонайменше одна точкова мутація знаходиться в положенні, вибраному з 234, 235, 265, 297 і 329.

16. Антитіло за п. 15, де модифікація знаходиться в положенні 297 або в положеннях 265 і 297.

17. Антитіло за п. 15, де модифікація знаходиться в положеннях 234, 235 і 329.

18. Антитіло за п. 16, де модифікація являє собою N297G; D265A і N297A або D265A і N297G; або L234A, L235A і P329G.

19. Антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, де час півжиття антитіла збільшується за допомогою модифікації в домені зв'язування FcRn антитіла в положенні, вибраному з: 252, 254, 256, 434 і 436.

20. Антитіло за п. 19, де модифікація знаходиться в положеннях 252, 254 і 256.

21. Антитіло за п. 19, де модифікація знаходиться в положеннях 434 і 436.

22. Антитіло за п. 20, де модифікація являє собою M252Y, S254T і T256E, або N434A і Y436I.

23. Антитіло за п. 21, де модифікація являє собою N434A і Y436I.

24. Антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, де антитіло зв'язане з терапевтичною сполукою.

25. Антитіло за п. 24, де антитіло являє собою мультиспецифічне антитіло, і терапевтична сполука необов'язкова утворює частину мультиспецифічного антитіла.

26. Антитіло за п. 25, де мультиспецифічне антитіло містить перший сайт зв'язування антигену, що зв'язує TfR, і другий сайт зв'язування антигену, що зв'язує антиген головного мозку.

27. Антитіло за п. 26, де антиген головного мозку вибирають із групи, яка складається з: бета-секретази 1 (BACE1), Abeta, рецептора епідермального фактора росту (EGFR), рецептора епідермального фактора росту людини 2 (HER2), тау, аполіпопротеїну E (ApoE), альфа-синуклеїну, CD20, хантингтину, пріонного білка (PrP), збагаченої лейциновими повторами кінази 2 (LRRK2), паркіну, презеніліну 1, презеніліну 2, гамма-секретази, рецептора загибелі 6 (DR6), білка-попередника амілоїду (APP), рецептора p75 нейротрофіну (p75NTR) і каспази 6.

28. Антитіло за п. 27, де мультиспецифічне антитіло зв'язується як з TfR, так і з BACE1, або де мультиспецифічне антитіло зв'язується як з TfR, так і з Abeta.

29. Антитіло за п. 24, де терапевтична сполука являє собою лікарський засіб проти неврологічного розладу.

30. Ізольована нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло за будь-яким із пп. 1-29.

31. Клітина-хазяїн, яка містить нуклеїнову кислоту за п. 30.

32. Спосіб продукування антитіла, який включає культивування клітин-хазяїнів за п. 31 таким чином, що продукується антитіло, і який необов'язково додатково включає виділення антитіла з клітини-хазяїна.

33. Застосування фармацевтичного препарату, що містить антитіло за будь-яким із пп. 1-29 і фармацевтично прийнятного носія як лікарського препарату.

34. Застосування антитіла за будь-яким із пп. 1-29 як лікарського препарату.

35. Застосування антитіла за будь-яким із пп. 1-29 для лікування неврологічного розладу.

36. Застосування за п. 35, де неврологічний розлад вибирають із групи, яка складається з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, розладу очного захворювання, епілептичного розладу, лізосомної хвороби нагромадження, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, розладу поведінки і запалення ЦНС.

37. Застосування антитіла за будь-яким із пп. 1-29 при перенесенні однієї або декількох сполук через непроникний гематопоетичний бар’єр - BBB.

38. Спосіб перенесення сполук через BBB суб'єкта, який включає вплив антитіла за будь-яким із пп. 24-29 на BBB, так що антитіло переносить сполуку, зв'язану з ним, через BBB.

39. Спосіб збільшення впливу ЦНС суб'єкта до сполуки, який включає вплив антитіла за будь-яким із пп. 24-29 на BBB, так що антитіло переносить сполуку, зв’язану з ним, через BBB.

40. Спосіб збільшення утримання в ЦНС сполуки, що вводиться суб'єкту, який включає вплив антитіла за будь-яким із пп. 24-29 на BBB таким чином, що утримання в ЦНС сполуки збільшується.

41. Спосіб лікування неврологічного розладу в ссавця, який включає лікування ссавця за допомогою антитіла за будь-яким із пп. 24-29.

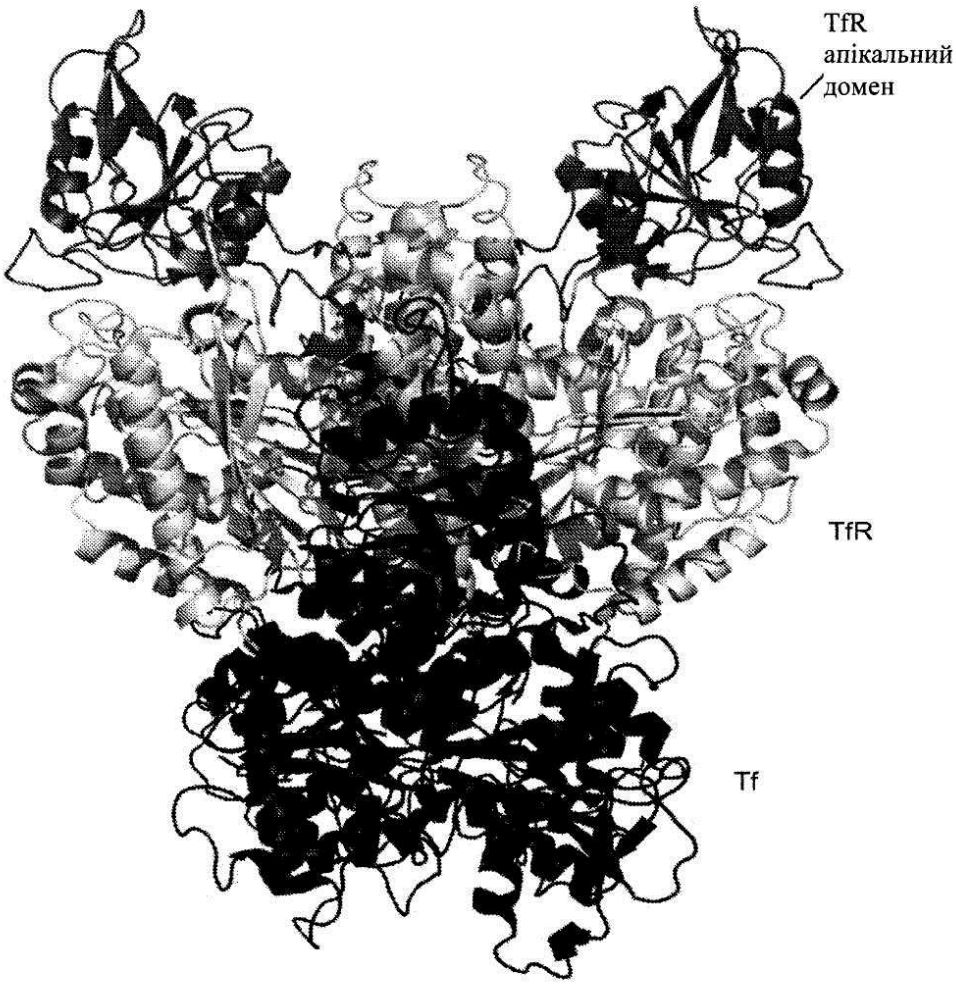
42. Спосіб за п. 41, у якому неврологічний розлад вибирають із групи, яка складається з невропатичного розладу, нейродегенеративного захворювання, раку, розладу очного захворювання, епілептичного розладу, лізосомної хвороби нагромадження, амілоїдозу, вірусного або мікробного захворювання, ішемії, розладу поведінки і запалення ЦНС.

43. Спосіб за будь-яким одним із пп. 38-42, у якому BBB або неврологічний розлад стосується суб'єкта-людини, і у якому величина дози і/або частота введення модулюється для зменшення концентрації антитіла, яке піддається впливу еритроцитів.

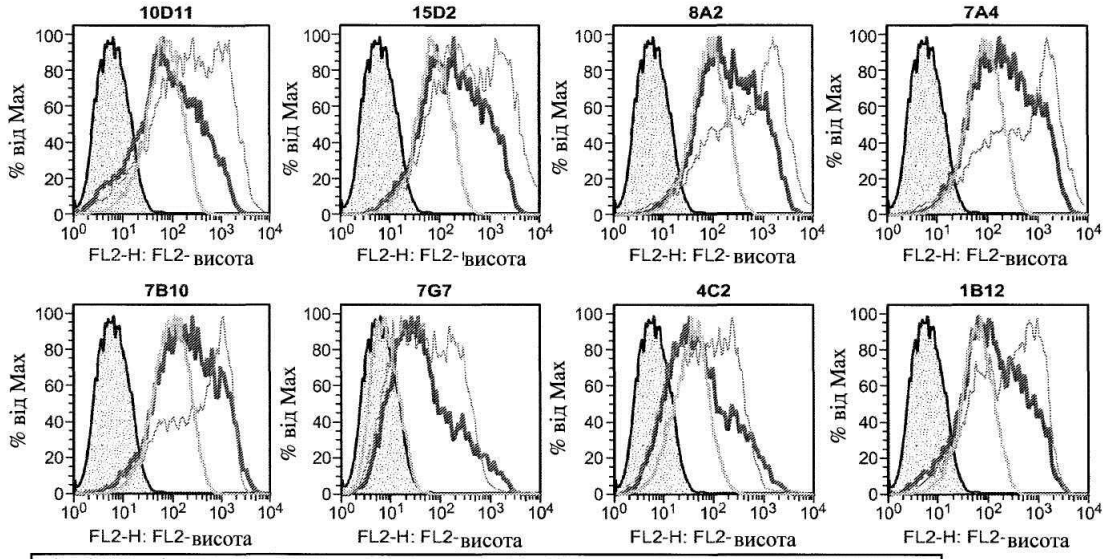
44. Спосіб за п. 43, який додатково включає стадію моніторингу суб'єкта відносно збідніння еритроцитів.

45. Спосіб за п. 43, у якому антитіло вводиться в терапевтичній дозі, у якому терапевтична доза є TfR-насичувальною.

46. Спосіб за п. 43, у якому введення антитіла здійснюється в дозі і/або при частоті дози, каліброваної для зведення до мінімуму гострих клінічних симптомів від введення антитіла.

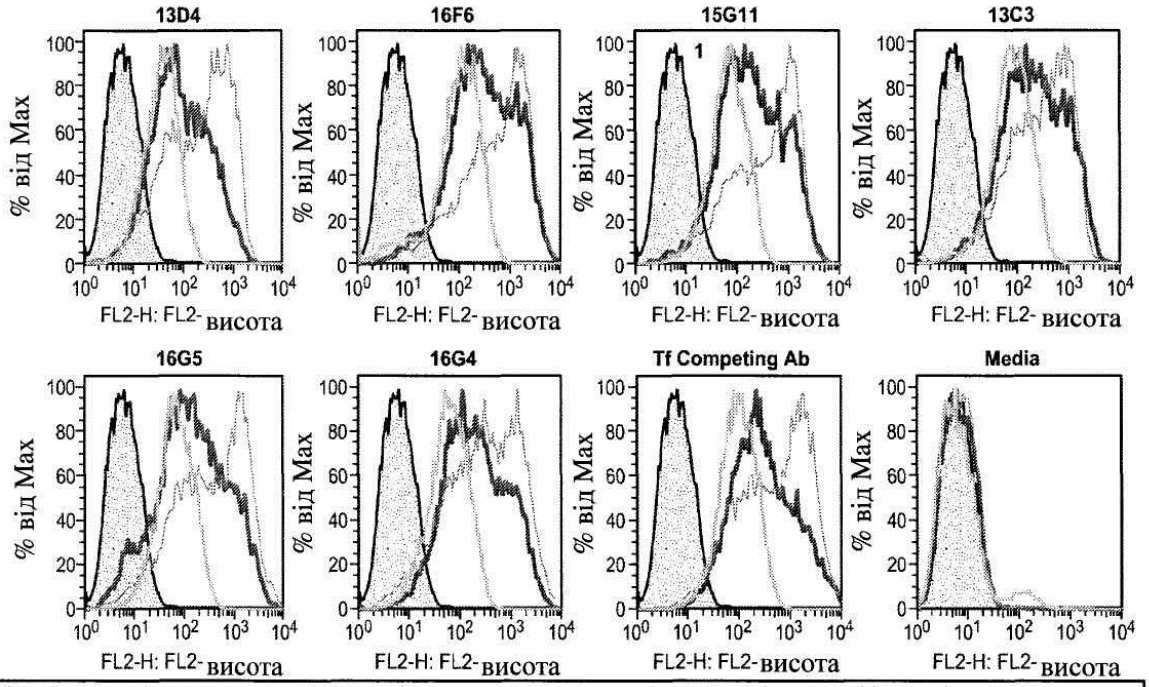


Фіг. 1



зафарбована (сірим чорна крива) = 2nd Ab-PE (темно-сіра) = cyTfR трансфіковані 293
(темно-сіра) = huTfR трансфіковані 293 (середньо-сіра) = 293

Фіг. 2А



зафарбована (сірим чорна крива) = 2nd Ab-PE (темно-сіра) = cyTfR трансфіковані 293
(темно-сіра) = huTfR трансфіковані 293 (середньо-сіра) = 293

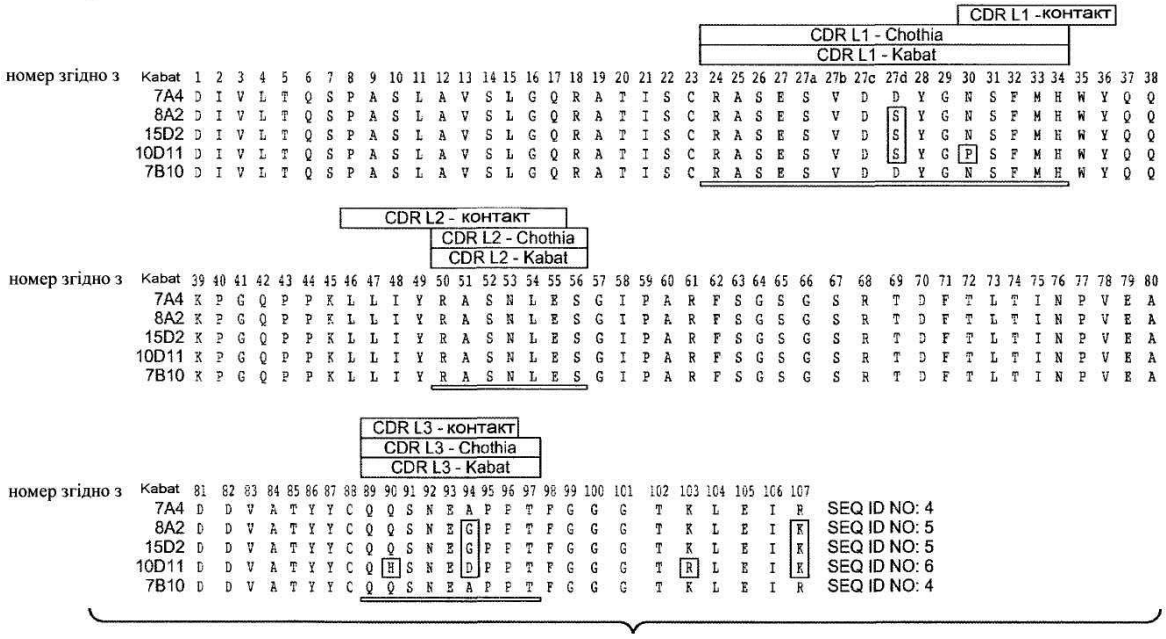
Фіг. 2В

характеризація перехресно-реактивних гібридом анти-TfR людини і мавп циномолгус, які не конкурують з Tf за зв'язування з TfR

		конкурує з агентом зв'язування з апікальним доменом	huTfR ELISA зв'язування	Cyno TfR ELISA зв'язування	Biacore гібридоми або химерних IgG						
					huTfR			CynoTfR			Cy/hu KD відношення
					Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
Клас I	**7A4**	+++	+++	+++	2.11E+06	4.34E-04	2.06E-10	1.06E+06	6.63E-04	6.27E-10	3.04
	8A2	+++	+++	+++	1.22E+06	2.17E-04	1.79E-10	7.91E+05	7.15E-04	9.04E-10	5.06
	7A4 HC/8A2 LC	+++	+++	+++	3.01E+06	3.35E-04	1.12E-10	1.32E+06	1.22E-03	9.25E-10	8.29
	1502	+++	+++	+++							
	10D11	+++	+++	+++	1.66E+05	3.44E-04	2.08E-09	6.46E+04	5.81E-03	8.99E-08	43.32
	7B10	+++	+++	+++							
Клас II	**15G11**	+++	+++	+++	8.90E+05	8.83E-04	9.92E-10	1.29E+06	3.35E-03	2.60E-09	2.62
	13C3	+++	+++	+++							
	16G5	+++	+++	+++							
	16G4	+++	+++	+++	4.77E+05	1.62E-03	3.40E-09	2.33E+05	5.23E-03	2.24E-08	6.59
Клас III	**16F6**	+++	+++	+++	1.36E+05	2.81E-04	2.07E-09	1.23E+05	9.13E-04	7.45E-09	3.6
Клас IV	**7G7**	-	+++	+++	1.33E+05	6.08E-03	4.57E-08	4.63E+04	1.21E-02	2.62E-07	5.73E
	4C2	-	+++	+++							
	1B12	-	+++	++	1.36E+05	2.76E-04	2.03E-09	1.34E+05	5.80E-03	4.34E-08	21.35
	13D4	-	+++	++	9.99E+04	9.49E-04	9.50E-09	7.06E+04	5.98E-04	8.47E-09	0.89

Фіг. 2C

варіабельна область легкого ланцюга



Фіг. 3A-1

варіабельна область важкого ланцюга

CDR H1 - контакт
CDR H1 - Chothia
CDR H1 - Kabat

номер згідно з

Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	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
7A4	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	R	P	G	V	S	V	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	T	F	T	D	Y	A	M	E	W	V	K	Q	S	H	A
8A2	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	R	P	G	V	S	V	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	T	F	T	D	Y	G	M	E	W	V	K	Q	S	H	A
15D2	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	R	P	G	V	S	V	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	T	V	T	D	Y	A	M	E	W	V	K	Q	S	H	A
10D11	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	R	P	G	V	A	V	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	K	F	I	D	Y	G	M	E	W	V	K	Q	S	H	T
7B10	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	R	P	G	V	S	V	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	T	F	T	D	Y	A	M	E	W	V	K	Q	S	H	A

CDR H2 - контакт
CDR H2 - Chothia
CDR H2 - Kabat

номер згідно з

Kabat	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
7A4	K	S	L	E	W	I	G	G	I	S	T	Y	F	G	R	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	R	A	T	M	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	A
8A2	K	S	L	E	W	I	G	V	I	S	F	Y	S	G	R	T	N	Y	N	Q	N	F	K	G	K	A	T	M	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	L	E	L	A
15D2	K	S	L	E	W	I	G	V	I	S	F	Y	S	G	K	T	N	Y	N	Q	K	F	M	G	K	A	T	M	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	A
10D11	K	S	L	Q	W	I	G	V	I	S	F	Y	S	G	K	T	N	Y	S	Q	K	F	K	G	K	A	T	M	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	A
7B10	K	S	L	E	W	I	G	G	I	S	T	Y	F	G	R	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	R	A	T	M	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	A

CDR H3 - контакт
CDR H3 - Chothia
CDR H3 - Kabat

номер згідно з

Kabat	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	
7A4	R	L	T	S	E	D	S	A	L	Y	Y	C	A	R	G	L	S	G	N	Y	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 7
8A2	R	L	T	S	E	D	S	A	I	Y	Y	C	A	R	G	L	S	G	N	Y	V	V	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 8
15D2	R	L	T	S	E	D	S	A	I	Y	Y	C	A	R	G	L	S	G	N	Y	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 9
10D11	R	L	T	S	E	D	S	A	I	Y	Y	C	A	R	G	L	S	G	N	F	V	M	D	F	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 10
7B10	R	L	T	S	E	D	S	A	L	Y	Y	C	A	R	G	L	S	G	N	Y	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 7

Фіг. 3А-2

варіабельна область легкого ланцюга

CDR L1 - контакт
CDR L1 - Chothia
CDR L1 - Kabat

номер згідно з

Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	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
15G11	D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	S	L	S	V	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	L	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	Q	G	K
16G5	D	I	Q	L	T	Q	T	P	A	S	L	S	V	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	E	N	I	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	Q	G	K
13G3	D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	S	L	S	V	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	I	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	Q	G	K
16G4	D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	S	L	S	V	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	I	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	Q	G	K

CDR L2 - контакт
CDR L2 - Chothia
CDR L2 - Kabat

номер згідно з

Kabat	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
15G11	S	P	Q	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	Q	Y	S	L	K	I	N	S	L	Q	S	E	D	F	G
16G5	S	P	Q	L	L	V	Y	A	A	T	D	L	A	D	G	V	P	S	R	F	R	G	S	G	S	G	T	Q	Y	S	L	K	I	N	S	L	Q	S	E	D	F	G
13G3	S	P	Q	L	L	V	Y	A	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	Q	Y	S	L	K	I	N	S	L	Q	S	E	D	F	G
16G4	S	P	Q	L	L	V	Y	A	V	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	Q	Y	S	L	K	I	N	S	L	Q	S	E	D	F	G

CDR L3 - контакт
CDR L3 - Chothia
CDR L3 - Kabat

номер згідно з

Kabat	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	
15G11	T	Y	Y	C	Q	H	F	W	G	T	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K	SEQ ID NO: 11
16G5	S	Y	Y	C	Q	H	F	W	G	T	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	I	SEQ ID NO: 12
13G3	S	Y	Y	C	Q	H	F	W	G	T	P	L	M	F	G	S	G	T	K	L	E	L	K	SEQ ID NO: 13
16G4	S	Y	Y	C	Q	H	F	W	G	T	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K	SEQ ID NO: 14

Фіг. 3В-1

варіабельна область важкого ланцюга

CDR H1 -контакт
CDR H1 - Chothia
CDR H1 - Kabat

номер згідно з

Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	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
15G11	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	E	W	V	K	Q	R	P	G
16G5	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	R	P	G	A	A	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	E	W	V	K	Q	R	P	G
13G3	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	A	S	Y	W	M	E	W	V	K	Q	R	P	G
16G4	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	E	W	V	K	Q	R	P	G

CDR H2 - контакт
CDR H2 - Chothia
CDR H2 - Kabat

номер згідно з

Kabat	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
15G11	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	N	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S
16G5	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	N	P	T	N	G	R	T	N	Y	N	E	N	F	K	S	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S
13G3	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	N	P	I	N	G	R	T	N	Y	S	E	K	F	K	K	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S
16G4	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	N	P	S	N	G	R	T	N	Y	N	E	T	F	K	S	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S

CDR H3 - контакт
CDR H3 - Chothia
CDR H3 - Kabat

номер згідно з

Kabat	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	
15G11	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 15
16G5	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	F	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 16
13G3	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 17
16G4	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 18

Фіг. 3B-2

варіабельна область легкого ланцюга

CDR L1 - контакт
CDR L1 - Chothia
CDR L1 - Kabat

номер згідно з

Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	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
16F6	D	V	Q	I	T	Q	S	P	S	Y	L	T	A	S	P	G	E	T	I	T	I	N	C	R	A	S	K	S	I	S	K	Y	L	A	W	Y	Q	E	K	P	G	K

CDR L2 - контакт
CDR L2 - Chothia
CDR L2 - Kabat

номер згідно з

Kabat	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
16F6	T	N	K	L	L	I	Y	S	G	S	T	L	Q	S	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	N	L	E	P	E	D	F	A

CDR L3 - контакт
CDR L3 - Chothia
CDR L3 - Kabat

номер згідно з

Kabat	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	
16F6	M	Y	Y	C	Q	Q	H	N	E	Y	P	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	SEQ ID NO: 19

Фіг. 3C-1

варіабельна область важкого ланцюга

CDR H1 - контакт
CDR H1 - Chothia
CDR H1 - Kabat

номер згідно з	Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	35a	36	37	38	39	40	41
	16F6	D	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	S	L	S	L	T	C	T	V	T	G	N	S	I	T	S	E	Y	A	W	N	W	I	R	Q	F	P

CDR H2 - контакт
CDR H2 - Chothia
CDR H2 - Kabat

номер згідно з	Kabat	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
	16F6	G	N	K	L	E	W	M	G	Y	I	S	Y	S	G	T	T	S	Y	N	P	S	L	K	S	R	I	S	I	T	R	D	T	S	K	N	Q	L	F	L	Q	L	N

CDR H3 - контакт
CDR H3 - Chothia
CDR H3 - Kabat

номер згідно з	Kabat	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	SEQ ID NO:
	16F6	S	V	T	T	E	D	T	A	T	Y	F	C	A	R	Y	G	Y	G	N	P	A	T	R	Y	F	D	V	W	G	A	G	T	T	V	T	V	S	S	20

Фіг. 3C-2

варіабельна область легкого ланцюга

CDR L1 - контакт
CDR L1 - Chothia
CDR L1 - Kabat

номер згідно з	Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
	7G7	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	R	Q	S	V	S	T	S	S	Y	S	F	M	H	W	Y	R	Q
	4C2	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	R	Q	S	V	S	T	S	S	Y	S	F	M	H	W	Y	Q	Q
	1B12	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	L	G	G	R	V	T	M	T	C	T	T	S	S	S	.	.	.	V	P	S	S	Y	F	H	W	Y	Q	Q
	13D4	D	I	Q	M	T	Q	T	T	S	S	L	S	A	S	L	G	D	R	V	T	I	N	C	R	A	G	Q	.	.	.	.	D	I	T	N	Y	L	N	W	F	Q	Q

CDR L2 - контакт
CDR L2 - Chothia
CDR L2 - Kabat

номер згідно з	Kabat	39	40	41	41	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	7G7	K	A	G	Q	P	P	K	L	L	I	K	Y	A	S	I	Q	E	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	L	P	V	E	E
	4C2	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	K	Y	A	S	I	Q	E	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	L	P	V	E	E
	1B12	K	P	G	S	S	P	K	L	W	I	Y	S	T	S	N	L	A	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	M	E	A
	13D4	K	P	D	G	T	V	K	L	L	I	Y	Y	T	S	R	L	H	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	S	L	T	I	T	N	L	E	Q

CDR L3 - контакт
CDR L3 - Chothia
CDR L3 - Kabat

номер згідно з	Kabat	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	
	7G7	E	D	T	A	T	Y	Y	C	Q	H	T	W	E	I	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K	SEQ ID NO: 21
	4C2	E	D	T	A	T	Y	Y	C	Q	H	T	W	E	I	P	F	T	F	G	S	G	T	N	L	E	I	K	SEQ ID NO: 22
	1B12	E	D	A	A	T	Y	Y	C	H	Q	Y	H	R	S	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K	SEQ ID NO: 23
	13D4	E	D	I	A	T	Y	F	C	Q	Q	A	N	T	L	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	SEQ ID NO: 24

Фіг. 3D-1

варіабельна область важкого ланцюга

CDR H1 - контакт
CDR H1 - Chothia
CDR H1 - Kabat

номер згідно з Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	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
7G7	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	S	E	L	V	R	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	E	W	V	K	Q	R	H	G
4C2	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	S	E	L	V	R	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	E	W	V	K	Q	R	H	G
1B12	E	V	K	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	F	L	K	L	S	C	A	T	S	G	F	T	F	S	D	Y	Y	M	Y	W	V	R	Q	T	P	E
13D4	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	M	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	A	G	Y	T	F	S	N	Y	W	I	E	W	V	K	Q	R	P	G

CDR H2 - контакт
CDR H2 - Chothia
CDR H2 - Kabat

номер згідно з Kabat	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
7G7	Q	G	L	E	W	I	G	N	I	Y	P	G	S	G	S	T	K	Y	D	E	R	F	K	S	K	G	T	L	T	V	D	T	S	S	S	T	A	Y	M	H	L	S
4C2	Q	G	L	E	W	I	G	N	I	Y	P	G	S	G	S	T	K	Y	D	E	K	F	K	S	K	G	T	L	T	V	D	T	S	S	S	T	A	Y	M	H	L	S
1B12	K	R	L	E	W	V	A	S	I	S	N	G	G	D	N	T	Y	Y	P	D	T	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S
13D4	H	G	L	E	W	I	G	E	I	L	P	G	S	G	S	T	K	Y	N	E	K	F	K	G	K	A	T	F	T	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	M	Q	L	S

CDR H3 - контакт
CDRH3 - Chothia
CDR H3 - Kabat

номер згідно з Kabat	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	SEQ ID NO:
7G7	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	T	R	G	G	Y	D	S	R	A	W	F	.	.	.	.	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A	25
4C2	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	T	R	G	G	Y	D	S	R	A	W	F	.	.	.	.	A	H	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A	26
1B12	R	L	K	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	Q	G	A	L	Y	D	G	Y	Y	R	G	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	27
13D4	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	R	G	G	Y	G	Y	D	G	E	F	.	.	.	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A	28

Фіг. 3D-2

гуманізація **15G11** з генеруванням **hu15G11.v5**
легкий ланцюг, каппа: антитіло миші, вирівняне по зародкових лініях людини

CDR L1

номер згідно з Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	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
IGKV1-NL1*01	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	G	I	S	N	S	L	A	W	Y
15G11	D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	S	L	S	V	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	D	.	.	.	.	.	.	N	L	Y	S	N	L	A	W	Y
hu15G11.v5	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	.	.	.	.	.	.	N	L	Y	S	N	L	A	W	Y

CDR L2

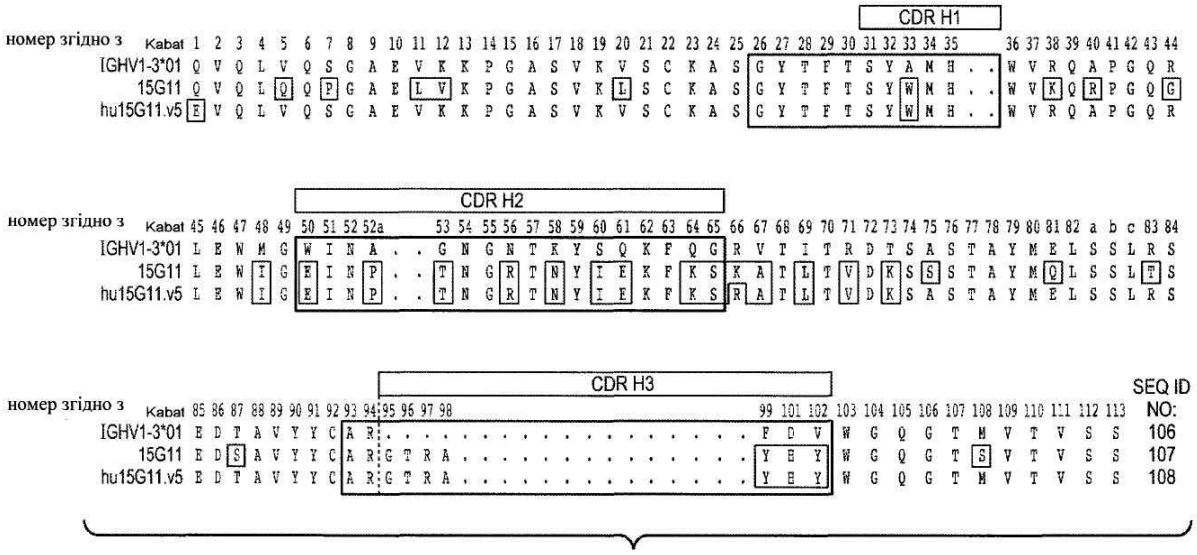
номер згідно з Kabat	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
IGKV1-NL1*01	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	L	Y	A	A	S	R	L	.	.	.	.	.	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y
15G11	Q	Q	K	Q	G	K	S	P	Q	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	.	.	.	.	.	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	Q	Y
hu15G11.v5	Q	Q	K	P	G	K	S	P	K	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	.	.	.	.	.	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y

CDR L3

номер згідно з Kabat	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	SEQ ID NO:
IGKV1-NL1*01	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	T	P	.	.	.	.	.	.	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	103
15G11	S	L	K	I	N	S	L	Q	S	E	D	F	G	T	Y	Y	C	Q	H	F	W	G	T	P	.	.	.	.	.	.	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K	104
hu15G11.v5	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	H	F	W	G	T	P	.	.	.	.	.	.	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	105

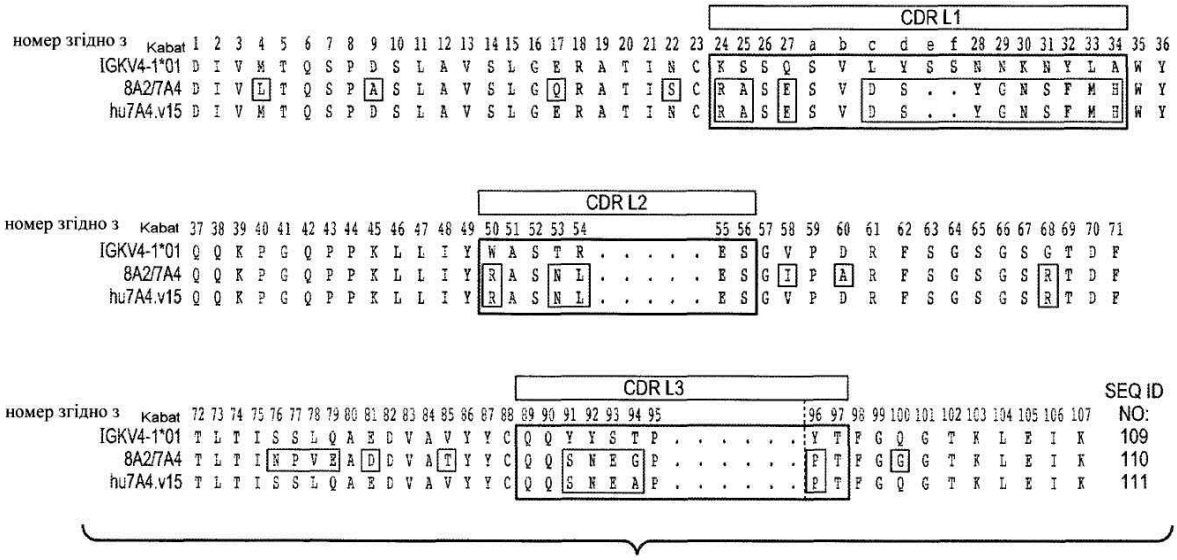
Фіг. 4A-1

гуманізація **15G11** з генеруванням **hu15G11.v5**
важкий ланцюг, каппа: антитіло миші, вирівняне по зародкових лініях людини



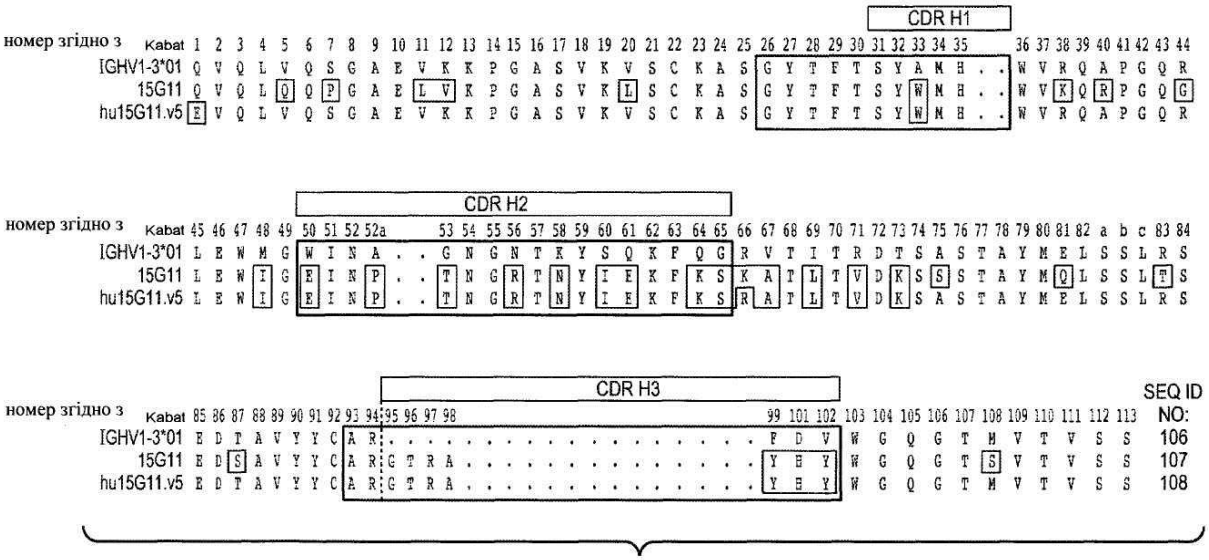
Фіг. 4А-2

гуманізація **7А4/8А2** з генеруванням **hu7A4.v15**
легкий ланцюг, каппа: антитіло миші, вирівняне по зародкових лініях людини



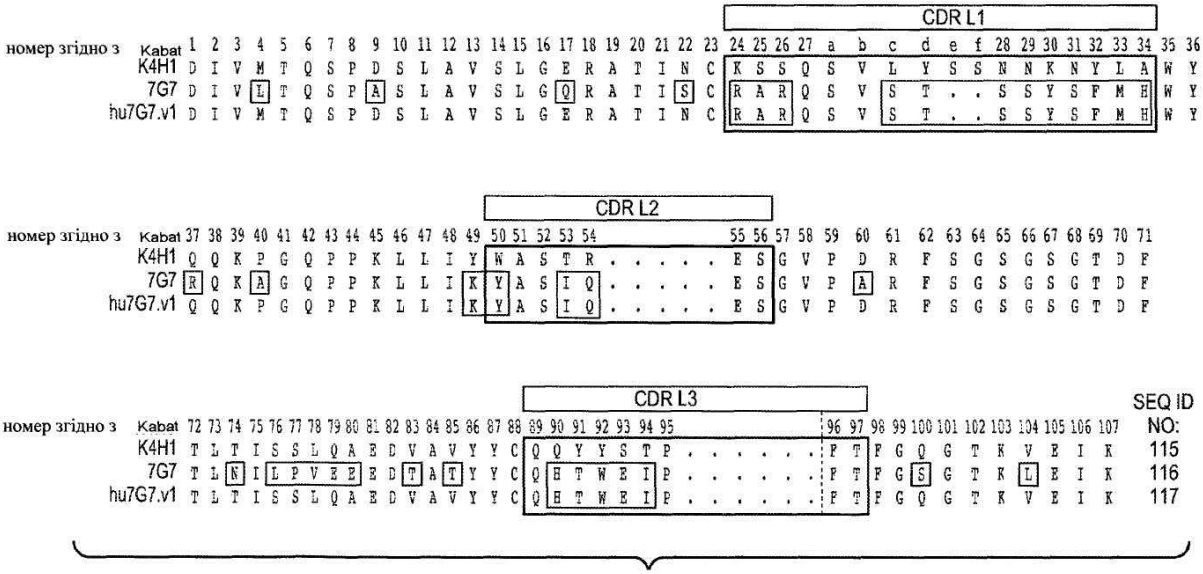
Фіг. 4В-1

гуманізація **7A4/8A2** з генеруванням **hu7A4.v15**
важкий ланцюг, каппа: антитіло миші, вирівняне по зародкових лініях людини



Фіг. 4B-2

гуманізація **7G7** з генеруванням **hu7G7.v1**
легкий ланцюг, каппа: антитіло миші, вирівняне по зародкових лініях людини



Фіг. 4C-1

гуманізація **7G7** з генеруванням **hu7G7.v1**

важкий ланцюг, каппа: антитіло миші, вирівняне по зародкових лініях людини

CDR H1 (Kabat 26–35)

номер згідно з Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	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
KAH1	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	Y	I	H	.	.	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G
7G7	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	S	E	L	V	R	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	.	.	W	V	K	Q	R	H	G	Q	G
hu7G7.v1	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	.	.	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G

CDR H2 (Kabat 50–65)

номер згідно з Kabat	45	46	47	48	49	50	51	52	a			53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	a	b	c	83	84
KAH1	L	E	W	I	G	W	I	N	P	.	.	G	S	G	N	T	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	I	T	R	D	T	S	T	S	T	A	Y	L	E	L	S	S	L	R	S
7G7	L	E	W	I	G	N	I	Y	P	.	.	G	S	G	S	T	K	Y	D	E	R	F	K	S	K	G	T	L	T	V	D	T	S	S	S	T	A	Y	M	H	L	S	S	L	T	S
hu7G7.v1	L	E	W	I	G	N	I	Y	P	.	.	G	S	G	S	T	K	Y	D	E	R	F	K	S	R	V	T	I	T	V	D	T	S	T	S	T	A	Y	L	E	L	S	S	L	R	S

CDR H3 (Kabat 95–102)

номер згідно з Kabat	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B		C	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	SEQ ID NO:
KAH1	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	.	.	.	.	.	.	.	.	. . . .	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	118
7G7	E	D	S	A	V	Y	Y	C	T	R	G	G	Y	D	S	R	A	W	. . . .	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A	119
hu7G7.v1	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	G	G	Y	D	S	R	A	W	. . . .	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	120

Фіг. 4C-2

гуманізація **16F6** з генеруванням **hu16F6.v4**

легкий ланцюг, каппа: антитіло миші, вирівняне по зародкових лініях людини

CDR L1 (Kabat 24–34)

номер згідно з Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	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
IGKV4-9*01	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	F	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	. . . . . .	G	I	S	S	Y	L	A	W	Y
16F6	D	V	Q	I	T	Q	S	P	S	Y	L	T	A	S	P	G	E	T	I	T	I	N	C	R	A	S	K	. . . . . .	S	I	S	K	Y	L	A	W	Y
hu16F6.v4	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	K	. . . . . .	S	I	S	K	Y	L	A	W	Y

CDR L2 (Kabat 50–56)

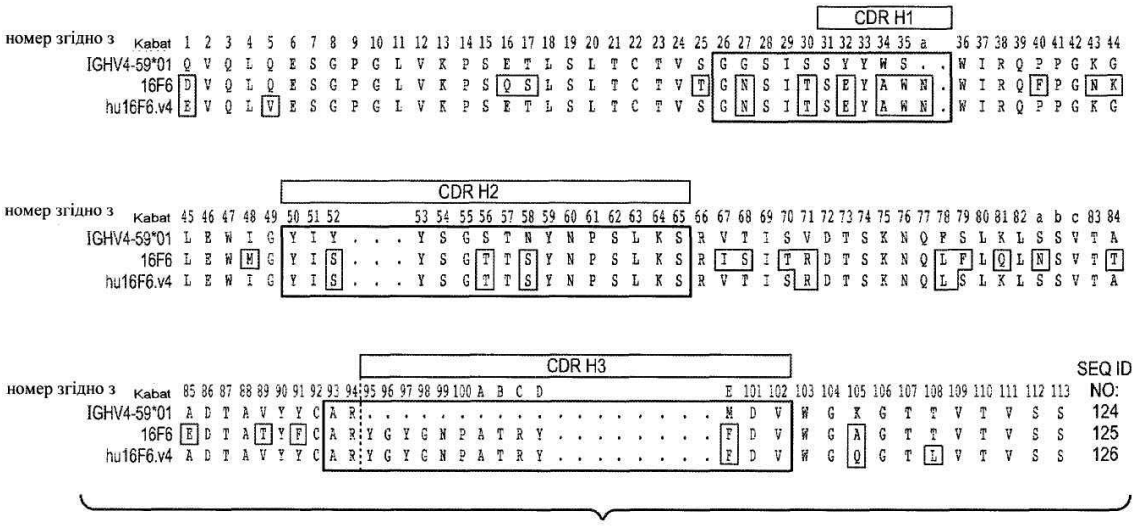
номер згідно з Kabat	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54		55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
IGKV4-9*01	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	T	L	. . . . .	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F
16F6	Q	E	K	P	G	K	T	N	K	L	L	I	Y	S	G	S	T	L	. . . . .	Q	S	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F
hu16F6.v4	Q	Q	K	P	G	K	T	N	K	L	L	L	Y	S	G	S	T	L	. . . . .	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y

CDR L3 (Kabat 89–97)

номер згідно з Kabat	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95		96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	SEQ ID NO:
IGKV4-9*01	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	L	N	S	Y	P	. . . .	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	121
16F6	T	L	T	I	S	N	L	E	P	E	D	F	A	M	Y	Y	C	Q	Q	H	N	E	Y	P	. . . .	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	122
hu16F6.v4	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	H	N	E	Y	P	. . . .	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	123

Фіг. 4D-1

гуманізація **16F6** з генеруванням **hu16F6.v4**
важкий ланцюг, каппа: антитіло миші, вирівняне по зародкових лініях людини



Фіг. 4D-2

ФІГ. 4E-1

ФІГ. 4E-2

ФІГ. 4E

15G11, 7A4 і **16F6** варіанти гуманізації

	LC		HC					huTfR			CynoTfR			Cy/hu
	43	48	48	67	69	71	73	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	відношення
mu15G11	S	V	I	A	L	V	K	8.900E+05	8.825E-04	9.916E-10	1.288E+06	3.349E-03	2.600E-09	2.6
hu15G11.v1	A	L	M	V	I	R	T	6.240E+05	3.194E-03	5.119E-09	8.571E+05	8.670E-03	1.012E-08	2.0
hu15G11.v2	A	L	M	V	I	V	T	3.520E+05	3.290E-03	9.347E-09	4.554E+05	8.021E-03	1.761E-08	1.9
hu15G11.v3	S	V	M	V	I	R	T	5.703E+05	2.347E-03	4.115E-09	8.044E+05	4.292E-03	5.336E-09	1.3
hu15G11.v4	S	V	M	V	I	V	T	4.773E+05	1.855E-03	3.886E-09	5.732E+05	4.033E-03	7.036E-09	1.8
hu15G11.v5	S	V	I	A	L	V	K	6.46E+05	0.00215	3.33E-09	5.43E+05	0.00641	1.18E-08	3.5

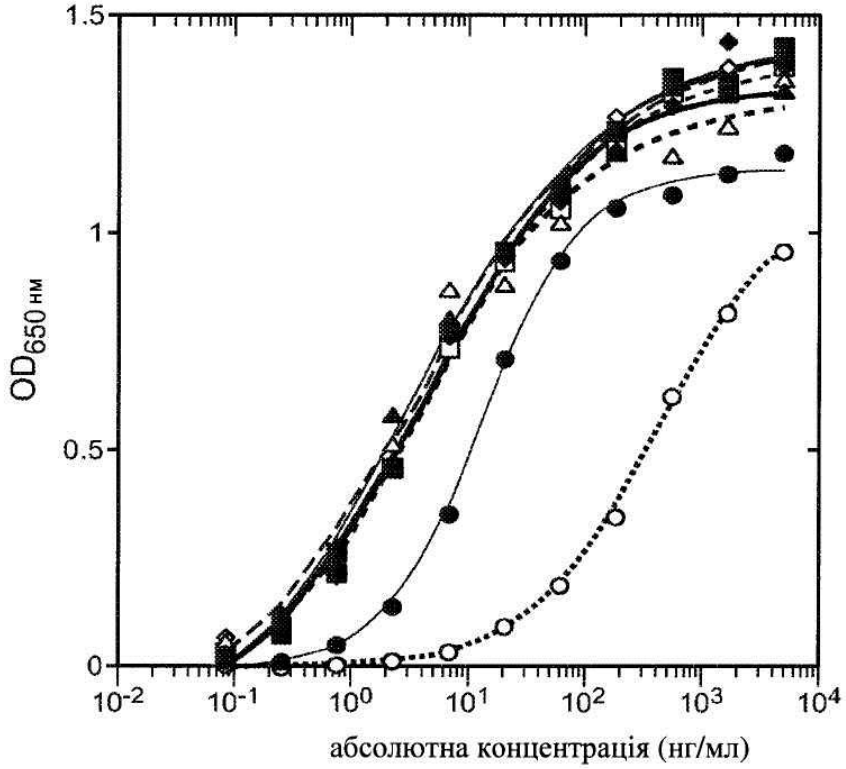
	LC		HC				huTfR			CynoTfR			Cy/hu
	27d	58	68	94	24	71	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	відношення
ch 7A4	D	I	R	A	G	V	2.11E+06	4.34E-04	2.06E-10	1.06E+06	6.63E-04	6.27E-10	3.04
ch7A4/8A2	S	I	R	G	G	V	3.007E+06	3.353E-04	1.115E-10	1.315E+06	1.216E-03	9.247E-10	8.3
hu7A4.v1	S	V	G	G	A	R	1.41E+06	3.94E-04	2.79E-10	9.15E+05	1.53E-03	1.67E-09	6.0
hu7A4.v2	S	V	G	G	G	R	1.60E+06	3.71E-04	2.32E-10	9.62E+05	1.17E-03	1.22E-09	5.3
hu7A4.v3	S	V	G	G	A	V	6.24E+05	3.39E-04	5.43E-10	3.22E+05	9.34E-04	2.90E-09	5.3
hu7A4.v4	S	V	G	G	G	V	4.82E+05	2.95E-04	6.12E-10	2.52E+05	9.66E-04	3.83E-09	6.3
hu7A4.v5	S	I	G	G	A	R	1.748E+06	6.363 E-04	3.640E-10	1.461E+06	1.757E-03	1.203E-09	3.3
hu7A4.v6	S	I	G	G	G	R	2.845E+06	7.396 E-04	2.600E-10	1.780E+06	1.883E-03	1.058E-09	4.1

Фіг. 4E-1

hu7A4.v7	S	I	G	G	A	V	1.113E+06	5.735E-04	5.153E-10	2.428E+06	2.855E-03	1.176E-09	2.3
hu7A4.v8	S	I	G	G	G	V	8.326E+05	1.077E-03	1.294E-09	2.768E+05	3.411E-03	1.232E-08	9.5
hu7A4.v9	S	V	R	G	A	R	1.930E+06	2.304E-04	1.194E-10	1.280E+06	5.477E-04	4.279E-10	3.6
hu7A4.v10	S	V	R	G	G	R	1.684E+06	2.407E-04	1.429E-10	1.115E+06	5.632E-04	5.051E-10	3.5
hu7A4.v11	S	V	R	G	A	V	1.487E+06	2.323E-04	1.562E-10	8.049E+05	7.588E-04	9.427E-10	6.0
hu7A4.v12	S	V	R	G	G	V	9.159E+05	1.833E-04	2.001E-10	4.587E+05	9.580E-04	2.089E-09	10.4
hu7A4.v13	S	V	G	A	G	V	4.51E+05	6.14E-04	1.36E-09	2.13E+05	2.42E-03	1.14E-08	8.3
hu7A4.v14	S	I	G	A	G	V	6.14E+05	7.33E-04	1.19E-09	2.30E+05	3.61E-03	1.57E-08	13.2
hu7A4.v15	S	V	R	A	G	V	6.73E+05	3.77E-04	5.61E-10	2.90E+05	2.26E-03	7.80E-09	13.9

	LC		HC		huTfR			CynoTfR			Cy/hu
	43	44	71	78	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	відношення
mu16F6	T	N	R	L	1.36E+05	2.81E-04	2.07E-09	1.23E+05	9.13E-04	7.45E-09	3.6
hu16F6.v1	A	P	V	F	4.10E+04	7.67E-04	1.87E-08	4.64E+04	0.009242	1.99E-07	10.7
hu16F6.v2	A	P	R	L	4.62E+04	1.97E-04	4.25E-09	4.38E+04	0.002981	6.81E-08	16.0
hu16F6.v3	T	N	V	F	7.86E+04	3.23E-04	4.11E-09	7.26E+04	0.002503	3.45E-08	8.4
hu16F6.v4	T	N	R	L	8.99E+04	7.94E-05	8.84E-10	8.30E+04	9.13E-04	1.10E-08	12.5

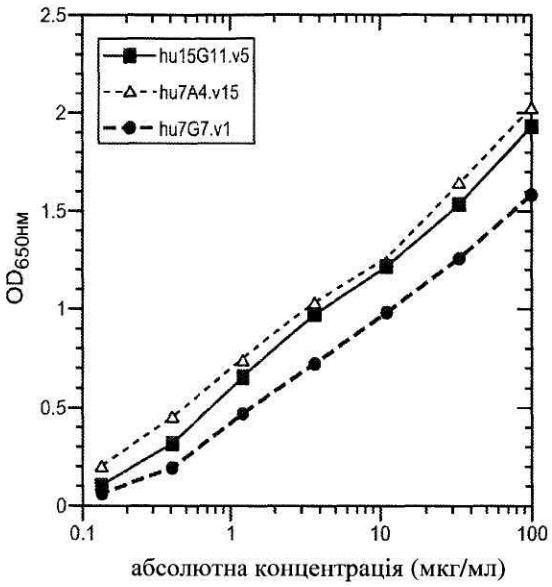
Фіг. 4E-2



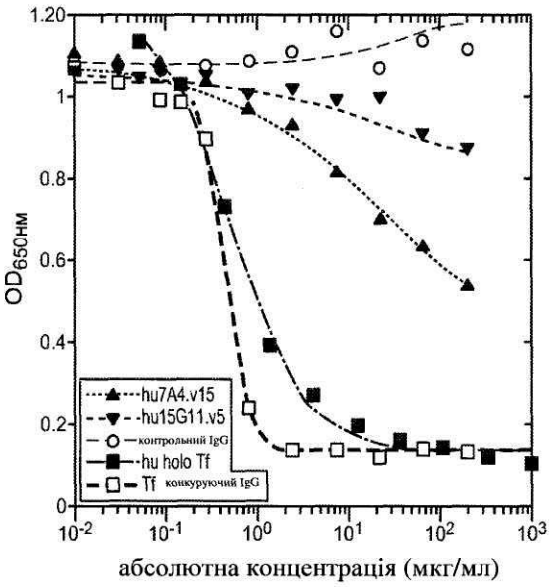
зв'язування антитіла в присутності (білі значки, переривиста лінія) або за відсутністю (чорні значки, суцільна лінія) 6,3 мкм holo-Tf

hu7A4.v15 - квадрат
hu15G11.v5 - ромб
hu7G7.v1 - трикутник
Tf конкуруюче антитіло - кружок

Фіг. 5



Фіг. 6А



Фіг. 6В

	15G11 варіант IgG	ELIZA (EC50) з використанням IgG huTfR (нг/мл)	CynoTfR (нг/мл)	підгонка (SCK) 1:1 fit (IgG) huTfR (нМ)	CynoTfR (нМ)	підгонка стаціонарний стан (IgG) huTfR (нМ)	CynoTfR (нМ)	підгонка (Fab) huTfR (нМ)	CynoTfR (нМ)
	15G11.v5	16± 1	20± 2	3.3	12			4.7	16
CDR-H3	T96A	274	3378	173		433			
	V99A	16.1	21.8						
	H101A	14.2	21.6						
	V102A	15.7	22.3						
CDR-L3	Q89A	30	506	125	268	212	591		
	H90A	13	24						
	F91A	45.8	953.3	167 ± 69		228 ± 152		383	
	W92A	11.8	44.1	31	32	123	327	280	370
	G93A	14.5	50.8	40	61	150	412	245	1300
	T94A	16.8	29.3						
	P95A	10.6	40.6	29	57	94	258	170	886
	L96A	9.9	18						
	T97A	13.4	15.7						

CDR L3									SEQ ID
89	90	91	92	93	94	95	96	97	NO:
Q	H	F	W	G	T	P	L	T	128

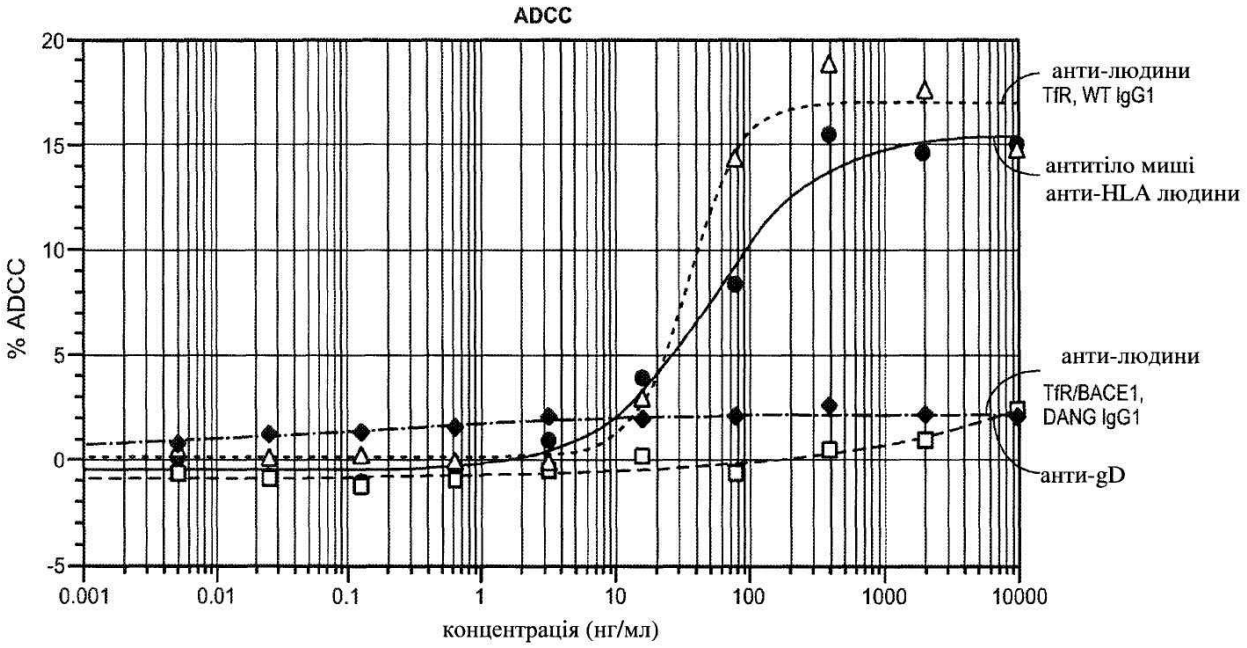
CDR H3							SEQ ID
95	96	97	98	99	101	102	NO:
G	T	R	A	Y	H	Y	129

Фіг. 7А

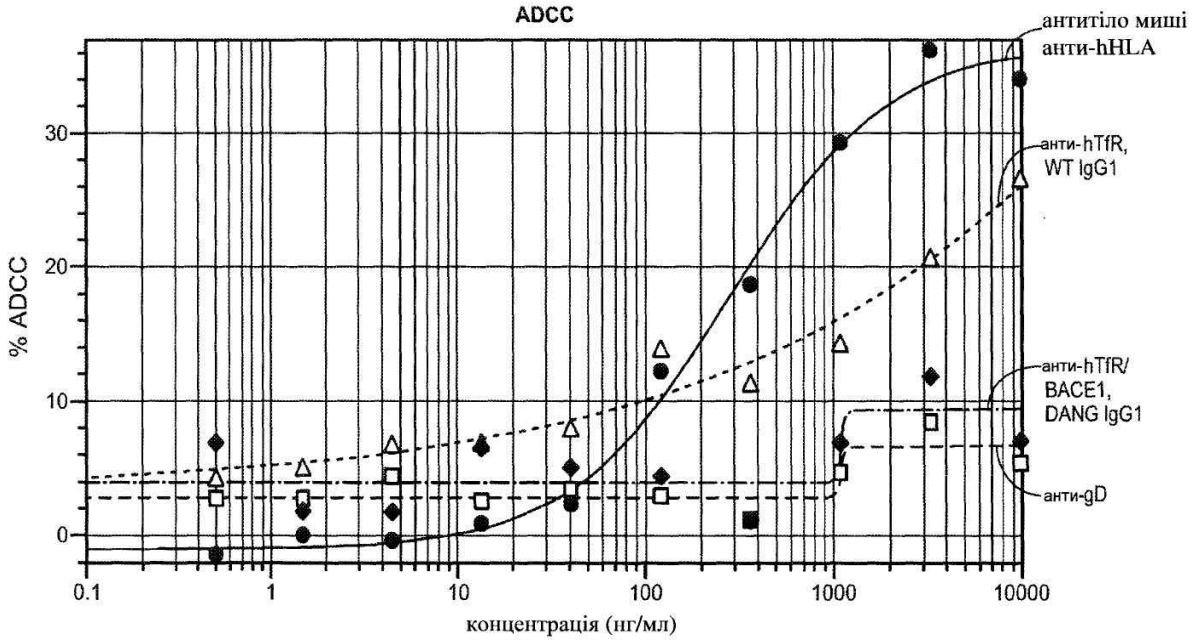
	7A4варіант IgG	ELIZA (EC50) з використанням IgG huTfR (нг/мл)	ELIZA (EC50) з використанням IgG CynoTfR (нг/мл)	підгонка (SCK) 1:1 fit (IgG) huTfR (нМ)	підгонка (SCK) 1:1 fit (IgG) CynoTfR (нМ)	підгонка стаціонарний стан (IgG) huTfR (нМ)	підгонка стаціонарний стан (IgG) CynoTfR (нМ)	підгонка (Fab) huTfR (нМ)	підгонка (Fab) CynoTfR (нМ)
	7A4.v15	14.8	14.2	0.58	7.8			0.4	4.3
CDR-H3	G95A	13.5	41.8						
	L96A	15.5	28.7						
	S97A								
	G98A	19.4	24.7						
	N99A	17	82.2	11	22	19	77		
	Y100A	15.9	24						
	V100aA								
	M100bA	16.1	16.9						
	D101A	17.3	18.5						
	Y102A	12.6	17.8						
CDR-L3	Q89A	10.9	13.8						
	Q90A	9.3	181	16	570	41	329	130	760
	S91A	11.3	16.3						
	N92A	8.7	13.7						
	E93A	12.2	17.6						
	P95A	9.7	15.9						
	P96A	10	16.2						
	T97A	12	22.6						

CDR L3									SEQ ID	CDR H3										SEQ ID
89	90	91	92	93	94	95	96	97	NO:	95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102	NO:
Q	Q	S	N	E	A	P	P	T	130	G	L	S	G	N	Y	V	M	D	Y	131

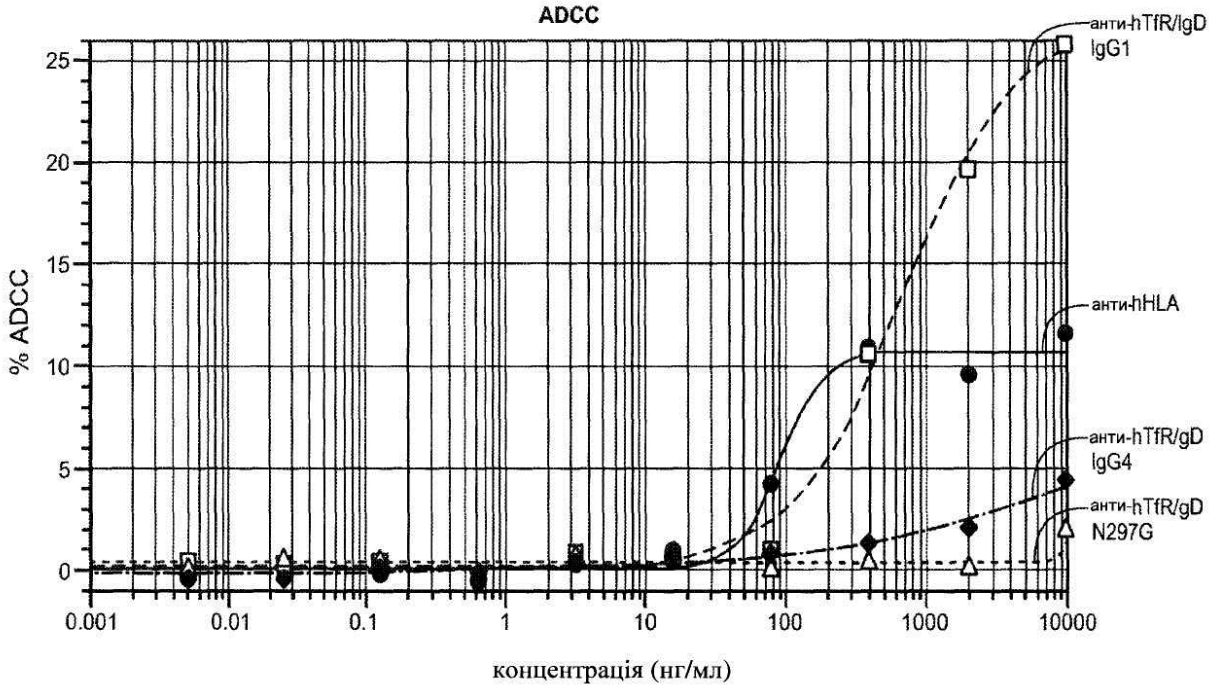
Фіг. 7B



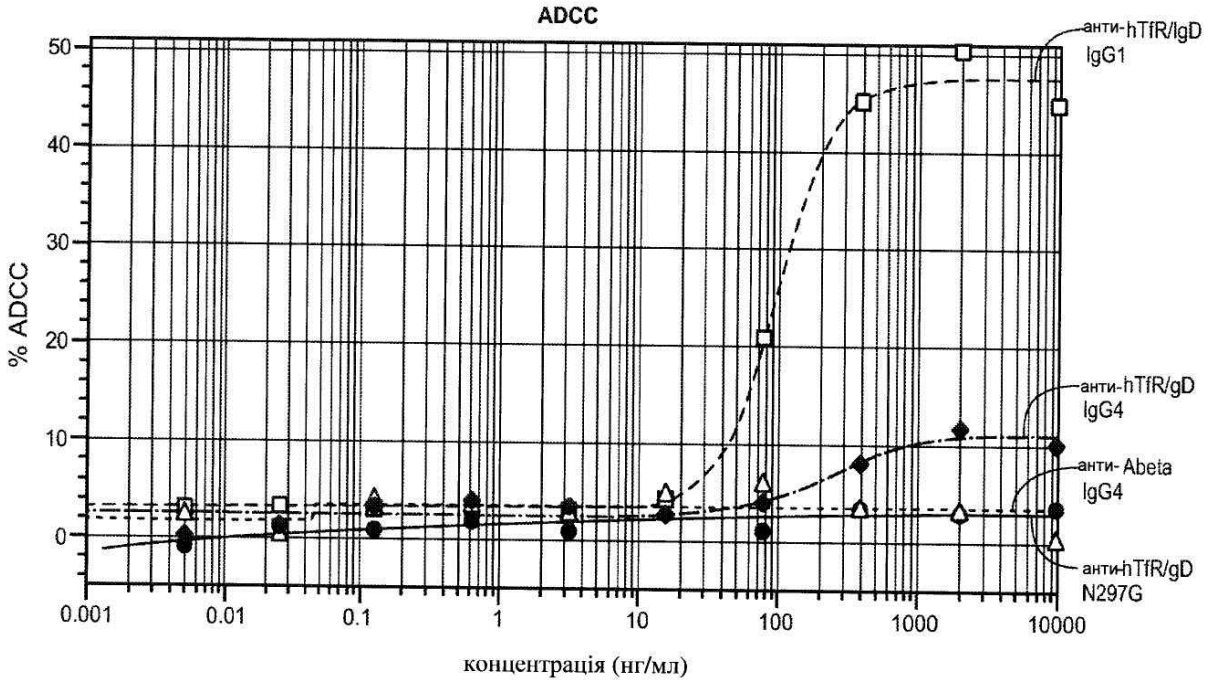
Фіг. 8A


ADCC
% ADCC
30
20
10
0
0.1
1
10
100
1000
10000
концентрація (нг/мл)
антитіло миші анти-hHLA
анти-hTfR, WT IgG1
анти-hTfR/ BACE1, DANG IgG1
анти-gD

Фіг. 8B

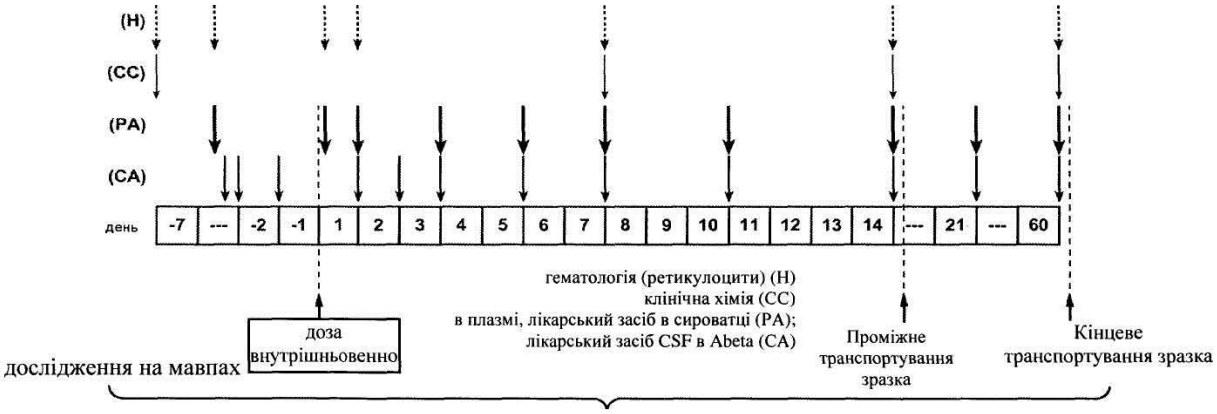

ADCC
% ADCC
25
20
15
10
5
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
концентрація (нг/мл)
анти-hTfR/IgD IgG1
анти-hHLA
анти-hTfR/gD IgG4
анти-hTfR/gD N297G

Фіг. 9A

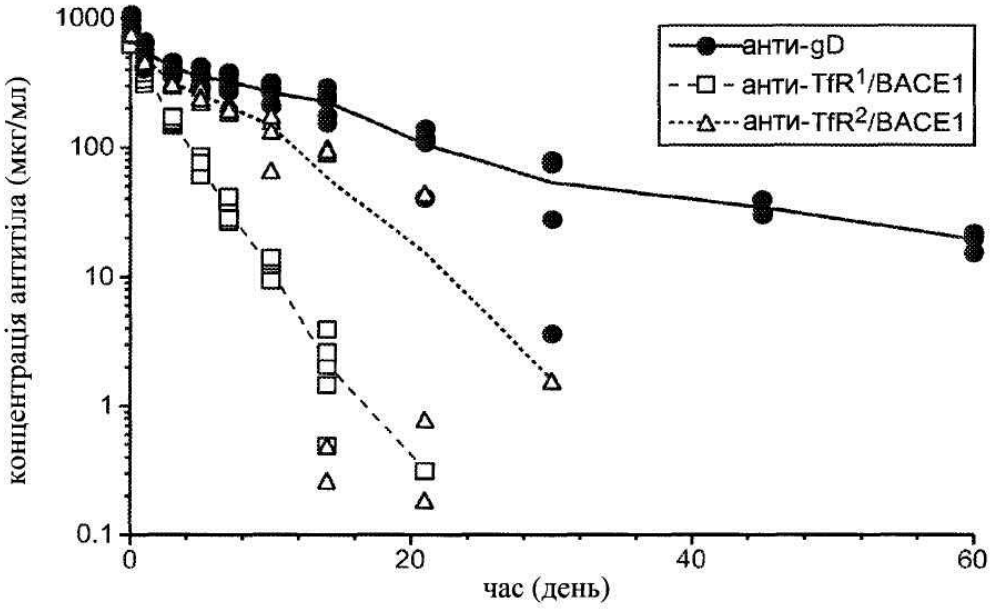


Фіг. 9B

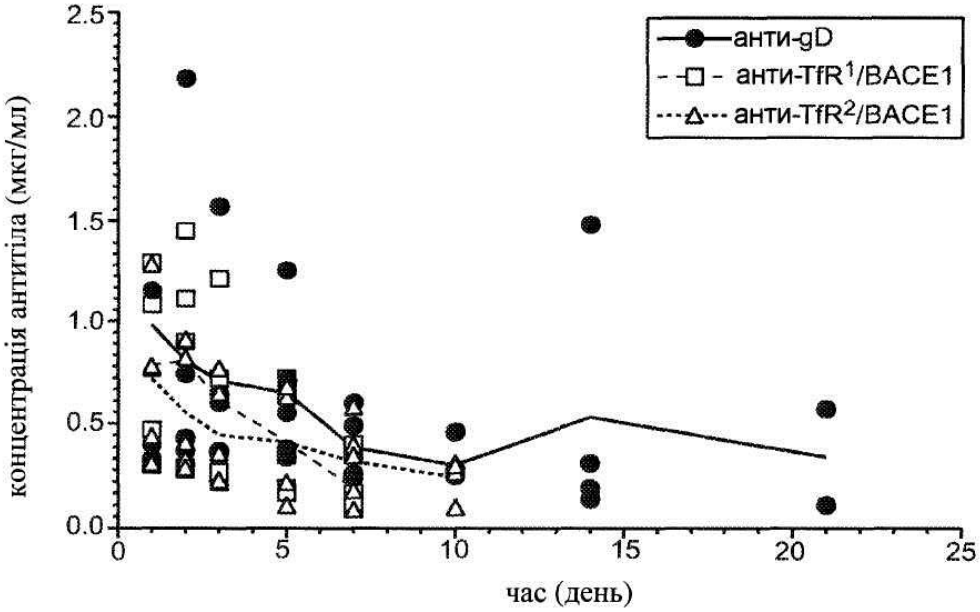
група	Кіл-ть	Tx	ізотип	доза (мг/кг)	TfR варіант	Biacore huTfR (нМ, Fab)	Biacore CynoTfR (нМ, Fab)
1	5	анти-gD	hIgG1	30			
2	5	анти-TfR[1]/BACE1	hIgG1 DANG	30	hu15G11.v5	6 ± 2	19 ± 9
3	5	анти-TfR[2]/BACE1	hIgG1 DANG	30	hu15G11.LC92A	230 ± 140	440 ± 160



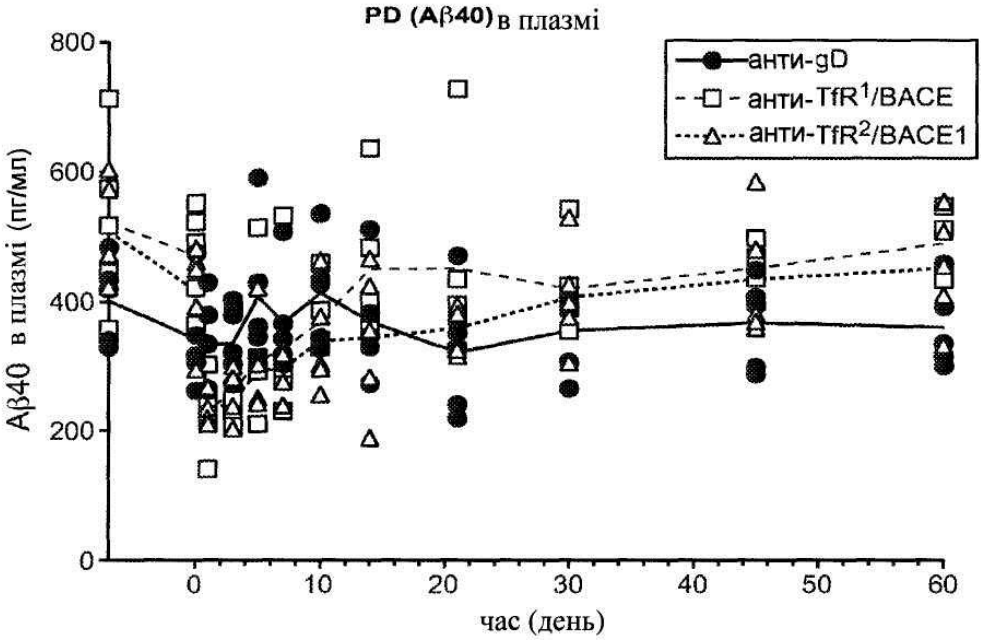
Фіг. 10



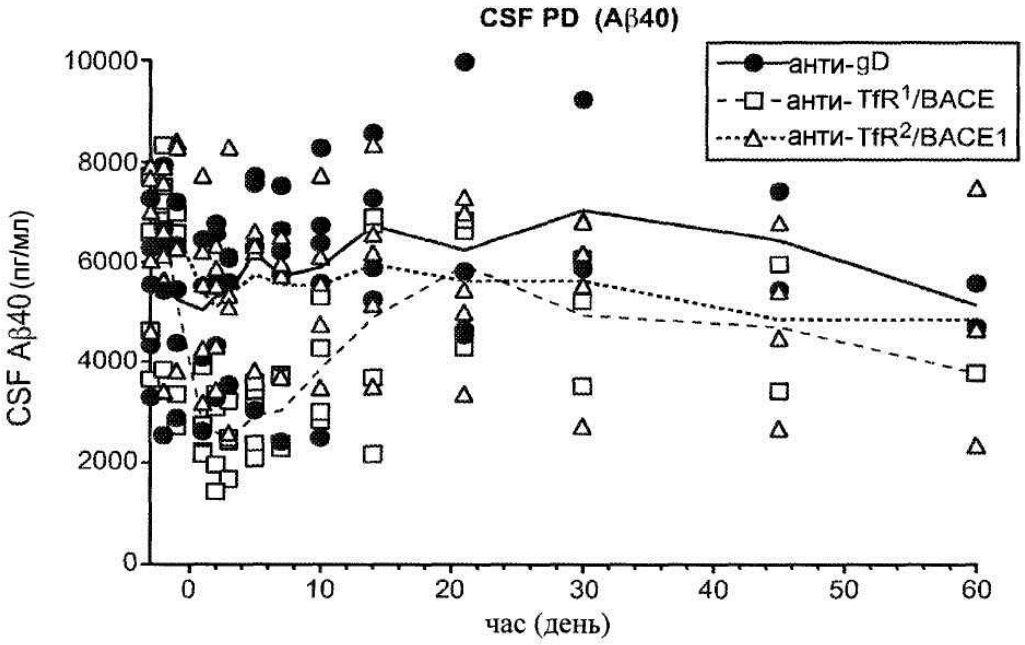
Фіг. 11A



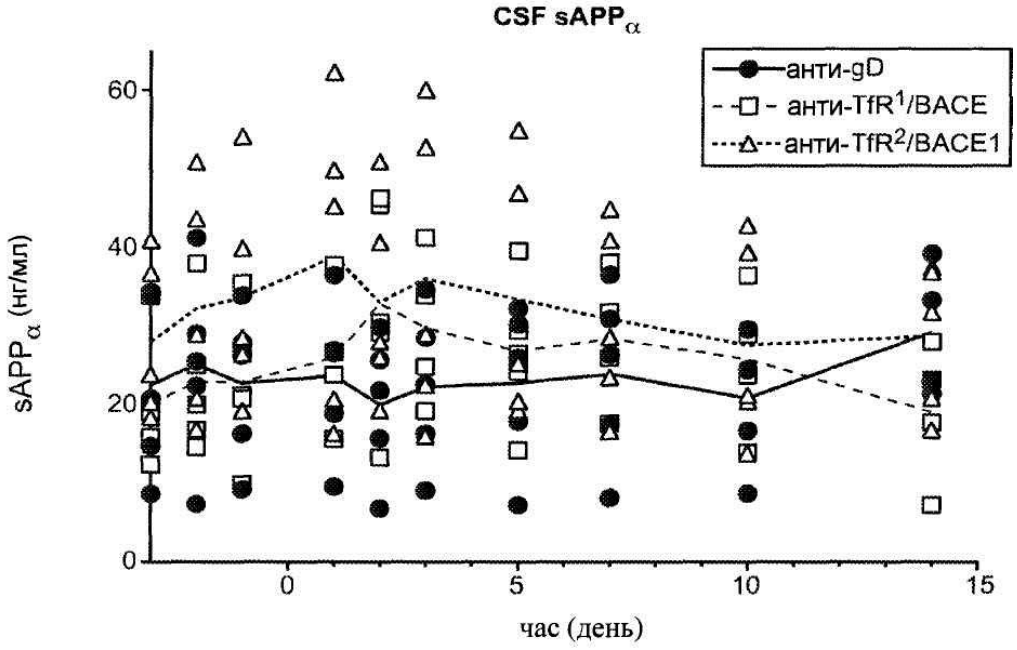
Фіг. 11B



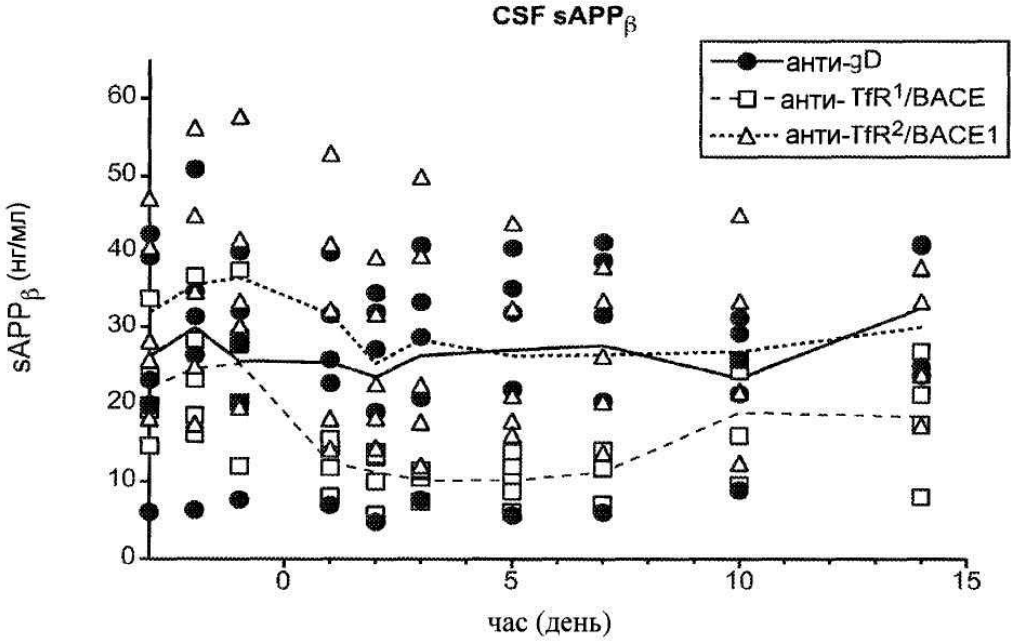
Фіг. 12A



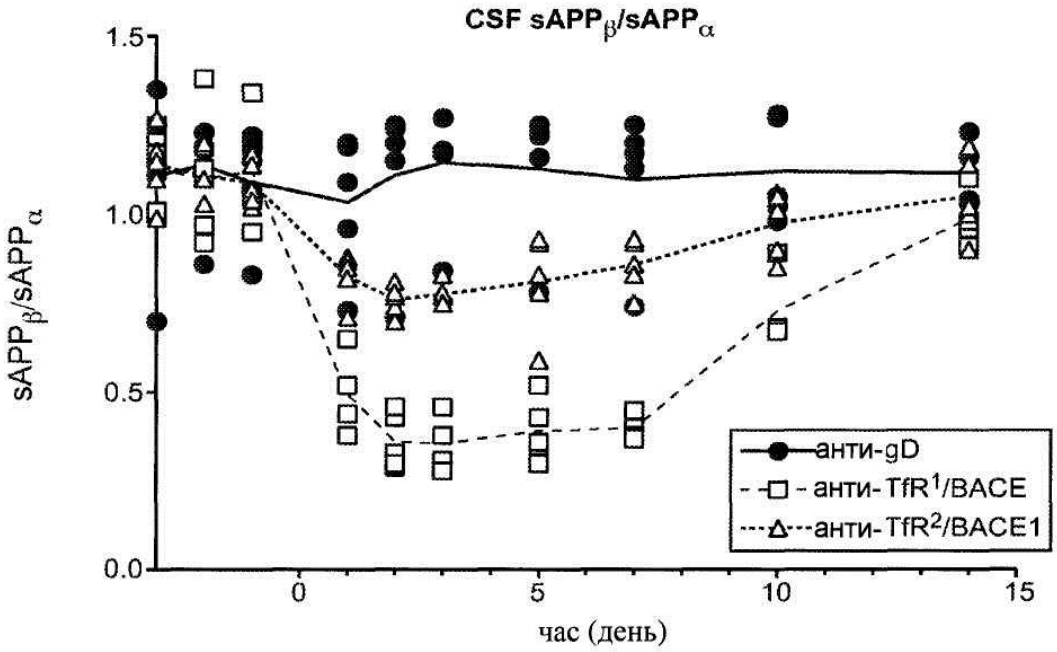
Фіг. 12B



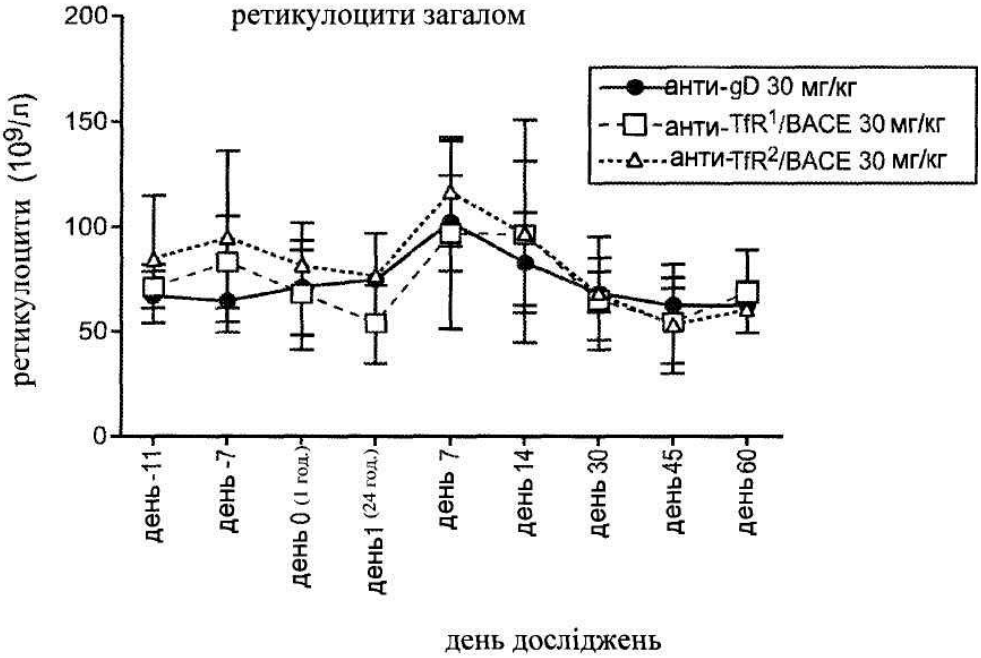
Фіг. 12C



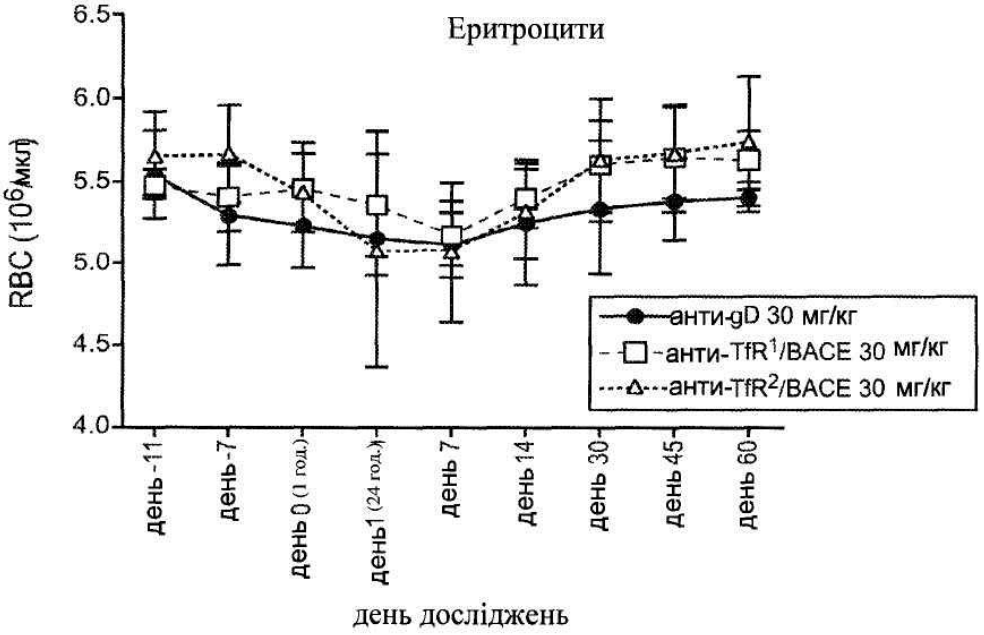
Фіг. 12D


CSF sAPPβ/sAPPα
sAPPβ/sAPPα
1.5
1.0
0.5
0.0
0
5
10
15
час (день)
анти-gD
анти-TfR1/BACE
анти-TfR2/BACE1

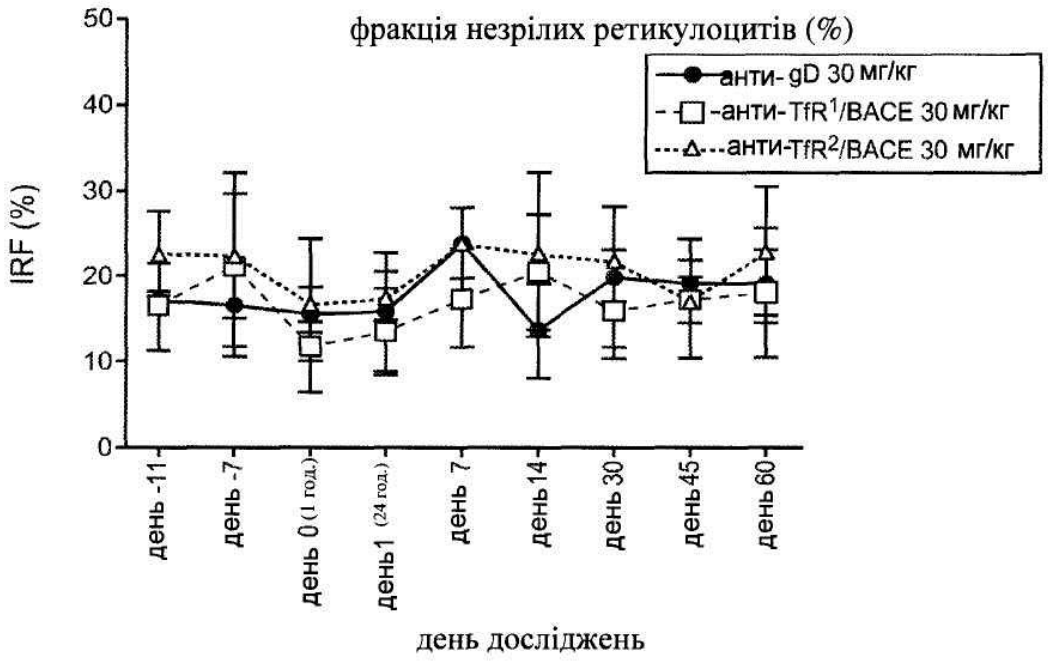
Фіг. 12E



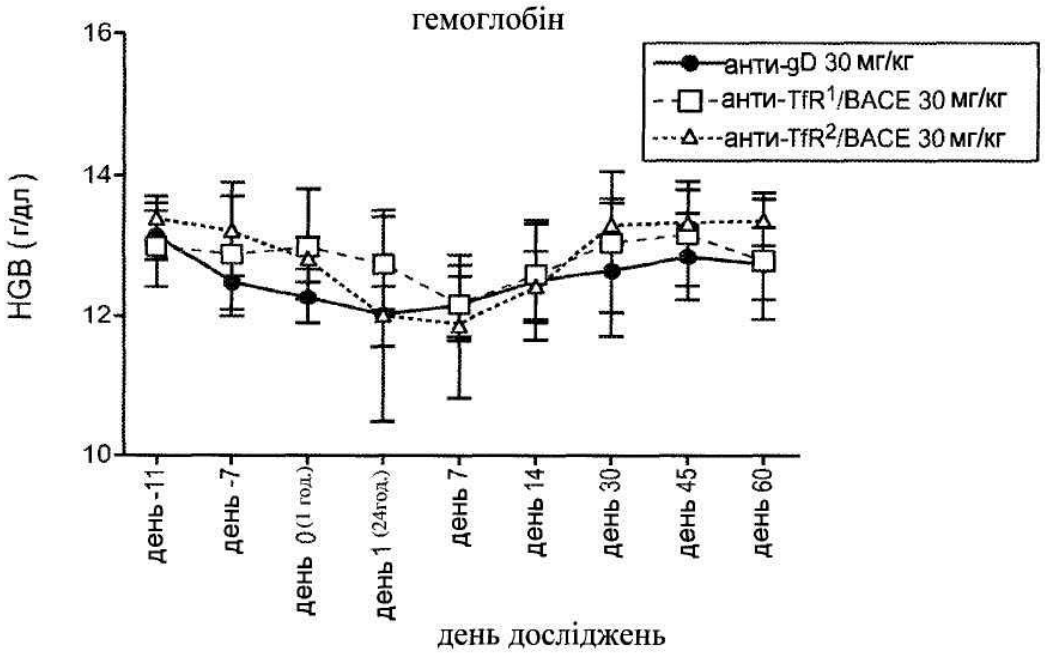
Фіг. 13А



Фіг. 13В

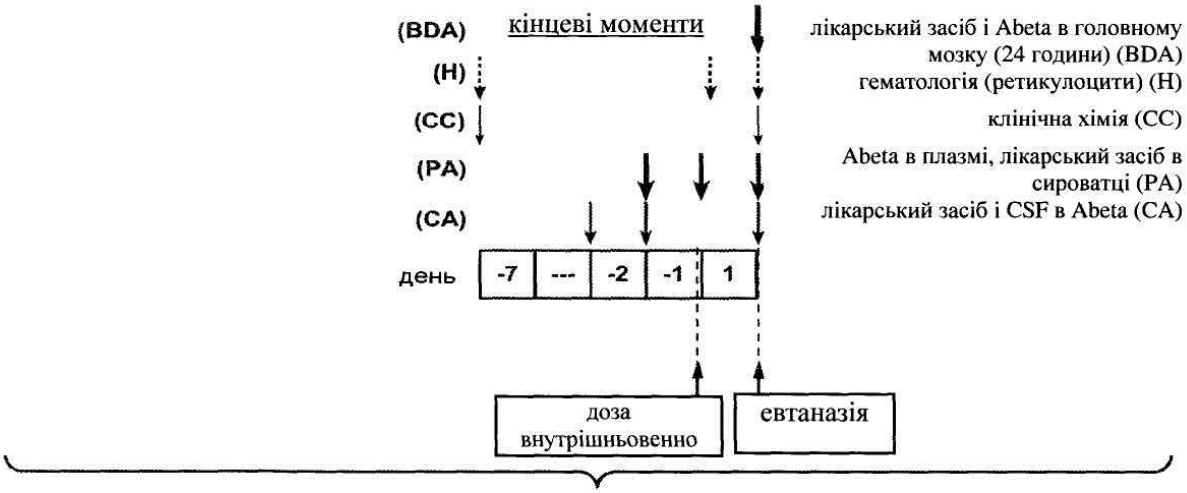


Фіг. 13C

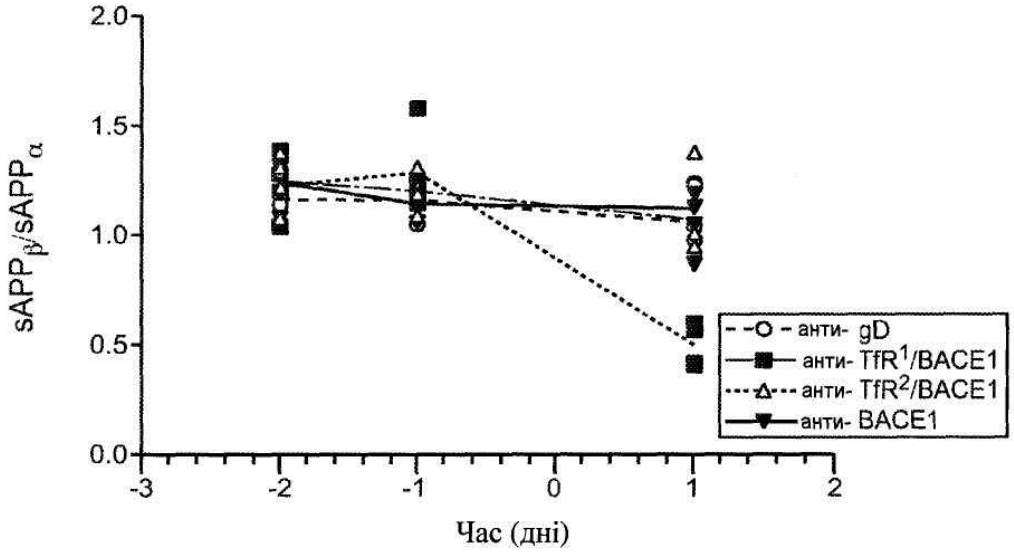


Фіг. 13D

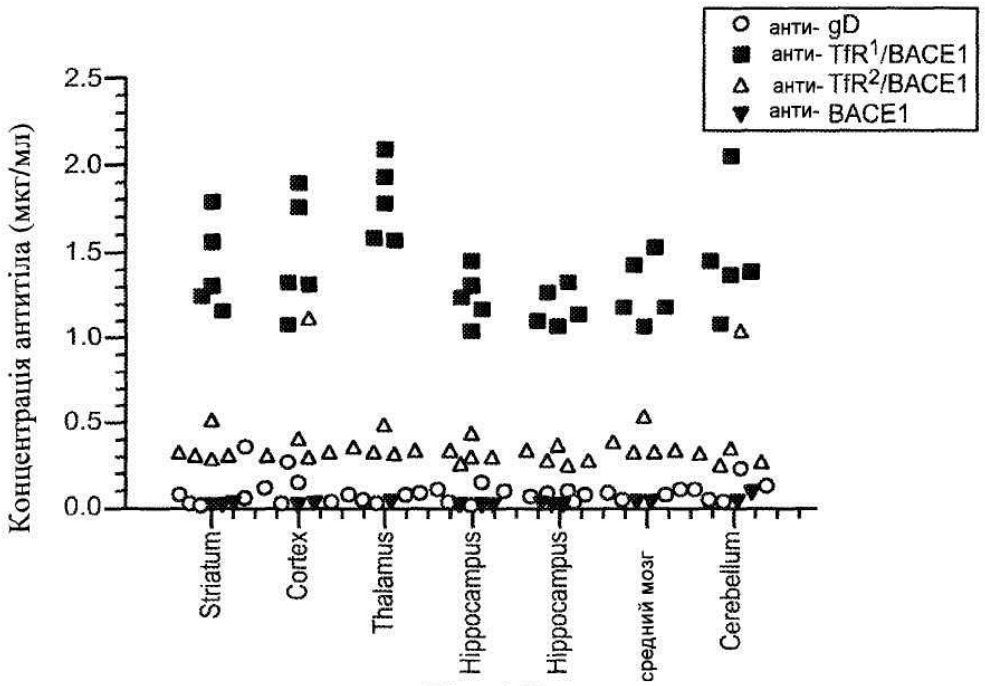
група	Кіл-ть	Tx	ізотип	доза (мг/кг)	TfR варіант	Biacore huTfR (нМ, Fab)	Biacore CynoTfR (нМ, Fab)
1	5	анти- gD	hIgG1	30			
2	5	анти- TfR[1]/BACE1	hIgG1 DANG	30	hu15G11.v5	6 ± 2	19 ± 9
3	5	анти-TfR[2]/BACE1	hIgG1 DANG	30	hu15G11.LC92A	230 ± 140	440 ± 160
4	5	анти- BACE1	hIgG1	30	немає	-	-



Фіг. 14



Фіг. 15A



Фіг. 15B

Номер Kabat: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

Kabat - CDR L1; Chothia - CDR L1; контакт - CDR L1

	1–23	CDR L1 (24–34)	35–37
YW412.8	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	R A S Q D V S T A V A	W Y Q
YW412.8.31	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	R A S Q D V S T A V A	W Y Q
YW412.8.30	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	R A S Q D V S T A V A	W Y Q
YW412.8.2	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	R A S Q D V S T A V A	W Y Q
YW412.8.29	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	R A S Q V V A N S L A	W Y Q
YW412.8.51	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	R A S Q D V S T A V A	W Y Q

Номер Kabat: 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

Kabat - CDR L2; Chothia - CDR L2; контакт - CDR L2

	38–49	CDR L2 (50–56)	57–80
YW412.8	Q K P G K A P K L L I Y	S A S F L Y S	G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31	Q K P G K A P K L L I Y	S A S F L Y S	G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.30	Q K P G K A P K L L I Y	S A S F L Y S	G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.2	Q K P G K A P K L L I Y	S A S F L Y S	G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.29	Q K P G K A P K L L I Y	L A S F L Y S	G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.51	Q K P G K A P K L L I Y	S A S F L Y S	G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P

Номер Kabat: 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

Kabat - CDR L3; Chothia - CDR L3; контакт - CDR L3

	81–88	CDR L3 (89–97)	98–108	
YW412.8	E D F A T Y Y C	Q Q S Y T T P P T	F G Q G T K V E I K R	SEQ ID NO: 132
YW412.8.31	E D F A T Y Y C	Q Q F P T Y L P T	F G Q G T K V E I K R	SEQ ID NO: 133
YW412.8.30	E D F A T Y Y C	Q Q G Y N D P P T	F G Q G T K V E I K R	SEQ ID NO: 134
YW412.8.2	E D F A T Y Y C	Q Q S S T D P T T	F G Q G T K V E I K R	SEQ ID NO: 135
YW412.8.29	E D F A T Y Y C	Q Q D A T S P P T	F G Q G T K V E I K R	SEQ ID NO: 136
YW412.8.51	E D F A T Y Y C	Q Q Y A T D P P T	F G Q G T K V E I K R	SEQ ID NO: 137

Фіг. 16A

Номер Kabat: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 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

Kabat - CDR H1; Chothia - CDR H1; контакт - CDR H1

	1–25	CDR H1 (26–35)	36–40
YW412.8	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S G Y A I H	W V R Q A
YW412.8.31	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F L G Y G I H	W V R Q A
YW412.8.30	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S G Y A I H	W V R Q A
YW412.8.2	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S G Y A I H	W V R Q A
YW412.8.29	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S G Y A I H	W V R Q A
YW412.8.51	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S G Y A I H	W V R Q A

Номер Kabat: 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78

Kabat - CDR H2; Chothia - CDR H2; контакт - CDR H2

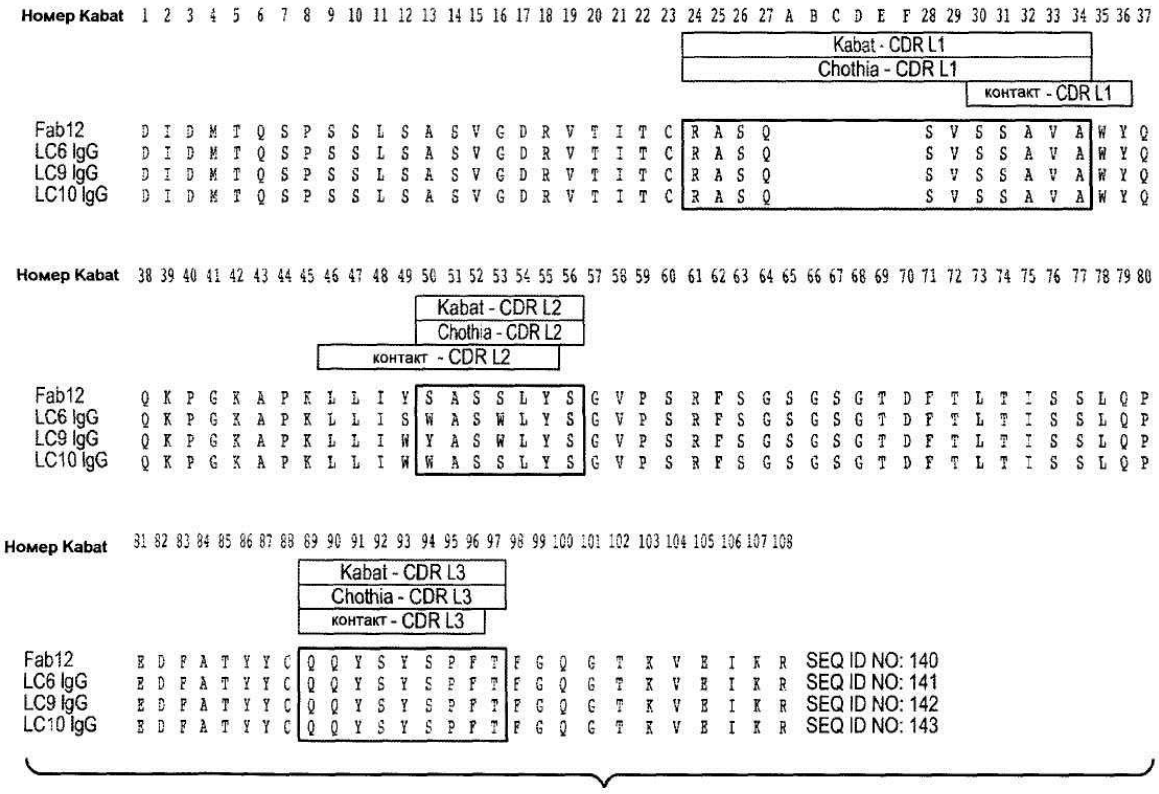
	41–48	CDR H2 (49–65)	66–78
YW412.8	P G K G L E W V	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G	R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31	P G K G L E W V	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G	R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.30	P G K G L E W V	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G	R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.2	P G K G L E W V	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G	R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.29	P G K G L E W V	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G	R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.51	P G K G L E W V	G W I S P A G G S T D Y A D S V K G	R F T I S A D T S K N T A

Номер Kabat: 79 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

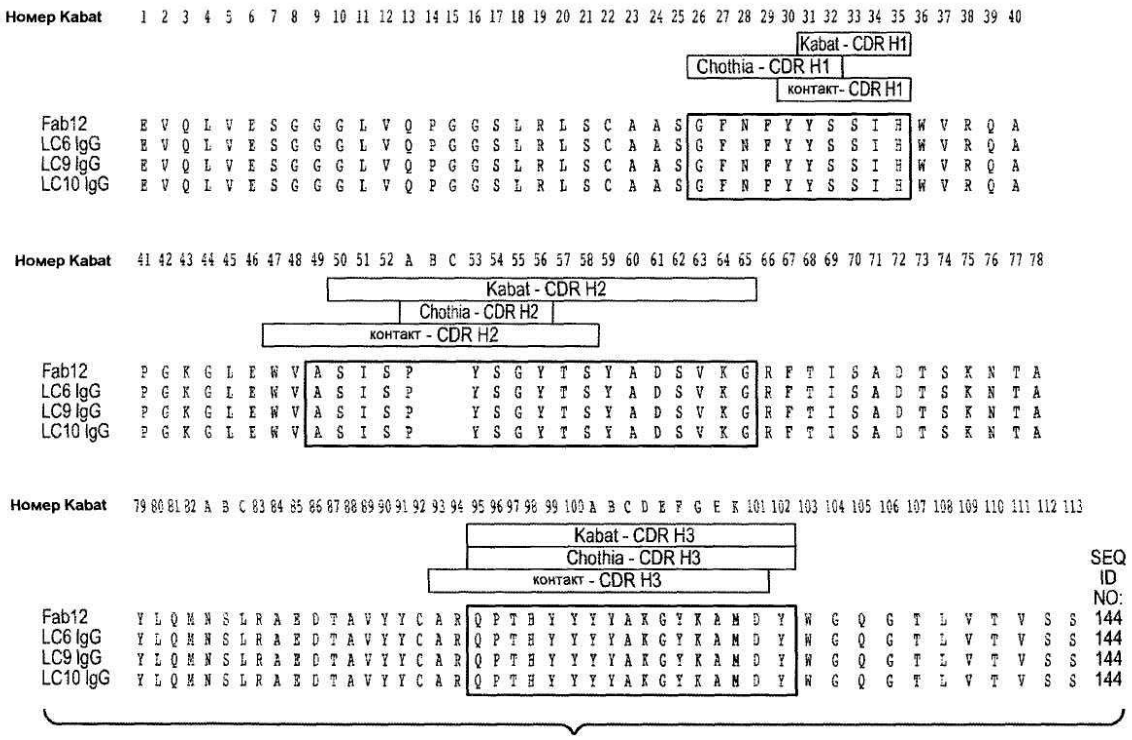
Kabat - CDR H3; Chothia - CDR H3; контакт - CDR H3

	79–94	CDR H3 (95–102)	103–113	SEQ ID NO:
YW412.8	Y L Q M H S L R A E D T A V Y Y C A R	G P F S P W V M D Y	W G Q G T L V T V S S	138
YW412.8.31	Y L Q M R S L R A E D T A V Y Y C A R	G P P S P W V M D Y	W G Q G T L V T V S S	139
YW412.8.30	Y L Q M R S L R A E D T A V Y Y C A R	G P P S P W V M D Y	W G Q G T L V T V S S	138
YW412.8.2	Y L Q M R S L R A E D T A V Y Y C A R	G P F S P W V M D Y	W G Q G T L V T V S S	138
YW412.8.29	Y L Q M R S L R A E D T A V Y Y C A R	G P P S P W V M D Y	W G Q G T L V T V S S	138
YW412.8.51	Y L Q M R S L R A E D T A V Y Y C A R	G P P S P W V M D Y	W G Q G T L V T V S S	138

Фіг. 16B



Фіг. 17A



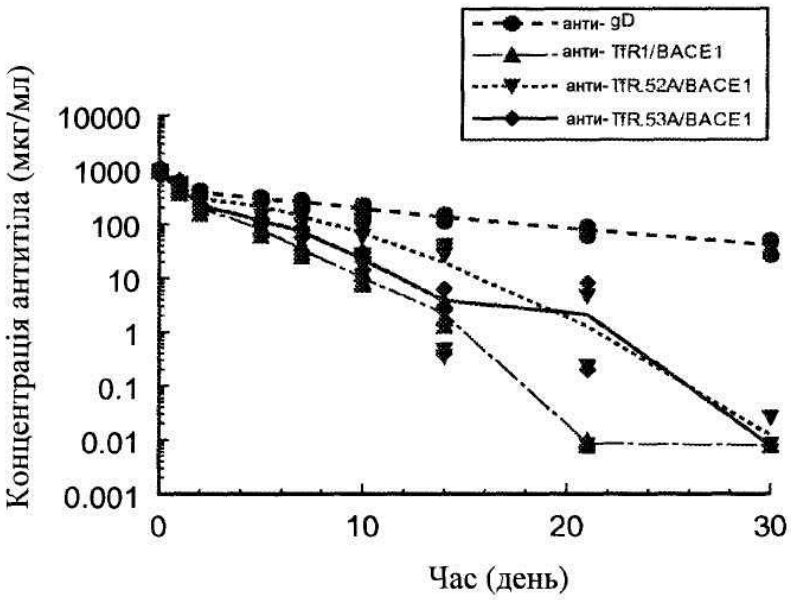
Фіг. 17B

```
  1  EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLELVAS
 51  INSNGGSTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCASGD
101  YWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT
151  VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT KTYTCNVDHK
201  PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE
251  VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV
301  LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM
351  TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS
401  RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLG  (SEQ 10 NO: 145)
```

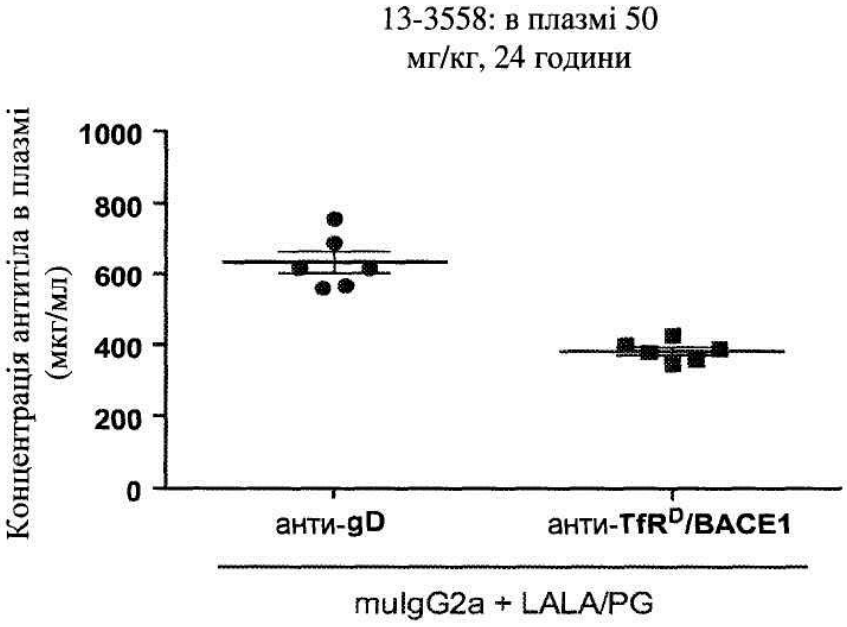
Фіг. 18A

```
  1  DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV YSNGDTYLHW YLQKPGQSPQ
 51  LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHVP
101  WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151  VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201  VTHQGLSSPV TKSFNRGEC  (SEQ 10 NO: 146)
```

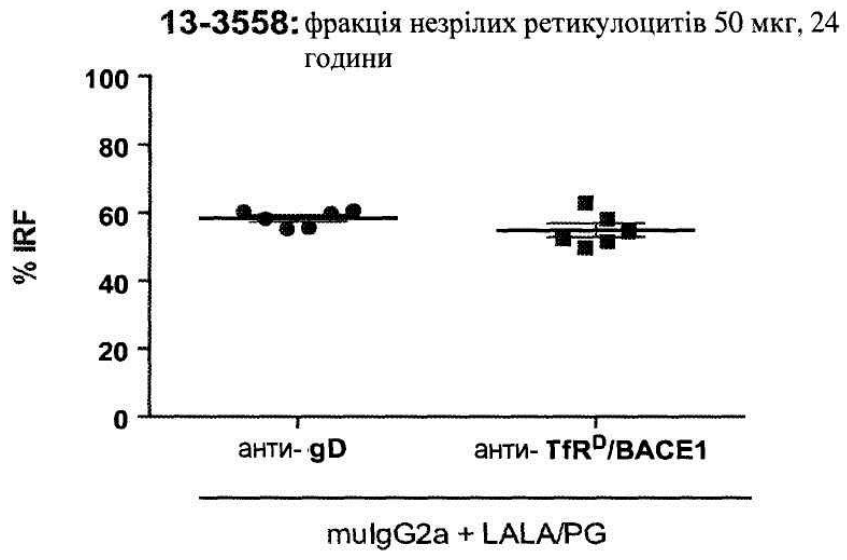
Фіг. 18B


анти- gD
анти- TfR1/BACE1
анти- TfR.52A/BACE1
анти- TfR.53A/BACE1
Концентрація антитіла (мкг/мл)
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
10
20
30
Час (день)

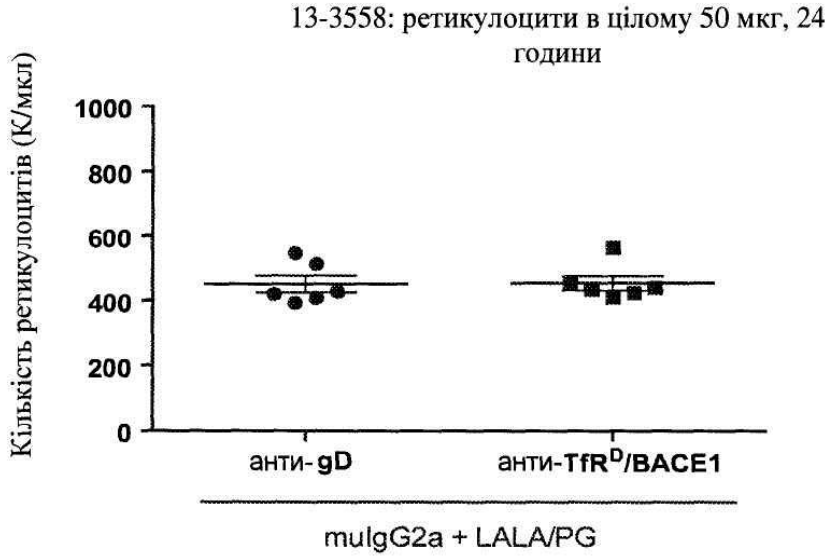
Фіг. 19


13-3558: в плазмі 50 мг/кг, 24 години
Концентрація антитіла в плазмі (мкг/мл)
1000
800
600
400
200
0
анти-gD
анти-TfR^{D}/BACE1
muIgG2a + LALA/PG

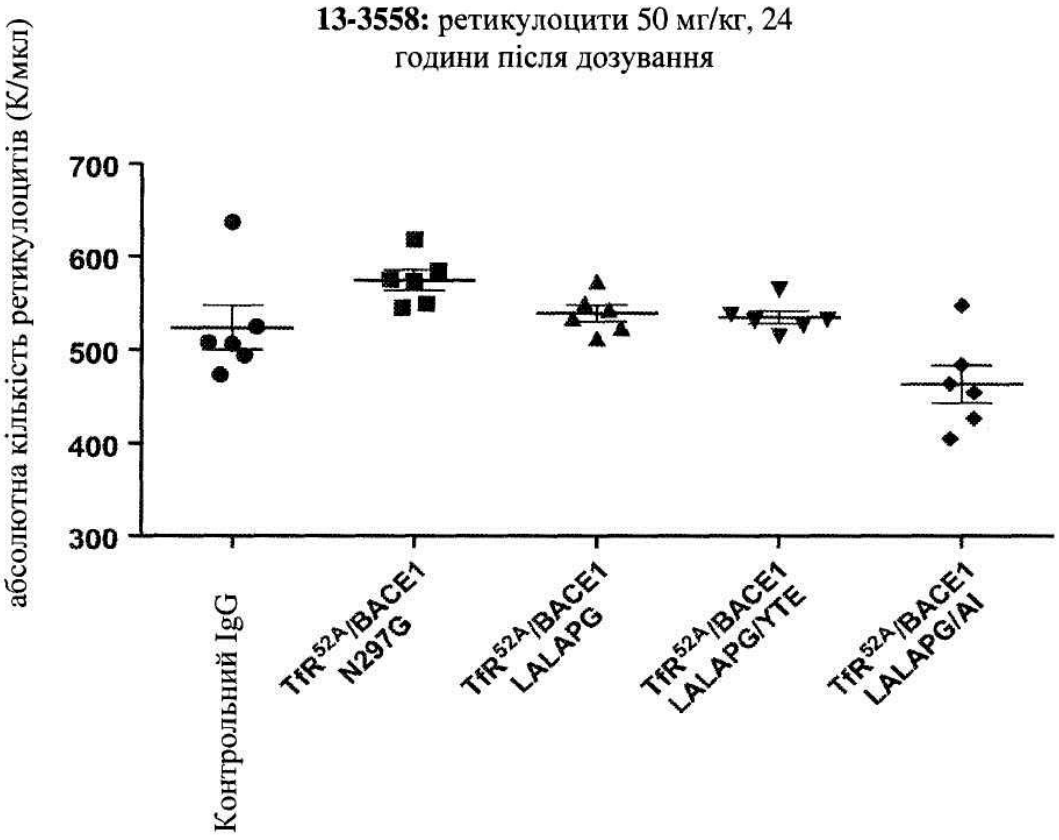
Фіг. 20



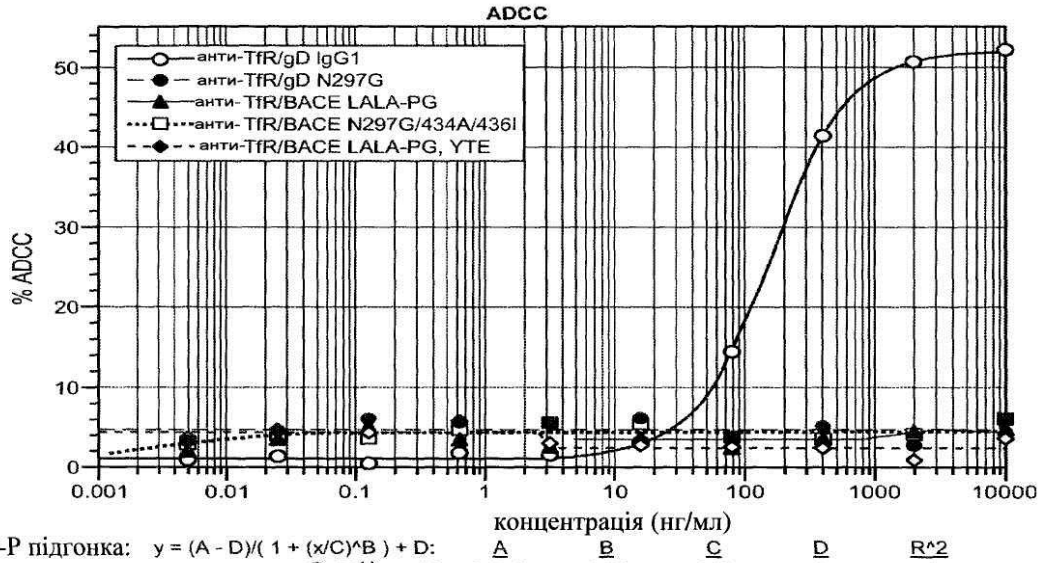
Фіг. 21A



Фіг. 21B


13-3558: ретикулоцити 50 мг/кг, 24 години після дозування
абсолютна кількість ретикулоцитів (К/мкл)
700
600
500
400
300
Контрольний IgG
TfR52A/BACE1 N297G
TfR52A/BACE1 LALAPG
TfR52A/BACE1 LALAPG/YTE
TfR52A/BACE1 LALAPG/AI

Фіг. 22



4-P підгонка: y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D:

		A	B	C	D	R^2
○графік	#1	0.979	1.46	162	51.9	1
□графік	#2	-1.7	0.647	0.00108	4.52	0.296
▲графік	#3	3.38	3.28	1.7e+03	4.8	0.264
◆графік	#4	4.42	19.5	2.98	2.33	0.608
●графік	#5	4.53	46.2	0.0587	4.82	0.0763

опція підгонки кривої - фіксоване значення вагового коефіцієнта

Фіг. 23

варіабельна область легкого ланцюга

CDR L1 - Contact
CDR L1 - Chothia
CDR L1 - Kabat

Номер Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	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
hu15G11.v5 (TfR1)	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	L	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K
hu15G11.52A	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	L	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K
hu15G11.53A	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	L	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K
hu15G11.92A (TfR2)	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	L	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K

CDR L2 - Contact
CDR L2 - Chothia
CDR L2 - Kabat

Номер Kabat	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
hu15G11.v5 (TfR1)	S	P	K	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A
hu15G11.52A	S	P	K	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A
hu15G11.53A	S	P	K	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A
hu15G11.92A (TfR2)	S	P	K	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A

CDR L3 - Contact
CDR L3 - Chothia
CDR L3 - Kabat

Номер Kabat	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
hu15G11.v5 (TfR1)	T	Y	Y	C	Q	H	F	W	G	T	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
hu15G11.52A	T	Y	Y	C	Q	H	F	W	G	T	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
hu15G11.53A	T	Y	Y	C	Q	H	F	W	G	T	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
hu15G11.92A (TfR2)	T	Y	Y	C	Q	H	F	A	G	T	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K

Фіг. 24A

варіабельна область важкого ланцюга

CDR H1 - Contact
CDR H1 - Chothia
CDR H1 -контакт

номер Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	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
hu15G11.v5 (TfR1)	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	W	V	R	Q	A	P	G
hu15G11.52A	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	W	V	R	Q	A	P	G
hu15G11.53A	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	W	V	R	Q	A	P	G
hu15G11.92A (TfR2)	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	W	V	R	Q	A	P	G

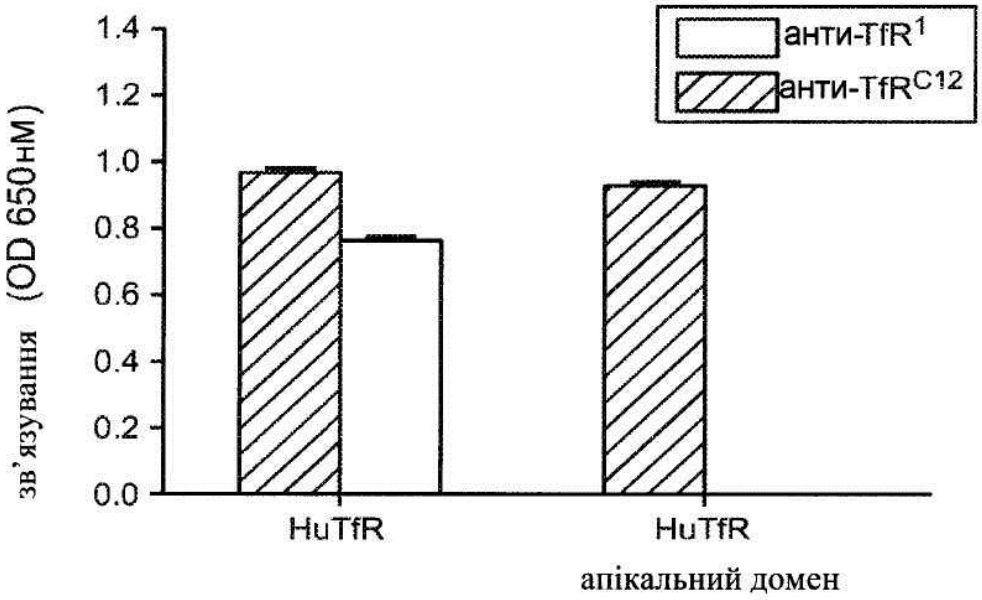
CDR H2 - Contact
CDR H2 - Chothia
CDR H2 -контакт

номер Kabat	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
hu15G11.v5 (TfR1)	Q	R	L	E	W	I	G	E	I	N	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	R	A	T	L	T	V	D	K	S	A	S	T	A	Y	M	E	L	S
hu15G11.52A	Q	R	L	E	W	I	G	E	I	A	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	R	A	T	L	T	V	D	K	S	A	S	T	A	Y	M	E	L	S
hu15G11.53A	Q	R	L	E	W	I	G	E	I	N	P	A	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	R	A	T	L	T	V	D	K	S	A	S	T	A	Y	M	E	L	S
hu15G11.92A (TfR2)	Q	R	L	E	W	I	G	E	I	N	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	R	A	T	L	T	V	D	K	S	A	S	T	A	Y	M	E	L	S

CDR H3 - Contact
CDRH3 - Chothia
CDR H3 -контакт

номер Kabat	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
hu15G11.v5 (TfR1)	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S
hu15G11.52A	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S
hu15G11.53A	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S
hu15G11.92A (TfR2)	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S

Фіг. 24B



Фіг. 25

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

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

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