



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122390** (13) **C2**  
(51) МПК (2020.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2016 11832**

(22) Дата подання заявки: **27.04.2015**

(24) Дата, з якої є чинними  
права інтелектуальної  
власності: **11.11.2020**

(31) Номер попередньої  
заявки відповідно до  
Паризької конвенції: **61/984,160**

(32) Дата подання  
попередньої заявки  
відповідно до  
Паризької конвенції: **25.04.2014**

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

(41) Публікація відомостей  
про заявку: **10.08.2017, Бюл.№ 15**

(46) Публікація відомостей  
про державну  
реєстрацію: **10.11.2020, Бюл.№ 21**

(86) Номер та дата  
подання міжнародної  
заявки, поданої  
відповідно до  
Договору РСТ **PCT/EP2015/059050,  
27.04.2015**

(72) Винахідник(и):

**Гьотш Ліліан (FR),  
Брусса Маттьйо (FR),  
Бо-Ларвор Шарлотт (FR),  
Шампйон Тьєррі (FR),  
Робер Ален (FR)**

(73) Володілець (володільці):

**ПЬЄР ФАБР МЕДІКАМЕНТ,  
45, Place Abel Gance, F-92100 Boulogne-  
Billancourt, France (FR)**

(74) Представник:

**Новікова Лідія Аркадіївна, реєстр. №36**

(56) Перелік документів, взятих до уваги  
експертизою:

WO 2008079849 A2, 03.07.2008  
WO 2011117330 A1, 29.09.2011  
Bitelman Connie et al. IGF1R-directed  
targeted therapy enhances the cytotoxic effect  
of chemotherapy in endometrial cancer.  
Cancer letters, 2013, vol. 335, no. 1, p. 153 -  
159  
Masahiro Ohtani et al. Mechanisms of  
antibody-mediated insulin-like growth factor I  
receptor (IGF-IR) down-regulation in MCF-7  
breast cancer cell. Bioscience trends, 2009,  
vol. 3, no. 4, p. 131 - 138

**(54) ІНТЕРНАЛІЗОВАНЕ МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО, ЩО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З ЛЮДСЬКИМ РЕЦЕПТОРОМ ІНСУЛІНОПОДІБНОГО ФАКТОРА РОСТУ (IGF-1R)**

(57) Реферат:

Винахід стосується інтерналізованого моноклонального антитіла, що зв'язується з людським рецептором інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF-1R), кон'югату антитіло-лікарський засіб для лікування раку, експресуючого IGF-1R, фармацевтичної композиції, що містить таке антитіло, для доставки лікарського засобу або медикаменту до ракової клітини, що експресує IGF-1R, а також мишачої гібридоми, депонованої в CNCM під номером I-4757, для одержання даного антитіла.

UA 122390 C2



Даний винахід відноситься до нового антитіла, зокрема, до моноклонального антитіла, яке здатне зв'язуватися з IGF-1R, а також до аміно- і нуклеїновокислотних послідовностей, що кодують зазначене антитіло. В одному з аспектів даний винахід відноситься до нового антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, яке здатне зв'язуватися з IGF-1R і, індукуючи інтерналізацію IGF-1R, інтерналізуватися клітиною. Даний винахід також включає застосування зазначеного антитіла як адресуючого продукту або переносника у кон'югації з іншими протираковими сполуками, такими як токсини, радіоактивні елементи або лікарські засоби, а також застосування їх для лікування деяких видів раку.

Рецептор інсуліноподібного фактора росту 1, званий IGF-1R (також званий IGF1R або IGF-IR), є рецептором з тирозинкіназною активністю, що має 70% гомологію з рецептором інсуліну IR. IGF-1R є глікопротеїном з молекулярною масою приблизно 350000. Це гетеротетрамерний рецептор, у якого кожна з половин, зв'язаних дисульфідними містками, складається з позаклітинної  $\alpha$ -субодиниці і трансмембранної  $\beta$ -субодиниці. IGF-1R зв'язує IGF1 і IGF2 з дуже високою афінністю ( $K_d$  1 nM), але в рівній мірі здатний зв'язуватися з інсуліном з афінністю, яка у 100-1000 разів нижче. І навпаки, IR зв'язує інсулін з дуже високою афінністю, хоча IGF зв'язуються лише з рецептором інсуліну з афінністю, яка у 100 разів нижче. Тирозинкіназні домени IGF-1R і IR мають дуже високу міру гомології послідовностей, хоча зони слабкішої гомології, відповідно, зачіпають багаті цистеїном області, розташовані в  $\alpha$ -субодиниці і в С-кінцевій частині  $\beta$ -субодиниці. Відмінності послідовностей, спостережувані в  $\alpha$ -субодиниці, розташовані в зоні зв'язування лігандів і, отже, формують відносну афінність IGF-1R і IR відносно IGF і інсуліну, відповідно. Відмінності у С-кінцевій частині  $\beta$ -субодиниці приводять до розбіжності у сигнальних шляхах двох рецепторів; IGF-1R опосередкує мітогенні, диференціювальні і антиапоптотичні ефекти, тоді як активація IR головним чином включає вплив на рівні метаболічних шляхів.

Цитоплазматичні тирозинкіназні білки активуються шляхом зв'язування ліганду з позаклітинним доменом рецептора. Активація кіназ, у свою чергу, включає стимуляцію різних внутрішньоклітинних субстратів, у тому числі IRS-1, IRS-2, Shc і Grb 10. Двома основними субстратами IGF-1R є IRS і Shc, які опосередковують (шляхом подальшої активації численних ефекторів) більшість ефектів росту і диференціювання, пов'язаних з приєднанням IGF до цього рецептора. Отже, наявність субстратів може диктувати кінцевий біологічний ефект, пов'язаний з активацією IGF-1R. Коли переважає IRS-1, клітини мають тенденцію до проліферації і трансформації. Коли переважає Shc, клітини мають тенденцію до диференціювання. Мабуть, основним шляхом, що бере участь в ефектах захисту від апоптозу, є шлях фосфатидил-інозит-3-кіназ (PI 3-кіназ).

Роль системи IGF у канцерогенезі стала предметом інтенсивних досліджень протягом останніх десяти років. Це зацікавлення викликало відкриття того факту, що на додаток до своїх мітогенних і антиапоптотичних властивостей IGF-1R, мабуть, необхідний для створення і підтримки трансформованого фенотипу. Насправді, добре встановлено, що надекспресія або конститутивна активація IGF-1R приводить у великій кількості різних клітин до росту клітин незалежно від підкладки у середовищі, позбавленому фетальної бичачої сироватки, і до утворення пухлин у голих мишей. Це саме по собі не є унікальною властивістю, оскільки клітини можуть трансформуватися під впливом різних продуктів надекспресованих генів, включаючи велику кількість рецепторів факторів росту. Проте, вирішальне відкриття, яке наочно продемонструвало важливу роль, яку відіграє IGF-1R у трансформації, полягало в тому, що IGF-1R-клітини, в яких ген, що кодує IGF-1R, був інактивований, виявилися повністю резистентними до трансформації різними агентами, які зазвичай здатні трансформувати клітини, такими як білок E5 вірусу папіломи великої рогатої худоби, надекспресія EGFR або PDGFR, T-антиген SV-40, активований gas або комбінація цих двох останніх факторів.

IGF-1R експресується у великій різноманітності пухлин і пухлинних ліній, і IGF посилюють ріст пухлини при їх прикріпленні до IGF-1R. Інші аргументи на користь ролі IGF-1R у канцерогенезі походять з досліджень з використанням мишачих моноклональних антитіл, спрямованих проти рецептора, або з використанням негативних доміант IGF-1R. Справді, мишачі моноклональні антитіла, спрямовані проти IGF-1R, інгібують проліферацію численних клітинних ліній в культурі і ріст пухлинних клітин *in vivo*. Також було показано, що негативна доміанта IGF-1R здатна інгібувати пухлинну проліферацію.

У такому контексті IGF-1R розглядався протягом довгого часу як цікава мішень в онкології. Для розробки антитіл проти IGF-1R для лікування ракових захворювань було розпочато велику кількість проектів, орієнтованих на IGF-1R (гуманізовані або людські антитіла або малі молекули), і було проведено більше 70 клінічних випробувань при різних показаннях. Проте, на сьогоднішній день жоден з цих проектів не був успішним, і на ринку немає антитіл проти IGF-1R

не дивлячись на часту надекспресію цієї мішені, описану у багатьох пацієнтів при великій різноманітності показань.

Крім того, був невдалим ряд клінічних випробувань із залученням анти-IGF-1R-антитіл у поєднанні з анти-EGFR-антитілами для націлювання як на рецептор епідермального фактора росту, так і на IGF-1R, оскільки жодне з цих антитіл не було здатне лікувати пацієнтів з мутацією KRAS.

Як наслідок, IGF-1R в даний час не розглядається як основна мішень, і при пошуку потенційних терапевтичних антитіл IGF-1R, мабуть, більше не викликає особливого інтересу.

Проте, слід також зазначити, що зусилля, спрямовані на створення IGF-1R-антитіл, були зосереджені на голих антитілах, тобто антитілах, використовуваних завдяки їх власним властивостям. У цьому сенсі IGF-1R розглядається як мішень, не відповідна для створення імунокон'югата, такого як кон'югат "антитіло - лікарський засіб" (згадуваний як "ADC"), оскільки IGF-1R описується як мішень, яка також широко експресується нормальними клітинами, зокрема, клітинами кровоносних судин. У цьому сенсі можна зазначити, що найостанніше IGF-1R-антитіло, тобто AVE1642, розроблене як голе антитіло, не озброєне лікарським засобом. Цей же процес знаходиться в даний час у процесі розробки з іншими антитілами проти IGF-1R і з усіма тими антитілами, які спіткала невдача у клінічних випробуваннях.

В одному з аспектів даний винахід має тенденцію до усунення цих проблем і описує анти-IGF-1R-антитіло, здатне зв'язуватися з IGF-1R певним чином, так що воно може бути використане для озброєння лікарським засобом. Конкретніше, даний винахід відноситься до IGF-1R-антитіла, що представляє особливі властивості, такі як те, що воно є ідеальним кандидатом для застосування в озброєному вигляді у контексті імунокон'югата.

У першому втіленні даний винахід відноситься до антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, який i) зв'язується з людським IGF-1R, і ii) інтерналізується після зв'язування із зазначеним людським IGF-1R.

Терміни "антитіло", "антитіла", "ab", "Ab" або "імуноглобулін" використовуються взаємозамінно в найширшому сенсі і включають моноклональні антитіла, ізольовані, інженерні, хімічно синтезовані або рекомбінантні антитіла (наприклад, повнорозмірні або інтактні моноклональні антитіла), поліклональні антитіла, полівалентні антитіла або мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла), а також фрагменти антитіл доти, доки вони виявляють потрібну біологічну активність. В одному втіленні даний винахід відноситься до рекомбінантного антитіла.

Конкретніше, така молекула складається з глікопротеїну, що містить щонайменше два важких (H) ланцюга і два легких (L) ланцюга, сполучених дисульфідними зв'язками. Кожний важкий ланцюг містить варіабельну область (або домен) важкого ланцюга (скорочену тут як HCVR або VH) і константну область важкого ланцюга. Константна область важкого ланцюга складається з трьох доменів, CH1, CH2 і CH3. Кожний легкий ланцюг містить варіабельну область легкого ланцюга (скорочену тут як LCVR або VL) і константну область легкого ланцюга. Константна область легкого ланцюга містить один домен, CL. Області VH і VL можна додатково підрозділити на області гіперваріабельності, звані ділянками, що визначають комплементарність (від англ. - complementarity determining region (CDR)), які чергуються з областями, що є більш консервативними, званими каркасними областями (framework region, FR). Кожна VH і VL складається з трьох CDR і чотирьох FR, розташованих у напрямі від аміно-кінця до карбокси-кінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варіабельні області важких і легких ланцюгів містять зв'язуючий домен, який взаємодіє з антигеном. Константні області антитіл можуть опосередковувати зв'язування імуноглобуліну з тканинами або факторами хазяїна, включаючи різні клітини імунної системи (наприклад, ефекторні клітини) і перший компонент (C1q) класичної системи комплементу.

Терміни "IGF-1R-зв'язуючий фрагмент" або "антигензв'язуючий фрагмент" антитіла згідно з винаходом позначають будь-який пептид, поліпептид або білок, що зберігає здатність зв'язуватися з мішенню (також зазвичай званою антигеном), як у зазначеного антитіла.

В одному втіленні такі "антигензв'язуючі фрагменти" вибрані з групи, що включає фрагменти Fv, scFv (sc означає "одноланцюговий"), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc або димерні антитіла або будь-який їх фрагмент, час напівжиття якого був збільшений шляхом хімічної модифікації, такої як додавання полі(алкілен)гліколю, такого як полі(етилен)гліколь ("ПЕГілювання") (пегільовані фрагменти називають Fv-ПЕГ, scFv-ПЕГ, Fab-ПЕГ, F(ab')<sub>2</sub>-ПЕГ або Fab'-ПЕГ) ("ПЕГ" означає полі(етилен)гліколь), або шляхом включення у ліпосому, при цьому зазначені фрагменти мають щонайменше одну з характерних CDR антитіла згідно з винаходом. Переважно, зазначені "антигензв'язуючі фрагменти" складатимуться або включатимуть часткову послідовність важкого або легкого варіабельного ланцюга антитіла, з якого вони отримані, при цьому

зазначена часткова послідовність є достатньою для збереження такої ж специфічності зв'язування, як і в антитіла, з якого вона отримана, і достатньої афінності по відношенню до мішені, переважно рівній щонайменше 1/100, у переважнішому варіанті щонайменше 1/10 від афінності антитіла, з якого вона отримана. Більш переважно зазначені "антигензв'язуючі фрагменти" складатимуться з або міститимуть щонайменше три CDR, CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3, важкого варіабельного ланцюга, і три CDR, CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3, легкого варіабельного ланцюга антитіла, з якого вони отримані.

Під терміном "зв'язування", "зв'язує" і т. п. мається на увазі, що антитіло або будь-який його антигензв'язуючий фрагмент утворює з антигеном комплекс, який відносно стабільний у фізіологічних умовах. Специфічне зв'язування можна охарактеризувати рівноважною константою дисоціації, яка складає щонайменше приблизно  $1 \times 10^{-6}$  М або менше. Способи визначення чи зв'язуються дві молекули, добре відомі в даній області і включають, наприклад, рівноважний діаліз, поверхневий плазмонний резонанс і т.п. Щоб уникнути сумнівів, це не означає, що зазначене антитіло не може зв'язувати або заважати, на низькому рівні, іншому антигену. Проте, як одне з втілень зазначене антитіло зв'язується лише з зазначеним антигеном.

Використовуваний в даному описі вираз "IGF-1R-антитіло" слід інтерпретувати як аналогічний виразу "антитіло проти IGF-1R", і він означає антитіло, здатне зв'язуватися з IGF-1R.

В одному втіленні даної заявки епітоп антитіла локалізується у позаклітинному домені людського IGF-1R (також званому IGF-1R ECD).

У конкретному втіленні зазначене антитіло або будь-який його антигензв'язуючий фрагмент здатний зв'язуватися з IGF-1R з  $EC_{50}$ , що знаходиться в діапазоні від  $10 \times 10^{-10}$  до  $1 \times 10^{-10}$ , і переважніше в діапазоні від  $8 \times 10^{-10}$  до  $2 \times 10^{-10}$  М.

У цьому сенсі термін " $EC_{50}$ " відноситься до 50% ефективної концентрації. Точніше, термін "половина максимальної ефективної концентрації" ( $EC_{50}$ ) відповідає концентрації лікарського засобу, антитіла або токсиканта, що індукує реакцію, що знаходиться на середині між базальним і максимальним рівнем після певного заданого часу експозиції. Він широко використовується як міра сили лікарського засобу. Таким чином,  $EC_{50}$  градуированої кривої "доза - відповідь" є концентрацією сполуки, за якої спостерігається 50% від її максимального ефекту.  $EC_{50}$  у квантовій кривій "доза - відповідь" є концентрацією сполуки, за якої 50% популяції демонструє відповідь після експозиції протягом вказаного часу. Значення концентрації, зазвичай, слідує сигмоподібній кривій, швидко зростаючи при порівняно невеликій зміні концентрації. Їх можна визначити математично шляхом виведення лінії найкращої відповідності.

У переважному втіленні  $EC_{50}$ , визначена в даному винаході, характеризується силою зв'язування антитіла з IGF-1R ECD, експонованим на пухлинних клітинах людини. Параметр  $EC_{50}$  визначають за допомогою аналізу FACS. Параметр  $EC_{50}$  відображає концентрацію антитіла, за якої виходить 50% від максимального зв'язування людського IGF-1R, експресованого на пухлинних клітинах людини. Кожне значення  $EC_{50}$  розраховували як середню точку кривої "доза - відповідь" за допомогою програми чотирипараметричної підгонки кривої регресії (Prism Software). Цей параметр було вибрано як репрезентативний для фізіологічних/патологічних станів.

Термін "епітоп" являє собою область антигена, яка зв'язується антигензв'язуючим білком, у тому числі антитілом. Епітопи можуть бути визначені як структурні або функціональні. Функціональні епітопи, зазвичай, є підгрупою структурних епітопів і мають ті залишки, які безпосередньо сприяють афінності взаємодії. Епітопи також можуть бути конформаційними, які складаються з нелінійних амінокислот, іншими словами, конформаційні епітопи складаються з непослідовних амінокислот. У деяких втіленнях епітопи можуть включати детермінанти, які є хімічно активними поверхневими угрупованнями молекул, такими як амінокислоти, бічні цукрові ланцюги, фосфорильні групи або сульфонільні групи, а також, в деяких втіленнях, вони можуть мати специфічні тривимірні структурні характеристики і/або специфічні характеристики заряду.

У конкретному втіленні даний винахід відноситься до способу вибору інтерналізованого антитіла або його інтерналізованого IGF-1R-зв'язуючого фрагмента, який зв'язується з людським рецептором інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF-1R) і інтерналізується після його зв'язування з IGF-1R, де зазначений спосіб включає етап вибору антитіла:

i) яке зв'язується з IGF-1R послідовності SEQ ID NO:52, і

ii) яке не зв'язується з IGF-1R послідовності SEQ ID NO:52 з амінокислотою у позиції 494 в SEQ ID NO:52, що відрізняється від гістидину, або з аспарагіною кислотою (ASP) у позиції 491, переважно, яке не зв'язується з IGF-1R послідовності SEQ ID NO:52 з амінокислотою, що відрізняється від гістидину, у позиції 494 в SEQ ID NO:52 і з аспарагіною кислотою (ASP) у

позиції 491.

У конкретнішому втіленні даний винахід відноситься до способу вибору інтерналізованого антитіла або його інтерналізованого IGF-1R-зв'язуючого фрагмента, який зв'язується з людським рецептором інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF-1R) і інтерналізується після його зв'язування з IGF-1R, де зазначений спосіб включає етапи:

1) вибору антитіла:

i) яке зв'язується з IGF-1R послідовності SEQ ID NO:52, і

ii) яке не зв'язується з IGF-1R послідовності SEQ ID NO:52 з амінокислотою у позиції 494 в SEQ ID NO:52, що відрізняється від гістидину, або з аспарагіною кислотою (ASP) у позиції 491, переважно, яке не зв'язується з IGF-1R послідовності SEQ ID NO:52 з амінокислотою, що відрізняється від гістидину, у позиції 494 в SEQ ID NO:52 і з аспарагіною кислотою (ASP) у позиції 491,

і потім з цих антитіл

2) вибору інтерналізованого антитіла або його IGF-1R-зв'язуючого фрагмента, відсоток інтерналізації якого після його зв'язування з IGF-1R складає щонайменше 40%, переважно щонайменше 50%, щонайменше 60%, щонайменше 70% або щонайменше 80%.

В іншому конкретному втіленні даний винахід відноситься до способу вибору інтерналізованого антитіла або його інтерналізованого IGF-1R-зв'язуючого фрагмента, який зв'язується з людським рецептором інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF-1R) і інтерналізується після його зв'язування з IGF-1R, де зазначений спосіб включає етапи:

1) вибору інтерналізованого антитіла або його IGF-1R-зв'язуючого фрагмента, відсоток інтерналізації якого після його зв'язування з IGF-1R складає щонайменше 40%, переважно щонайменше 50%, щонайменше 60%, щонайменше 70% або щонайменше 80%,

2) і потім вибір з цих антитіл такого антитіла:

i) яке зв'язується з IGF-1R послідовності SEQ ID NO:52, і

ii) яке не зв'язується з IGF-1R послідовності SEQ ID NO:52 з амінокислотою у позиції 494 в SEQ ID NO:52, що відрізняється від гістидину, або з аспарагіною кислотою (ASP) у позиції 491, переважно, яке не зв'язується з IGF-1R послідовності SEQ ID NO:52 з амінокислотою, що відрізняється від гістидину, у позиції 494 в SEQ ID NO:52 і з аспарагіною кислотою (ASP) у позиції 491.

У способі згідно з цим винаходом етап вибору антитіла за його характеристиками інтерналізації і зв'язування або не зв'язування з IGF-1R може бути виконаний у будь-якому порядку дотримання.

Відповідно до конкретного втілення цей винахід відноситься до інтерналізованого антитіла або його інтерналізованого IGF-1R-зв'язуючого фрагмента, який зв'язується з людським рецептором інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF-1R), наприклад, отриманому за допомогою одного з зазначених вище способів згідно з винаходом.

В іншому конкретному втіленні цей винахід відноситься до інтерналізованого антитіла або його інтерналізованого IGF-1R-зв'язуючого фрагмента, який зв'язується з людським рецептором інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF-1R) послідовності SEQ ID NO:52 і інтерналізується після його зв'язування з IGF-1R, і який не зв'язується з IGF-1R послідовності SEQ ID NO:82 або 92, переважно SEQ ID NO:82 і 92.

Для антитіла згідно з даним винаходом SEQ ID NO:52 відповідає амінокислотній послідовності людського рецептора IGF-1R, в якій є гістидин у позиції 494, тобто IGF-1R дикого типу, тоді як SEQ ID NO:82 відповідає мутантній амінокислотній послідовності людського рецептора IGF-1R, в якій є аргінін у позиції 494, а послідовність SEQ ID NO:92 відповідає мутантній амінокислотній послідовності людського рецептора IGF-1R, в якій є аланін у позиції 491.

У конкретнішому втіленні даний винахід відноситься до інтерналізованого антитіла або його інтерналізованого IGF-1R-зв'язуючого фрагмента, де епітоп зазначеного інтерналізованого антитіла містить амінокислоту гістидин у позиції 494 послідовності SEQ ID NO:52.

У конкретнішому втіленні даний винахід відноситься до інтерналізованого антитіла або його інтерналізованого IGF-1R-зв'язуючого фрагмента, де епітоп зазначеного інтерналізованого антитіла містить амінокислоту гістидин у позиції 494 послідовності SEQ ID NO:52, при цьому зазначений епітоп містить амінокислотну послідовність щонайменше з 8 амінокислот.

У конкретнішому втіленні даний винахід відноситься до інтерналізованого антитіла або його інтерналізованого IGF-1R-зв'язуючого фрагмента, де епітоп зазначеного інтерналізованого антитіла містить амінокислоту аспарагінову кислоту у позиції 491 послідовності SEQ ID NO:52, при цьому зазначений епітоп містить амінокислотну послідовність щонайменше з 8 амінокислот.

У конкретнішому втіленні даний винахід відноситься до інтерналізованого антитіла або його



- амінокислотну послідовність, ідентичну або таку, що демонструє щонайменше 80% ідентичність з амінокислотною послідовністю від амінокислоти у позиції 489 до амінокислоти у позиції 496 послідовності SEQ ID NO:52, і

5 - амінокислотну послідовність, ідентичну або таку, що демонструє щонайменше 80% ідентичність з амінокислотною послідовністю від амінокислоти у позиції 490 до амінокислоти у позиції 497 послідовності SEQ ID NO:52.

У конкретнішому втіленні цей винахід відноситься до інтерналізованого антитіла або його інтерналізованого IGF-1R-зв'язуючого фрагмента, де епітоп зазначеного інтерналізованого антитіла містить амінокислоту гістидин у позиції 494 і амінокислоту аспарагінову кислоту у позиції 491 послідовності SEQ ID NO:52, при цьому зазначений епітоп містить амінокислотну послідовність щонайменше з 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 амінокислот.

У конкретнішому втіленні цей винахід відноситься до інтерналізованого антитіла або його інтерналізованого IGF-1R-зв'язуючого фрагмента, де епітоп зазначеного інтерналізованого антитіла містить амінокислоту гістидин у позиції 494 і амінокислоту аспарагінову кислоту у позиції 491 послідовності SEQ ID NO:52, при цьому зазначений епітоп містить амінокислотну послідовність щонайменше з 8 амінокислот, де зазначений епітоп містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що включає:

20 - амінокислотну послідовність, ідентичну або таку, що демонструє щонайменше 80% ідентичність з амінокислотною послідовністю від амінокислоти у позиції 487 до амінокислоти у позиції 494 послідовності SEQ ID NO:52,

- амінокислотну послідовність, ідентичну або таку, що демонструє щонайменше 80% ідентичність з амінокислотною послідовністю від амінокислоти у позиції 488 до амінокислоти у позиції 495 послідовності SEQ ID NO:52,

25 - амінокислотну послідовність, ідентичну або таку, що демонструє щонайменше 80% ідентичність з амінокислотною послідовністю від амінокислоти у позиції 489 до амінокислоти у позиції 496 послідовності SEQ ID NO:52,

- амінокислотну послідовність, ідентичну або таку, що демонструє щонайменше 80% ідентичність з амінокислотною послідовністю від амінокислоти у позиції 490 до амінокислоти у позиції 497 послідовності SEQ ID NO:52, і

30 - амінокислотну послідовність, ідентичну або таку, що демонструє щонайменше 80% ідентичність з амінокислотною послідовністю від амінокислоти у позиції 491 до амінокислоти у позиції 498 послідовності SEQ ID NO:52.

В іншому конкретному втіленні даний винахід відноситься до інтерналізованого антитіла або його інтерналізованого IGF-1R-зв'язуючого фрагмента, який зв'язується з людським рецептором інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF-1R) послідовності SEQ ID NO:52 і інтерналізується після його зв'язування з IGF-1R, і який не зв'язується з IGF-1R послідовності SEQ ID NO:82, або де епітоп зазначеного інтерналізованого антитіла містить амінокислоту гістидин у позиції 494 і/або амінокислоту аспарагінову кислоту у позиції 491 в SEQ ID NO:52, де відсоток інтерналізації зазначеного антитіла після його зв'язування з IGF-1R складає щонайменше 40%, щонайменше 50%, щонайменше 60%, щонайменше 70% або щонайменше 80%. Відсоток інтерналізації антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента може бути визначений будь-яким способом, відомим фахівцеві в даній області, таким як, наприклад, спосіб, описаний в даному документі.

У конкретному втіленні даний винахід відноситься до інтерналізованого антитіла або його інтерналізованого IGF-1R-зв'язуючого фрагмента згідно з винаходом, де зазначена амінокислота у позиції 494 послідовності SEQ ID NO:52, що відрізняється від гістидину, є аргініном (SEQ ID NO:82).

У конкретному втіленні даний винахід відноситься до інтерналізованого антитіла або його інтерналізованого IGF-1R-зв'язуючого фрагмента згідно з винаходом, де зазначена амінокислота у позиції 491 SEQ ID NO:52, що відрізняється від аспарагінової кислоти, є аланіном (SEQ ID NO:92).

Відповідно до одного з втілень даний винахід відноситься до антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, який зв'язується з людським рецептором інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF-1R) і який інтерналізується після його зв'язування з IGF-1R, де зазначене антитіло вибране з наступних:

55 i) антитіло, що містить три CDR важкого ланцюга з CDR-H2 послідовності SEQ ID NO:2 і CDR-H3 послідовності SEQ ID NO:3, і три CDR легкого ланцюга з CDR-L2 послідовності SEQ ID NO:5;

ii) антитіло, яке конкурує за зв'язування з IGF-1R з антитілом i); а також

iii) антитіло, яке зв'язується з тим самим епітопом IGF-1R, з яким зв'язується антитіло i).

60 Конкуренцію за зв'язування з IGF-1R можна визначити будь-якими способами або



методиками, відомими фахівцям в даній області, такими як, але не обмежуючись ними, радіоактивність, Віасоре, ELISA (ІФА), проточна цитометрія і т.д., або відповідно до способу, описаного в даному документі.

Зв'язування з одним і тим же епітопом можна визначити будь-якими способами або методиками, відомими фахівцям в даній області, такими як, але не обмежуючись ними, радіоактивність, Віасоре, ELISA (ІФА), проточна цитометрія і т.д., або відповідно до способу, описаного в даному документі.

Як згадувалося вище, і на відміну від загальних знань даний винахід сфокусовано на специфічних антитілах проти IGF-1R, що представляють високу здатність бути інтерналізованими після зв'язування з IGF-1R. Використовуване в даному документі антитіло, яке "інтерналізоване", є таким антитілом, яке захоплюється клітиною (тобто воно "входить" у клітину) після зв'язування з IGF-1R на клітині ссавця. Таке антитіло цікаве як один з компонентів імунно-лікарських кон'югатів тим, що воно адресує або спрямовує зв'язаний цитотоксичний агент у клітини-мішені, переважно ракові клітини. Будучи інтерналізованим, цитотоксичний агент викликає загибель ракових клітин.

Переважно всі антитіла згідно з даним винаходом представляють ті самі послідовності для CDR-H2, CDR-H3 і CDR-L2, решта 3 CDR відрізняються. Це спостереження здається зрозумілим, оскільки є частиною загальних знань, що стосуються специфічності зв'язування антитіла, при цьому CDR-H3 описується як найбільш важливий і найбільш причетний до розпізнавання епітопу.

Важливими ключами до успіху терапії імункон'югатами вважаються специфічність "антиген - мішень" і інтерналізація комплексів антигензв'язуючих білків раковими клітинами. Очевидно, що антигени, що не інтерналізуються, є менш ефективними, ніж антигени, що інтерналізуються, під час доставки цитостатичних агентів. Процеси інтерналізації відрізняються серед антигенів і залежать від безлічі параметрів, які можуть знаходитися під впливом антитіл.

У імункон'югаті цитотоксичний агент несе цитотоксичну активність, а використовуване антитіло несе специфічність відносно ракових клітин, як і вектор для входу в клітини для правильної адресації цитотоксичного агента. Таким чином, щоб поліпшити імункон'югат, антитіло може мати високу здатність до інтерналізації цільовими раковими клітинами. Ефективність, з якою антитіло опосередковує інтерналізацію, значно відрізняється залежно від цільового епітопу. Вибір потужних інтерналізуючих антитіл проти IGF-1R потребує різних експериментальних даних, що вивчають не лише понижуючу регуляцію IGF-1R, а й подальшу інтерналізацію антитіла проти IGF-1R клітинами.

В одному з втілень інтерналізацію антитіла згідно з винаходом можна оцінити за допомогою імунofлуоресценції (як проілюстровано далі в даній заявці) або будь-якого способу або процесу, відомого фахівцям у даній області, специфічного для даного механізму інтерналізації.

Комплекс IGF-1R/антитіло інтерналізується після зв'язування антитіла з ECD зазначеного IGF-1R, індукується зменшення кількості IGF-1R на поверхні клітин. Це зменшення можна кількісно оцінити будь-яким способом, відомим фахівцям в даній області, наприклад, але не обмежуючись ними, вестерн-блотом, FACS, імунofлуоресценцією і т.п.

В одному з втілень це зменшення, що відображає таким чином інтерналізацію, можна переважно виміряти за допомогою FACS і виразити як різницю або дельту між середньою інтенсивністю флуоресценції (Mean Fluorescence Intensity, MFI), виміряної при 4 °C, і MFI, виміряної при 37 °C, після 4 годин інкубації з антитілом.

Як необмежуючий приклад ця дельта визначається на основі MFI, отриманих з необробленими клітинами і з клітинами, обробленими антитілом, з використанням i) клітин раку молочної залози MCF7 після 4-годинного періоду інкубації з антитілом, описаним в даному документі і ii) вторинного антитіла, міченого Alexa 488. Цей параметр розраховується за наступною формулою:  $\Delta(MFI_{4^{\circ}C} - MFI_{37^{\circ}C})$ .

Ця різниця між значеннями MFI відображає знижувальну регуляцію IGF-1R, оскільки значення MFI пропорційні IGF-1R, експресованому на поверхні клітини.

У переважному аспекті антитіла або будь-який з їхніх антигензв'язуючих фрагментів складаються з моноклональних антитіл, що дають  $\Delta(MFI_{4^{\circ}C} - MFI_{37^{\circ}C})$  на клітинах MCF7 щонайменше 280, переважно щонайменше 400.

Детальніше, згадана вище дельта може бути виміряна відповідно до наступного процесу, який повинен розглядатися як ілюстративний і необмежуючий приклад:

а) обробка і інкубація пухлинних клітин, що становлять інтерес, антитілом згідно з винаходом або у холодному (4 °C), або у теплом (37 °C) повному культуральному середовищі;

б) паралельна обробка вторинними антитілами клітин, оброблених на етапі а), і необроблених клітин,

с) вимірювання MFI (показує кількість IGF-1R, присутнього на поверхні) для оброблених і необроблених клітин за допомогою вторинного міченого антитіла, здатного зв'язуватися з антитілом згідно з даним винаходом, і

5 д) розрахунок дельти шляхом віднімання MFI, отриманої з обробленими клітинами, від MFI, отриманої з необробленими клітинами.

З цієї дельти MFI відсоток інтерналізації може бути визначений як:  $100 \times (MFI_{4^\circ C} - MFI_{37^\circ C}) / MFI_{4^\circ C}$ .

Антитіла або будь-які з їхніх антигензв'язуючих фрагментів згідно з винаходом присутні на MCF7 з відсотком інтерналізації, який складає від 70% до 90%, переважно від 75% до 87%.

10 Особлива перевага антитіл, описаних в даному документі, основана на швидкості їх інтерналізації.

Загальновідомо, що для імунокон'югата бажано, щоб використовувані антитіла демонстрували високу швидкість інтерналізації, переважно протягом 24 годин з моменту введення антитіла *in vivo*, і переважніше протягом 12 годин, ще переважніше протягом 6 годин.

15 У даному винаході швидкість інтерналізації, також визначувана як зменшення кількості антитіла, зв'язаного з поверхнею клітини, або як розпад антитіла на клітинній поверхні, виражається як  $t_{1/2}$  (період напівжиття) і відповідає часу, який необхідний для отримання зменшення  $\Delta MFI$  на 50% (цей аспект буде чітко зрозумілий у зв'язку з подальшими прикладами).

20 Особливою перевагою є те, що антитіла згідно з винаходом мають  $t_{1/2}$  від 5 до 25 хвилин, і переважно від 10 до 20 хвилин.

Конкретне втілення даного винаходу відноситься до антитіла, що містить три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:1, 2 і 3, і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:4, 5 і 6.

25 Одним з втілень є антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, що містить три CDR важкого ланцюга, які містять або складаються з послідовностей SEQ ID NO:1, 2 і 3 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:1, 2 і 3; і три CDR легкого ланцюга, які містять або складаються з послідовностей SEQ ID NO:4, 5 і 6 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:4, 5 і 6.

В іншому втіленні антитіло або будь-який його антигензв'язуючий фрагмент містить три CDR важкого ланцюга, які містять або складаються з послідовностей SEQ ID NO:1, 2 і 3; і три CDR легкого ланцюга, які містять або складаються з послідовностей SEQ ID NO:4, 5 і 6.

35 Під "CDR-областями" або "CDR" розуміють гіперваріабельні області важких і легких ланцюгів імуноглобулінів, визначені згідно IMGT.

Унікальна нумерація IMGT була створена для порівняння варіабельних доменів незалежно від антигенного рецептора, типу ланцюга або вигляду [Fefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Fefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Fefranc, M.-P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, F., Thouvenin-Contet, V. and Fefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. В унікальній нумерації IMGT консервативні амінокислоти завжди мають одну й ту ж позицію, наприклад, цистеїн 23 (1st-CYS), триптофан 41 (CONSERVED-TRP), гідрофобна амінокислота 89, цистеїн 104 (2nd-CYS), фенілаланін або триптофан 118 (J-PHE або J-TRP). Унікальна нумерація IMGT пропонує стандартизоване розмежування каркасних областей (FR1-IMGT: позиції з 1 по 26, FR2-IMGT: з 39 по 55, FR3-IMGT: з 66 по 104 і FR4-IMGT: з 118 по 128) і областей, що визначають комплементарність: CDR1-IMGT: з 27 по 38, CDR2-IMGT: з 56 по 65, і CDR3-IMGT: з 105 по 117. Оскільки проміжки представляють незайняті позиції, довжини CDR-IMGT (показані в дужках і розділені крапками, наприклад [8.8.13]) стають важливою інформацією. Унікальна нумерація IMGT використовується у 2D-графічних зображеннях, як описано в Colliers de Perles [Ruiz, M. and Fefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Fefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], і у 3D-структурах в IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Необхідно розуміти, що, без протиріччя опису в даному документі, області, що визначають комплементарність, або CDR, позначають гіперваріабельні області важких і легких ланцюгів імуноглобулінів, як вони визначені згідно з системою нумерації IMGT.

60 Проте, CDR також можуть бути визначені згідно з системою нумерації Кабат (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5<sup>th</sup> Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, і пізніші видання). Існує три CDR важкого ланцюга, і три CDR легкого ланцюга. Термін "CDR" в єдиному числі або у множині застосовується тут для позначення, залежно від випадку, однієї або більше або навіть всіх цих областей, які містять більшість

амінокислотних залишків, відповідальних за афінність зв'язування антитіла з антигеном або епітопом, який воно розпізнає. Щоб спростити читання даної заявки, CDR згідно Kabat не визначені. Проте, для фахівця в даній області було б очевидним використовувати визначення CDR згідно IMGT, щоб визначити CDR відповідно до Kabat.

5 У контексті даного винаходу "відсоток ідентичності" двох послідовностей нуклеїнових кислот або амінокислот означає відсоток ідентичних нуклеотидів або амінокислотних залишків у двох порівнюваних послідовностях, отриманий після оптимального вирівнювання, при цьому даний відсоток є чисто статистичним, і відмінності між цими двома послідовностями розподілені випадковим чином за їх довжиною. Порівняння двох нуклеїновокислотних або амінокислотних  
10 послідовностей традиційно проводиться шляхом порівняння послідовностей після їх оптимального вирівнювання, при цьому зазначене порівняння можна проводити по сегментах або за допомогою "вікна вирівнювання". Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння може бути здійснене, окрім порівняння вручну, за допомогою алгоритму локальної гомології Сміта і Вотермана (1981) [Ad. App. Math. 2:482], за допомогою алгоритму локальної гомології Нідлмана і Вунша (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], за допомогою способу пошуку схожості Пірсона і Ліпмана (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] або за допомогою комп'ютерного програмного забезпечення з використанням цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA і TFASTA у Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Медисон, Вісконсін, або за допомогою програмного забезпечення для порівняння BLAST NR або BLAST  
20 P).

Відсоткова ідентичність двох нуклеїновокислотних або амінокислотних послідовностей визначається шляхом порівняння двох оптимально вирівняних послідовностей, в яких порівнювана нуклеїновокислотна або амінокислотна послідовність може мати додавання або делеції в порівнянні з референсною послідовністю для оптимального вирівнювання двох  
25 послідовностей. Відсоткова ідентичність розраховується шляхом визначення числа позицій, в яких амінокислоти, нуклеотиди або залишки ідентичні у двох послідовностях, переважно у двох повних послідовностях, ділення числа ідентичних позицій на загальне число позицій у вікні вирівнювання і множення результату на 100 для отримання відсоткової ідентичності двох послідовностей.

Наприклад, програма BLAST "BLAST 2 sequences" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol, 1999, Lett. 174:247-250), доступна на сайті <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, може бути використана з параметрами за умовчанням (зокрема, з параметрами "штраф за відкриття делеції": 5 і "штраф за подовження делеції": 2; вибраною матрицею буде, наприклад, матриця "BLOSUM 62", запропонована в програмі); відсоткова ідентичність двох послідовностей для порівняння розраховується безпосередньо програмою.

Для амінокислотної послідовності, що демонструє ідентичність з референсною амінокислотною послідовністю щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98%, переважні приклади включають ті, які містять референсну послідовність, певні модифікації, зокрема делеції, додавання або заміни щонайменше однієї амінокислоти, зрізання або подовження. У разі заміни однієї або більше послідовних або непослідовних амінокислот переважними є ті заміни, при яких заміщувані амінокислоти замінюються "еквівалентними" амінокислотами. В даному випадку вираз "еквівалентні амінокислоти" застосовується для позначення будь-яких амінокислот, які можуть замінити одну з структурних амінокислот без зміни біологічної  
45 активності відповідних антитіл, а також тих конкретних прикладів, які наведені нижче.

Еквівалентні амінокислоти можуть бути визначені або за їх структурною гомологією з амінокислотами, які вони заміщатимуть, або за результатами порівняльних тестів біологічної активності різних антитіл, які можуть бути отримані.

Як необмежуючий приклад, в таблиці 1 нижче приведені можливі заміщення, які можуть бути  
50 проведені без значної зміни біологічної активності відповідного модифікованого антигензв'язуючого білка; зворотні заміни, природно, можливі за тих же умов.

Таблиця 1

Первинний залишок	Заміна(и)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser

Таблиця 1

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

Конкретним аспектом даного винаходу є те, що дане антитіло або будь-який його антигензв'язуючий фрагмент не зв'язується з рецептором інсуліну (IR). Цей аспект являє інтерес, оскільки антитіло, описане в даному документі, не матиме жодного негативного впливу на IR, тобто на метаболізм інсуліну.

В іншому втіленні ще одним переважним аспектом антитіла згідно з винаходом є те, що воно здатне зв'язуватися не лише з людським IGF-1R, але також з IGF-1R мавпи і, конкретніше, з IGF-1R яванського макака. Цей аспект також представляє інтерес, оскільки він полегшуватиме випробування токсичності і клінічні випробування.

В іншому втіленні антитіло згідно з даним винаходом складається з моноклонального антитіла.

Термін "моноклональне антитіло" або "МКА" ("Mab"), використовуваний в цьому документі, відноситься до антитіла, отриманого з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла цієї популяції є ідентичними за винятком можливих мутацій, що зустрічаються у природі, які можуть бути присутні в незначних кількостях. Моноклональні антитіла є високо специфічними, будучи спрямованими проти одного епітопа. Таке моноклональне антитіло може бути отримане за допомогою одного клону В-клітин або за допомогою гібридом. Моноклональні антитіла також можуть бути рекомбінантними, тобто отриманими шляхом білкової інженерії. Моноклональні антитіла також можуть бути виділені з фагових бібліотек антитіл. Крім того, на відміну від препаратів поліклональних антитіл, які зазвичай включають різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант, або епітопів, кожне моноклональне антитіло спрямоване проти одного епітопа антигена. Винахід відноситься до антитіла, виділеного або отриманого шляхом очищення з природних джерел або отриманого за допомогою генетичної рекомбінації або хімічного синтезу.

В одному втіленні моноклональне антитіло згідно з даним винаходом включає мишаче, химерне і гуманізоване антитіло, описане нижче.

Антитіло може бути отримане з гібридами мишачого походження, збереженої у Французькій колекції культур мікроорганізмів (CNCM, Інститут Пастера, Париж, Франція), при цьому зазначену гібридому отримують шляхом злиття спленоцитів/лімфоцитів від імунізованих мишей BALB/C і клітин мієломної клітинної лінії Sp2/O-Ag14.

В іншому втіленні антитіло згідно з даним винаходом складається з рекомбінантного антитіла. Термін "рекомбінантне антитіло" відноситься до антитіла, яке є результатом експресії рекомбінантної ДНК у живих клітинах. Рекомбінантне антитіло згідно з даним винаходом отримують з використанням лабораторних способів генетичної рекомбінації, добре відомих фахівцям в даній області, шляхом створення ДНК-последовностей, яких немає в біологічних організмах.

В іншому втіленні антитіло згідно з даним винаходом складається з хімічно синтезованого антитіла.

В одному з втілень антитіло проти IGF-1R згідно з даним винаходом складається з мишачого антитіла, також позначуваного як m[назва антитіла].

В одному з втілень антитіло проти IGF-1R згідно з даним винаходом складається з химерного антитіла, також позначуваного як c[назва антитіла].

В одному з втілень антитіло проти IGF-1R згідно з даним винаходом складається з гуманізованого антитіла, також позначуваного як hz[назва антитіла].

Щоб уникнути сумнівів, у наступному описі вираз "IGF-1R-антитіло" і "[назва антитіла]" є аналогічними і включають (без протиріччя опису) мишачі, химерні і гуманізовані варіанти зазначеного IGF-1R-антитіла і зазначеного "[назва антитіла]"-антитіла. За необхідності використовується префікс m - (мишаче), c - (химерне) або hz - (гуманізоване).

В іншому втіленні антитіло згідно з даним винаходом вибране серед наступних:

- а) антитіло, що містить три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3, і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11;
- б) антитіло, що містить три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3, і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:10, 5 і 11;
- с) антитіло, що містить три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3, і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 12; і
- д) антитіло, що містить три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:8, 2 і 3, і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11.

Для більшої ясності наступна таблиця 2 ілюструє послідовності CDR, визначені згідно IMGT, для переважних антитіл.

Таблиця 2

	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID NO
Консенсусна	CDR-H1		1
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	4
		CDR-L2	5
		CDR-L3	6
208F2	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11
212A11	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	10
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11
214F8 & 213B10	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	12
219D6	CDR-H1		8
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11

Фахівцеві в цій області буде ясно видно, що будь-яку комбінацію цих шести CDR, описаних вище, слід розглядати як частину цього винаходу.

Як можна бачити в таблиці 2, усі антитіла, описані в таблиці, мають одні й ті ж послідовності для CDR-H2, CDR-H3 і CDR-L2, причому ця властивість представляє особливий інтерес, як описано вище.

Конкретний аспект відноситься до мишачого (m) антитіла або будь-якого з його антигензв'язуючих фрагментів, які характеризуються тим, що зазначене антитіло також містить

константні області легкого ланцюга і важкого ланцюга, отримані з антитіла виду, гетерологічного по відношенню до миші, зокрема, з людського антитіла.

Інший конкретний аспект відноситься до химерного (с) антитіла або будь-якого з його антигензв'язуючих фрагментів, які характеризуються тим, що зазначене антитіло також містить константні області легкого ланцюга і важкого ланцюга, отримані з антитіла виду, гетерологічного по відношенню до миші, зокрема, з людського антитіла.

В одному втіленні цього винаходу антитіло складається з химерного антитіла.

Химерне антитіло є антитілом, що містить природну варіабельну область (легкого ланцюга і важкого ланцюга), отриману з антитіла цього виду, у поєднанні з константними областями легкого ланцюга і важкого ланцюга з антитіла іншого виду, гетерологічного по відношенню до зазначеного даного виду.

Антитіла або їх химерні фрагменти можуть бути отримані з використанням методик рекомбінантної генетики. Наприклад, химерне антитіло може бути отримане шляхом клонування рекомбінантної ДНК, що містить промотор і послідовність, що кодує варіабельну область нелюдського моноклонального антитіла згідно з винаходом, зокрема мишачого, і послідовність, що кодує константну область людського антитіла. Химерне антитіло відповідно до даного винаходу, яке кодується одним з таких рекомбінантних генів, може бути, наприклад, химерою "миша - людина", при цьому специфічність цього антитіла визначається варіабельною областю, отриманою з мишачої ДНК, а його ізотип визначається константною областю, отриманою з людської ДНК.

У переважному, але не обмежуючому втіленні антитіло згідно з даним винаходом вибране серед наступних:

а) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:13 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80% ідентичність з SEQ ID NO:13, і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11;

б) антитіло, що містить (чи складається з) варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:14 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:14, і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:10, 5 і 11;

с) антитіло, що містить (чи складається з) варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:15 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:15, і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 12;

д) антитіло, що містить (чи складається з) варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:16 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:16, і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11;

е) антитіло, що містить (чи складається з) варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:17 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:17, і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 12.

Під "будь-якою послідовністю, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:13-17" слід розуміти, відповідно, послідовність, що демонструє три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:1, 2 і 3 і, крім того, що демонструє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з повною послідовністю SEQ ID NO:13-17 поза послідовностями, відповідних CDR (тобто SEQ ID NO:1, 2 і 3), де під виразом "поза послідовностями, відповідних CDR" слід розуміти "виключаючи послідовності, відповідні CDR".

У іншому переважному, але не обмежуючому втіленні антитіло згідно з даним винаходом вибране серед наступних:

а) антитіло, що містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:18 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:18, і три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3;

б) антитіло, що містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:19 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:19, і три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3;

с) антитіло, що містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:20 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:20, і три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3;

д) антитіло, що містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:21

або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:21, і три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:8, 2 і 3; і

е) антитіло, що містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:22 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:22, і три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3.

Під "будь-якою послідовністю, що демонструє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:18-22", слід розуміти послідовності, що демонструють три CDR легкого ланцюга SEQ ID NO:4, 5 і 6 і, крім того, що демонструють щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з повною послідовністю SEQ ID NO:18-22 поза послідовностями, відповідних CDR (тобто SEQ ID NO:4, 5 і 6).

Одне з втілень згідно з даним винаходом відноситься до антитіла, вибраного серед наступних:

а) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:13 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:13, і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:18 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:18;

б) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:14 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:14, і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:19 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:19;

с) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:15 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:15, і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:20 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:20;

д) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:16 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:16, і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:21 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:21; і

е) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:17 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:17, і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:22 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:22.

Химерні антитіла, описані в даному документі, також можуть характеризуватися константним доменом, і, конкретніше, зазначені химерні антитіла можуть бути вибрані або сконструйовані як IgG1, IgG2, IgG3, IgM, IgA, IgD або IgE, але не обмежуючись ними. Переважніше у контексті цього винаходу зазначені химерні антитіла є IgG1 або IgG4.

Одне з втілень згідно з даним винаходом відноситься до химерного антитіла, що містить варіабельні домени VH і VL, описані вище, у форматі IgG1. Переважніше, зазначене химерне антитіло містить константний домен для VH-послідовності SEQ ID NO:43 і каппа-домен для VL-послідовності SEQ ID NO:45.

Одне з втілень згідно з даним винаходом відноситься до химерного антитіла, що містить варіабельні домени VH і VL, описані вище, у форматі IgG4. Переважніше, зазначене химерне антитіло містить константний домен для VH-послідовності SEQ ID NO:44 і каппа-домен для VL-послідовності SEQ ID NO:45.

У іншому переважному, але не обмежуючому втіленні антитіло згідно з цим винаходом вибрано серед наступних:

а) антитіло, що містить (чи складається з) важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:23 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:23, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:28 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:28;

б) антитіло, що містить (чи складається з) важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:24 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:24, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:29 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID

NO:29;

с) антитіло, що містить (чи складається з) важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:25 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:25, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:30 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:30;

д) антитіло, що містить (чи складається з) важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:26 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:26, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:31 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:31; і

е) антитіло, що містить (або складається з) важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:27 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:27, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:32 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:32.

Для більшої ясності таблиця 3 ілюструє послідовності VH і VL, відповідно, для переважних химерних антитіл.

Таблиця 3

	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID NO
c208F2	Варіабельний домен (VH)		13
		Варіабельний домен (VL)	18
	Повнорозмірна		23
		Повнорозмірна	28
c212A11	Варіабельний домен (VH)		14
		Варіабельний домен (VL)	19
	Повнорозмірна		24
		Повнорозмірна	29
c214F8	Варіабельний домен (VH)		15
		Варіабельний домен (VL)	20
	Повнорозмірна		25
		Повнорозмірна	30
c219D6	Варіабельний домен (VH)		16
		Варіабельний домен (VL)	21
	Повнорозмірна		26
		Повнорозмірна	31
c213B10	Варіабельний домен (VH)		17
		Варіабельний домен (VL)	22
	Повнорозмірна		27
		Повнорозмірна	32

Інший конкретний аспект даного винаходу відноситься до гуманізованого антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, що характеризується тим, що константні області легкого ланцюга і важкого ланцюга, отримані з людського антитіла, є, відповідно, областями лямбда або каппа і гамма-1, гамма-2 або гамма-4.

В одному з втілень даного винаходу антитіло складається з гуманізованого антитіла.

Під "гуманізованими антитілами" слід розуміти антитіла, які містять CDR-області, отримані з антитіла нелюдського походження, при цьому інші частини молекули антитіла отримані з одного (або декількох) людських антитіл. Крім того, деякі залишки сегментів скелета (звані FR) можуть бути змінені з метою збереження афінності зв'язування.

Гуманізовані антитіла або їх фрагменти можуть бути отримані за допомогою методик, відомих фахівцям в даній області. Такі гуманізовані антитіла є переважними для їх застосування у способах, використовуваних в діагностиці in vitro, або у профілактичному і/або терапевтичному лікуванні in vivo. Іншою методикою гуманізації, також відомою фахівцям в даній області, є, наприклад, методика "CDR-щеплення", описана PDL у патентах EP 0 451261, EP 0 682 040, EP 0 9127, EP 0 566 647 або US 5530101, US 6180370, US 5585089 і US 5693761. Також можна відзначити патенти US 5639641 або US 6054297, US 5886152 і US 5877293.



Як конкретне втілення цього винаходу і як буде пояснено детальніше в наступних прикладах, в даному документі описане антитіло, що складається з hz208F2. Така гуманізація також може бути застосована до частин інших антитіл згідно з даним винаходом.

У переважному втіленні антитіло згідно з даним винаходом містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH), що має:

- i) CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3, відповідно,
- ii) FR1, FR2 і FR3, отримані з IGHV1-46\*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO:46), і
- iii) FR4, отриманий з IGHJ4\*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO:48).

У переважному втіленні антитіло згідно з даним винаходом містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL), що має:

- i) CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11, відповідно,
- ii) FR1, FR2 і FR3, отримані з IGKV1-39\*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO:47), і
- iii) FR4, отримані з IGKJ4\*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO:49).

У переважному, але не обмежуючому втіленні згідно з даним винаходом антитіло містить:

а) важкий ланцюг, що має CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3, відповідно, і FR1, FR2 і FR3, отримані з IGHV1-46\*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO:46), і FR4, отриману з IGHJ4\*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO:48); і

б) легкий ланцюг, що має CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11, відповідно, і FR1, FR2 і FR3, отримані з IGKV1-39\*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO:47), і FR4, отриману з IGKJ4\*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO:49).

В одному втіленні антитіло згідно з даним винаходом містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH) послідовності SEQ ID NO:33 і варіабельний домен легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID NO:35. Зазначене гуманізоване антитіло називатиметься далі hz208F2 ("варіант" або "вар". 1).

В іншому втіленні антитіло згідно з даним винаходом містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH) послідовності SEQ ID NO:33, де зазначена послідовність SEQ ID NO:33 містить щонайменше 1 зворотну мутацію, вибрану серед залишків 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 і 95.

Під виразом "зворотна мутація" мається на увазі мутація або заміна людського залишку, присутнього в зародковій послідовності, відповідним залишком, що спочатку був присутній у мишачій послідовності.

В іншому втіленні антитіло згідно з даним винаходом містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH) послідовності SEQ ID NO:33, де зазначена послідовність SEQ ID NO:33 містить 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 або 17 зворотних мутацій, вибраних серед залишків 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 і 95.

Для більшої ясності в таблиці 4 показані переважні зворотні мутації.

Таблиця 4

Амінокислота №	20	34	35	38	48	50	59	61
Мишача	M	I	Y	K	L	W	K	N
Людська	V	M	H	R	M	I	S	A

Амінокислота №	62	70	72	74	76	77	79	82	95
Мишача	E	L	A	K	S	N	A	F	F
Людська	Q	M	R	T	T	S	V	E	Y

В одному з втілень антитіло згідно з даним винаходом містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID NO:35, де зазначена послідовність SEQ ID NO:35 містить щонайменше 1 зворотну мутацію, вибрану серед залишків 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 і 87.

В одному з втілень антитіло згідно з даним винаходом містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID NO:35, де зазначена послідовність SEQ ID NO:35 містить 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 зворотних мутацій, вибраних серед залишків 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 і 87.

В іншому втіленні антитіло згідно з даним винаходом містить:

а) варіабельний домен важкого ланцюга (VH) послідовності SEQ ID NO:33, де зазначена послідовність SEQ ID NO:33 містить щонайменше 1 зворотну мутацію, вибрану серед залишків 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 і 95; і

б) варіабельний домен легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID NO:35, де зазначена послідовність SEQ ID NO:35 містить щонайменше 1 зворотну мутацію, вибрану серед залишків 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 і 87.

Для більшої ясності таблиця 5 ілюструє переважні зворотні мутації.

Таблиця 5

Амінокислота №	22	53	55	65	71	72	77	87
Мишача	S	R	H	R	Y	S	N	F
Людська	T	S	Q	S	F	T	S	Y

У такому втіленні антитіло згідно з даним винаходом містить усі зворотні мутації, зазначені вище, і відповідає антитілу, що містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH) послідовності SEQ ID NO:34 і варіабельний домен легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID NO:36. Зазначене гуманізоване антитіло далі називатиметься hz208F2 ("варіант" або "вар." 3).

В іншому втіленні усі гуманізовані форми, що містяться між варіантом 1 і варіантом 3, також охоплюються цим винаходом. Іншими словами, антитіло згідно з даним винаходом відповідає антитілу, що містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH) "консенсусної" послідовності SEQ ID NO:41 і варіабельний домен легкого ланцюга (VL) "консенсусної" послідовності SEQ ID NO:42. Зазначене гуманізоване антитіло цілим далі називатиметься hz208F2 ("варіант" або "вар." 2).

У переважному, але не обмежуючому втіленні антитіло згідно з даним винаходом вибране серед наступних:

а) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:33 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:33, і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11;

б) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:34 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:34, і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11; і

с) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності, вибраної серед SEQ ID NO:56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80, або будь-якої послідовності щонайменше з 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичністю з SEQ ID NO:56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80; і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11.

Під "будь-якою послідовністю, що демонструє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:33, 34, 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 або 80", слід розуміти послідовності, що демонструють три CDR важкого ланцюга SEQ ID NO:1, 2 і 3 і, крім того, демонструють щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з повною послідовністю SEQ ID NO:33, 34, 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80 поза послідовностями, що відповідають CDR (тобто SEQ ID NO:1, 2 і 3).

У переважному, але не обмежуючому втіленні антитіло згідно з даним винаходом вибране серед наступних:

а) антитіло, що містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:35 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:35, і три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3; і

б) антитіло, що містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:36 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:36, і три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3; і

с) антитіло, що містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності, вибраної з SEQ ID NO:57 і 60 або будь-якої послідовності щонайменше з 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичністю з SEQ ID NO:57 або 60; і три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3.

Під "будь-якою послідовністю, що демонструє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:35, 36, 57 або 60" слід розуміти послідовності, що демонструють три CDR легкого ланцюга SEQ ID NO:4, 5 і 6 і, крім того, демонструють щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з повною послідовністю SEQ ID NO:35, 36, 57 або 60 поза послідовностями, що відповідають CDR (тобто SEQ ID NO:4, 5 і 6).

Гуманізовані антитіла, описані в цьому документі, також можуть характеризуватися константним доменом, і, конкретніше, зазначені гуманізовані антитіла можуть бути вибрані або сконструйовані як IgG1, IgG2, IgG3, IgM, IgA, IgD або IgE, але не обмежуючись ними. Переважніше в контексті цього винаходу зазначені гуманізовані антитіла є IgG1 або IgG4.

Одне з втілень згідно з цим винаходом відноситься до гуманізованого антитіла, що містить варіабельні домени VH і VL, описані вище, у форматі IgG1. Переважніше, зазначене

гуманізоване антитіло містить константний домен для VH-послідовності SEQ ID NO:43 і каппа-домен для VL-послідовності SEQ ID NO:45.

Одне з втілень згідно з даним винаходом відноситься до гуманізованого антитіла, що містить варіабельні домени VH і VL, описані вище, у форматі IgG4. Переважніше, зазначене гуманізоване антитіло містить константний домен для VH-послідовності SEQ ID NO:44 і каппа-домен для VL-послідовності SEQ ID NO:45.

У ще одному втіленні згідно з даним винаходом антитіло вибране серед наступних:

а) антитіло, що містить (або складається з) важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:37 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:37, і легкий ланцюг, що містить (або складається з) послідовність SEQ ID NO:39 або будь-яку послідовність, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:39;

б) антитіло, що містить (або складається з) важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:38 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:38, і легкий ланцюг, що містить (або складається з) послідовність SEQ ID NO:40 або будь-яку послідовність, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:40; і

с) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності, вибраної з SEQ ID NO:56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80, або будь-якої послідовності щонайменше з 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичністю з SEQ ID NO:56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 або 80, і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності, вибраної з SEQ ID NO:57 і 60 або будь-якої послідовності щонайменше з 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичністю з SEQ ID NO:57 або 60. Для більшої ясності таблиця 6а ілюструє необмежуючі приклади послідовностей VH і VL для варіанту 1 (вар. 1) і варіанту 3 (вар. 3) гуманізованого антитіла hz208F2. Вона також містить консенсусну послідовність для варіанту 2 (вар. 2).

Таблиця 6а

	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID NO
hz208F2 (вар. 1)	Варіабельний домен (VH)		33
		Варіабельний домен (VL)	35
	Повнорозмірна		37
		Повнорозмірна	39
hz208F2 (вар. 3)	Варіабельний домен (VH)		34
		Варіабельний домен (VL)	36
	Повнорозмірна		38
		Повнорозмірна	40
hz208F2 (вар. 2)	Варіабельний домен (VH)		41
		Варіабельний домен (VL)	42

В іншому переважному, але не обмежуючому втіленні антитіло згідно з даним винаходом вибране серед наступних:

а) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності, вибраної з SEQ ID NO:56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80, або будь-якої послідовності щонайменше з 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичністю з SEQ ID NO:56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 або 80; і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11;

б) антитіло, що містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності, вибраної з SEQ ID NO:57 і 60, або будь-якої послідовності щонайменше з 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичністю з SEQ ID NO:57 або 60; і три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3; і

с) антитіло, що містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності, вибраної з SEQ ID NO:57 і 60, або будь-якої послідовності щонайменше з 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичністю з SEQ ID NO:57 або 60; і варіабельний домен важкого ланцюга послідовності, вибраної з SEQ ID NO:56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80, або будь-якої послідовності щонайменше з 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичністю з SEQ ID NO:56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 або 80.

Ще одне втілення згідно з даним винаходом відноситься до антитіла, вибраного серед антитіл, що містять або складаються з наступних:

а) важкий ланцюг послідовності, вибраної з SEQ ID NO:58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 і 81, або будь-якої послідовності щонайменше з 80%, переважно 85%, 90%, 95% або 98%



ідентичність з SEQ ID NO:71, і легкий ланцюг, що містить (або складається з) послідовність SEQ ID NO:59 або будь-яку послідовність, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:59;

5     j) антитіло, що містить (або складається з) важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:73 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:73, і легкий ланцюг, що містить (або складається з) послідовність SEQ ID NO:59 або будь-яку послідовність, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:59;

10    k) антитіло, що містить (або складається з) важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:75 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:75, і легкий ланцюг, що містить (або складається з) послідовність SEQ ID NO:59 або будь-яку послідовність, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:59;

15    l) антитіло, що містить (або складається з) важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:77 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:77, і легкий ланцюг, що містить (або складається з) послідовність SEQ ID NO:59 або будь-яку послідовність, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:59;

20    m) антитіло, що містить (або складається з) важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:79 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:79, і легкий ланцюг, що містить (або складається з) послідовність SEQ ID NO:59 або будь-яку послідовність, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:59;

25    n) антитіло, що містить (або складається з) важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:79 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:79, і легкий ланцюг, що містить (або складається з) послідовність SEQ ID NO:61 або будь-яку послідовність, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:61; і

30    o) антитіло, що містить (або складається з) важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:81 або будь-якої послідовності, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:81, і легкий ланцюг, що містить (або складається з) послідовність SEQ ID NO:59 або будь-яку послідовність, що демонструє щонайменше 80%, 85%, 90%, 95% або 98% ідентичність з SEQ ID NO:59.

35    Для більшої ясності таблиця 6b ілюструє необмежуючі приклади послідовностей VH і VL (варіабельного домена і повнорозмірну) для різних варіантів гуманізованого антитіла hz208F2.

Таблиця 6b

	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID NO
hz208F2 H037/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	56
			57
			58
			59
hz208F2 H037/L021	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	56
			60
			58
			61
hz208F2 H047/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	62
			57
			63
			59
hz208F2 H049/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	64
			57
			65
			59
hz208F2 H049/L021	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	64
			60
			65
			61

Таблиця 6b

	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID NO
hz208F2 H051/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	66
			57
			67
			59
hz208F2 H052/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	68
			57
			69
			59
hz208F2 H052/L021	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	68
			60
			69
			61
hz208F2 H057/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	70
			57
			71
			59
hz208F2 H068/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	72
			57
			73
			59
hz208F2 H070/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	74
			57
			75
			59
hz208F2 H071/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	76
			57
			77
			59
hz208F2 H076/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	78
			57
			79
			59
hz208F2 H076/L021	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	78
			60
			79
			61
hz208F2 H077/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірна	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірна	80
			57
			81
			59

Іншим аспектом даного винаходу є антитіло, вибране серед наступних:

- 5 і) антитіло, яке продукується гібридомами I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 або I-4774, депонованими у CNCM, Національній колекції культур мікроорганізмів, Інститут Пастера, 25, вулиця Docteur Roux, 75724, Париж, Франція, 30 травня 2013 року, 26 червня 2013, 26 червня 2013, 24 квітня 2013 і 26 червня 2013 року, відповідно,
- 10 ii) антитіло, яке конкурує за зв'язування IGF-1R з антитілом згідно i); а також
- 10 iii) антитіло, яке зв'язується з тим самим епітопом IGF-1R, що й антитіло згідно i).
- Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до мишачої гібридоми, вибраної серед гібридом I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 або I-4774, депонованих у CNCM, Інститут Пастера, Франція, 30 травня 2013 року, 26 червня 2013, 26 червня 2013, 24 квітня 2013 і 26 червня 2013 року, відповідно.
- 15 Новий аспект даного винаходу відноситься до виділеної нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент згідно з цим винаходом.
- Терміни "нуклеїнова кислота", "нуклеїнова послідовність", "нуклеїновокислотна послідовність", "полінуклеотид", "олігонуклеотид", "полінуклеотидна послідовність" і

"нуклеотидна послідовність", взаємозамінно використовувані в цьому описі, позначають точну послідовність нуклеотидів, модифікованих або ні, таку, що визначає фрагмент або область нуклеїнової кислоти, що містить або не містить неприродні нуклеотиди і є або дволанцюговою ДНК, або одностанцюговою ДНК, або транскрипційними продуктами зазначених ДНК.

5 Послідовності даного винаходу були виділені і/або очищені, тобто вони були відібрані прямо або непрямо, наприклад, шляхом копіювання, і їхнє навколишнє середовище щонайменше частково було змінено. Також тут слід згадати виділені нуклеїнові кислоти, отримані шляхом рекомбінантної генетики, наприклад, за допомогою клітин-хазяїв, або шляхом хімічного синтезу.

10 Також цей винахід відноситься до вектора, що містить нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент згідно з даним винаходом.

Винахід, зокрема, спрямований на клонуєчі вектори і/або експресійні вектори, які містять таку нуклеотидну послідовність.

15 Вектори переважно містять елементи, які дозволяють експресувати і/або секретувати нуклеотидні послідовності в даній клітині-хазяїні. Вектор, таким чином, повинен містити промотор, сигнали ініціації і термінації трансляції, а також відповідні області регуляції транскрипції. Він повинен мати здатність стабільно зберігатися в клітині-хазяїні і може додатково мати специфічні сигнали, які визначають секрецію трансльованого білка. Ці різні елементи відбираються і оптимізуються фахівцями в даній області відповідно до використовуваної клітини-хазяїна. Для цього нуклеотидні послідовності можуть бути вставлені у

20 векторах, що самореplikуються, у вибраного хазяїна або можуть бути інтегративними векторами вибраного хазяїна.

Такі вектори виготовляють, зазвичай, за допомогою способів, що використовуються фахівцями в цій області, і отримані в результаті клони можуть бути введені у відповідного хазяїна за допомогою стандартних способів, таких як ліпофекція, електропорація, тепловий шок

25 або хімічні способи.

Вектори є, наприклад, векторами плазмідного або вірусного походження. Вони використовуються для трансформації клітин-хазяїв для клонування або експресії нуклеотидних послідовностей згідно з винаходом.

30 Даний винахід також відноситься до виділених клітин-хазяїв, трансформованих вектором, описаним вище, або таким, що містять його.

Клітина-хазяїн може бути вибрана серед прокаріотичних або еукаріотичних систем, таких як, наприклад, бактеріальні клітини, а також дріжджові клітини або клітини тварин, зокрема клітини ссавців (за винятком людини). Також можуть бути використані клітини комах або рослин.

35 Даний винахід також відноситься до тварин, за винятком людини, які містять трансформовану клітину.

Інший аспект відноситься до способу отримання антитіла відповідно до даного винаходу або його антигензв'язуючого фрагмента, при цьому зазначений спосіб характеризується тим, що включає наступні етапи:

40 а) культивування клітини-хазяїна згідно з винаходом у середовищі у відповідних культуральних умовах; і

б) витягання зазначеного антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, отриманого таким чином, з культурального середовища або із зазначених клітин, які культивують.

45 Трансформовані клітини використовуються в способах отримання рекомбінантних антитіл відповідно до цього винаходу. До даного винаходу також входять способи отримання антитіл у рекомбінантній формі за допомогою вектора і/або клітини, трансформованої вектором згідно з винаходом. Переважно клітину, трансформовану вектором, описаним вище, культивують в умовах, які роблять можливою експресію зазначеного вище поліпептиду і витягання зазначеного антитіла.

50 Як вже згадувалося, клітина-хазяїн може бути вибрана серед прокаріотичних або еукаріотичних систем. Зокрема, можна визначити нуклеотидні послідовності, які полегшують секрецію в такій прокаріотичній або еукаріотичній системі. Вектор згідно з винаходом, що несе таку послідовність, може бути вигідно використаний для продукції рекомбінантних білків, які секретують. Дійсно, очищенню цих рекомбінантних білків, що становлять інтерес, сприятиме той факт, що вони присутні в супернатанті клітинної культури, а не усередині клітин-хазяїв.

55 Антитіло також може бути отримане шляхом хімічного синтезу. Один такий спосіб отримання також є об'єктом винаходу. Фахівцям в даній області відомі способи хімічного синтезу, такі як твердофазні методики або частково твердофазні методики, шляхом конденсації фрагментів або шляхом звичайного синтезу в розчині. До винаходу також входять поліпептиди, які отримані шляхом хімічного синтезу і можуть містити відповідні неприродні амінокислоти.

60 До даного винаходу також входить антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент,

ймовірно, отриманий описаним вище способом.

Відповідно до конкретного аспекту даний винахід відноситься до антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, описаного вище, для застосування в якості адресуючого переносника для доставки цитотоксичного агента в місце-мішень хазяїна, при цьому зазначене місце-мішень хазяїна складається з епітопа, локалізованого у IGF-1R, переважно у позаклітинному домені IGF-1R, переважніше в людському IGF-1R (SEQ ID NO:50), і ще переважніше у позаклітинному домені людського IGF-1R (SEQ ID NO:51), і ще переважніше на N-кінці позаклітинного домена людського IGF-1R (SEQ ID NO:52), або до послідовності будь-якого їх природного варіанту.

У переважному втіленні зазначене місце-мішень хазяїна є місцем-мішенню клітини ссавця, переважніше клітини людини, переважніше клітини, яка природним чином або шляхом генетичної рекомбінації експресує IGF-1R.

Іншим аспектом даного винаходу є кон'югат "антитіло - лікарський засіб", що містить антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описаний вище, кон'югований з цитотоксичним агентом.

Винахід відноситься до імунокон'югата, що містить антитіло, описане в цьому документі, кон'юговане з цитотоксичним агентом.

Вираз "імунокон'югат" відноситься в загальному випадку до сполуки, що містить щонайменше один адресуючий продукт, такий як антитіло, фізично зв'язаний з одним або більше ніж одним терапевтичним агентом (агентами), що таким чином створює високо націлену сполуку.

У переважному втіленні такі терапевтичні агенти включають цитотоксичні агенти.

Під терміном "цитотоксичний агент" або "цитотоксичний" мається на увазі агент, який при введенні суб'єкту лікує або запобігає проліферації ненормальних клітин, переважно, розвиток раку в організмі суб'єкта, інгібуючи або запобігаючи клітинній функції і/або викликаючи загибель клітин.

Багато цитотоксичних агентів були виділені або синтезовані і роблять можливим інгібування проліферації клітин або руйнування, або зменшення пухлинних клітин, якщо не остаточно, то щонайменше суттєво. Проте, токсична активність цих агентів не обмежена активністю по відношенню до пухлинних клітин, і непухлинні клітини також страждають і можуть бути знищені. Конкретніше, побічні ефекти спостерігаються на клітинах, що швидко поновлюються, таких як кровотворні клітини або клітини епітелію, зокрема, клітини слизових оболонок. Як ілюстрація, клітини шлунково-кишкового тракту значною мірою уражаються при використанні таких цитотоксичних агентів.

Однією з цілей даного винаходу також є надання цитотоксичного агента, який дає можливість обмежити побічні ефекти щодо нормальних клітин, у той же час зберігаючи високу цитотоксичність по відношенню до пухлинних клітин.

Конкретніше, цитотоксичний агент може переважно включати, але не обмежуючись ними, лікарський препарат (тобто кон'югат "антитіло - лікарський препарат"), токсин (наприклад, "імунотоксин" або кон'югат "антитіло - токсин"), радіоактивний ізотоп (тобто "радіоімунокон'югат" або кон'югат "антитіло - радіоізотоп") і т.д.

У першому переважному втіленні імунокон'югат складається з антитіла, зв'язаного щонайменше з лікарським препаратом або медикаментом. Такий імунокон'югат називають кон'югатом "антитіло - лікарський препарат" (або "ADC", antibody-drug conjugate).

У першому втіленні такі лікарські препарати можуть бути описані стосовно режиму їхньої дії. Як необмежуючий приклад можна згадати алкілюючі агенти, такі як азотистий іприт, алкілсульфонати, нітрозосечовина, оксазофорины, азиридины або етиленіміни, антиметаболіти, протипухлинні антибіотики, інгібітори мітозу, інгібітори функції хроматину, антиангіогенні агенти, антиестрогени, антиандрогени, хелатуючі агенти, стимулятори всмоктування заліза, інгібітори циклооксигенази, інгібітори фосфодіестерази, інгібітори ДНК, інгібітори синтезу ДНК, стимулятори апоптозу, інгібітори тимідилатсинтази, інгібітори Т-клітин, агоністи інтерферону, інгібітори рибонуклеозидтрифосфатредуктази, інгібітори ароматази, антагоністи рецепторів естрогену, інгібітори тирозинкінази, інгібітори клітинного циклу, таксан, інгібітори тубуліну, інгібітори ангіогенезу, стимулятори макрофагів, антагоністи рецепторів нейрокінінів, агоністи канабіноїдних рецепторів, агоністи дофамінових рецепторів, агоністи гранулоцитарного стимулюючого чинника, агоністи рецептора еритропоєтину, агоністи рецептора соматостатину, агоністи LHRH, сенсibilізатори кальцію, антагоністи рецептора VEGF, антагоністи рецепторів інтерлейкінів, інгібітори остеокластів, стимулятори утворення радикалів, антагоністи рецепторів ендотеліну, алкалоїд барвінка, антигормони або імунomodulatory або будь-які інші нові препарати, які містять повний набір критеріїв активності цитотоксичного агента або токсину.



Такі препарати, наприклад, приведені у VIDAL 2010 на сторінці, присвяченій сполукам, прикріпленим до колонки онкології і гематології "Цитотоксичні агенти", і ці цитотоксичні сполуки, приведені з посиланням на цей документ, процитовані у цьому документі як переважні цитотоксичні агенти.

5 Конкретніше, але не обмежуючись ними, наступні лікарські препарати або медикаменти є переважними згідно з винаходом: мехлоретамін, хлорамбукол, мелфален, хлоридрат, піпобромен, преднімустин, динатрію фосфат, естрамустин, циклофосфамід, алтретамін, трофосфамід, сульфосфосфамід, іфосфамід, тіотепа, триетиленамін, кармустин, стрептозоцин, фотемустин, ломустин, бусульфан, треосульфат, імпросульфат, дакарбазин; цисплатин, оксалиплатин, лобоплатин, гептаплатин, міриплатин гідрат, карбоплатин, метотрексат, пеметрексед, 5-фторурацил, флоксурин, 5-фтордезоксифурин, капецитабін, цитарабін, флударабін, цитозинарабінозид, 6-меркаптопурин (6-MP), неларабін, 6-тіогуанін (6-TG), хлордезоксиденозин, 5-азацитидин, гемцитабін, кладрибін, дезоксиформіцин, тегафур, пентостатин, доксорубіцин, даунорубіцин, ідарубіцин, валрубіцин, мітоксантрон, дактиномицин, мітраміцин, плікаміцин, мітоміцин C, блеоміцин, прокарбазин, паклітаксел, доцетаксел, вінбластин, вінкрестин, віндезин, вінорелбін, топотекан, іринотекан, етопозид, валрубіцин, амрубіцин гідрохлорид, пірарубіцин, еліптінію ацетат, зорубіцин, епірубіцин, ідарубіцин і теніпозид, разоксин, марімастат, батімастат, приномастат, таномастат, іломастат, CGS-27023A, галофугінон, COL-3, неовастат, талідомід, CDC 501, DMXAA, L-651582, скваламін, ендостатин, 20 SU5416, SU6668, інтерферон-альфа, EMD121974, інтерлейкін-12, IM862, ангіостатин, тамоксифен, тореміфен, ралоксифен, дролоксифен, йодоксифен, анастрозол, летрозол, ексеместан, флутамід, нілутамід, спіронолактон, ципротерон ацетат, фінастерид, цимітидин, бортезомід, велкад, бікалутамід, ципротерон, флутамід, фулвестран, екземестан, дазатиніб, ерлотиніб, гефітініб, іматиніб, лапатиніб, нілотиніб, сорафеніб, сунітиніб, ретиноїд, рексінотид, метоксален, метиламінолевулінат, алдеслейкін, OCT-43, денілейкін дифлітокс, інтерлейкін-2, 25 тазонермін, лентінан, сизофілан, роквінімекс, підотимод, пегадемаза, тимопентин, полі І:С (поліінозинова-поліцитидилова кислота), прокодазол, Tіс BCG, *Corynebacterium parvum*, NOV-002, україн, левамизол, 1311-chTNT, H-101, целмолейкін, інтерферон альфа 2a, інтерферон альфа 2b, інтерферон гамма 1a, мобенакін, рексин-Г, тецелейкін, акларубіцин, актиномицин, арглабін, аспарагіназа, карцинофілін, хромоміцин, дауноміцин, лейковорин, мазопрокол, неокарциностан, пепломіцин, саркоміцин, соламаргін, трабектедин, стрептозоцин, тестостерон, кунакатехіні, синьокатехіні, алітретиніон, белотекан гідрохлорид, калустан, дромостанолон, етиніл естрадіол, етопозид, флюоксиместерон, форместан, фосфетрол, гозерелін ацетат, гексил амінолевулінат, гістрелін, гідроксипрогестерон, іксабепілон, лейпролід, 35 медрохипрогестерон ацетат, мегестрол ацетат, метилпреднізолон, метилтестостерон, мілтефозин, мітобронітол, надролон фенілпропіонат, норетиндрон ацетат, преднізолон, преднізон, темсіролімус, тестостерон, триамнолол, трипторелін, вапреодит ацетат, зиностанін стимуламер, амсакрін, тріоксид миш'яку, бісантрон гідрохлорид, хлорамбуцил, хлортрианізен, цис-діаміндіхлорплатина, циклофосфамід, діетилстилбестрол, 40 гексаметилмеламін, гідроксисечовина, леналідомід, лонідамін, мехлоретанамін, мітотан, недаплатин, німустин гідрохлорид, памідронат, піпоброман, порфімер натрію, ранімустан, разоксан, семустин, собузоксан, мезілат, триетиленмеламін, золедренова кислота, камостат мезілат, фадрозол HCl, нафоксидін, аміноглютетимід, кармофур, клофарабін, цитозинарабінозид, децитабін, доксифлурідин, еноцитабін, флударабін фосфат, фторурацил, фторафур, урацил гірчичний, абарелікс, бексаротен, ралтитрексид, тамібаротен, темозоломід, 45 вориностат, мегастрол, клодронат динатрію, левамизол, ферумокситол, заліза ізомальтозид, цецекоксид, ібудиласт, бендамустан, алтретамін, мітолактон, темсіролімус, пралатрексат, TS-1, децитабін, бікалутамід, флутамід, летрозол, клодронат динатрію, дегарелікс, тореміфен цитрат, гістамін дигідрохлорид, DW-166HC, нітракрин, децитабін, ірітекан гідрохлорид, амсакрін, ромідепсин, третиноїн, кабазитаксел, вандетаніб, леналідомід, ібандронова кислота, 50 мілтефозин, вітеспен, міфамуртид, надропарин, гранісетрон, ондансетрон, тропісетрон, алізаприд, рамосетрон, доласетрон мезілат, фосапрепітант димеглумін, набілон, апрепітант, дронабінол, TY-10721, лізурид гідроген малеат, епіцерам, дефібротид, дабігатран етексилат, філграстим, пегфілграстим, редитукс, епоетин, молграмостим, опрелвекін, сипулейцел-Т, M-Vax, ацетил L -карнітин, донепезил гідрохлорид, 5-амінолевулінова кислота, метиламінолевулінат, цетрорелікс ацетат, ікодекстрин, лейпроделін, метилфенідат, октреотид, амлексанокс, плеріксафор, менатетренон, анетол дітіолетіон, доксеркальциферол, цінакальцет гідрохлорид, алефацепт, роміпlostим, тімоглобулін, тімалфазин, убенімекс, іміквімод, еверолімус, сиролімус, H-101, лазофоксифен, трілостан, інкадронат, гангліозиди, пегалтаніб 60 октанатрію, вертопорфін, мінодренова кислота, золедренова кислота, нітрат галію, алендронат

натрію, етидронат динатрію, памідронат динатрію, дутастерід, стібоглюконат натрію, армодафніл, дексразоксан, аміфостин, WF-10, темопорфін, дарбепоетин альфа, анцестим, сарграмостим, паліфермін, R-744, непідермін, опрелвекін, денілейкін-діфтітокс, кризантаспаза, бусерелін, деслорелін, ланреотід, октреотід, пілокарпін, бозентан, каліхеаміцин, мейтанзиноїди, циклонікат і піролобензодіазепіни, особливо ті, які описані в заявці РСТ, опублікованій під номером WO2011/130598.

В іншому втіленні імунокон'югат складається з антитіла, зв'язаного щонайменше з радіоактивним ізотопом. Такий імунокон'югат називають кон'югатом "антитіло - радіоізотоп" (або "ARC").

Для селективного руйнування пухлини антитіло може містити високорадіоактивний атом. Для отримання ARC доступна безліч радіоактивних ізотопів, таких як, але не обмежуючись ними,  $At^{211}$ ,  $C^{13}$ ,  $N^{15}$ ,  $O^{17}$ ,  $F^{19}$ ,  $I^{123}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $In^{111}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $tc^{99m}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$ , радіоактивні ізотопи Lu, гадолінію, марганцю або заліза.

Будь-які способи або процеси, відомі фахівцям в даній області, можуть бути використані для включення такого радіоізоотопу в ARC. Як необмежуючий приклад,  $tc^{99m}$  або  $I^{123}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$  і  $In^{111}$  можуть бути приєднані через залишок цистеїну.  $Y^{90}$  може бути приєднаний через залишок лізину.  $I^{123}$  може бути приєднаний за допомогою способу IODOGEN.

Щоб проілюструвати знання фахівців в області ARC, можна згадати декілька прикладів, таких як Zevalin®, який є ARC, що складається з моноклонального анти-CD20-антитіла і радіоактивного ізотопу  $In^{111}$  або  $Y^{90}$ , зв'язаного тіосечовинним лінкером-хелатором; або Mylotarg®, до складу якого входить анти-CD33-антитіло, зв'язане з каліхеаміцином (US 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). З останніх також можна згадати ADC, відомий як Adcetris (що відповідає брентуксимаба ведотіну), який був недавно прийнятий FDA для лікування лімфоми Ходжкіна.

В іншому втіленні імунокон'югат складається з антитіла, зв'язаного щонайменше з токсином. Такий імунокон'югат називають кон'югатом "антитіло - токсин" (або "ATC").

Токсини є ефективними і специфічними отрутами, які виробляються живими організмами. Вони, зазвичай, складаються з амінокислотного ланцюга, молекулярна маса якого може варіювати в діапазоні пари сотень (пептиди) і сотні тисяч (білки). Вони також можуть бути низькомолекулярними органічними сполуками. Токсини виробляються багатьма організмами, наприклад, бактеріями, грибами, водоростями і рослинами. Багато з них є надзвичайно отруйними, маючи токсичність, яка на декілька порядків вища, ніж у нервово-паралітичних агентів.

Токсини, використовувані в ATC, можуть включати, але не обмежуючись ними, всі види токсинів, які можуть чинити свою цитотоксичну дію за допомогою механізмів, що включають зв'язування тубуліну, зв'язування ДНК або інгібування топоізомери.

Ферментативно активні токсини і їх фрагменти, які можуть бути використані, включають ланцюг А дифтерійного токсину, незв'язуючі активні фрагменти дифтерійного токсину, ланцюг А екзотоксину (від *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А рицину, ланцюг А абріну, ланцюг А модекцину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки-діантіни, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор *Saponaaria officinalis*, гелонін, мітогелін, рестріктоцин, феноміцин, еноміцин і трикотецени.

Низькомолекулярні токсини, такі як доластатини, ауристатини, зокрема монометилауристатин Е (MMAE), трихотексин і CC1065, а також похідні цих токсинів, які мають активність токсину, також розглядаються в даному описі. Було показано, що доластатини і ауристатини порушують динаміку мікротрубочок, гідроліз GTP, а також ядерне і клітинне ділення, і мають протиракову і протигрибкову активність.

Поняття "лінкер", "лінкерний блок" або "зв'язок" позначають хімічне угруповання, що містить ковалентний зв'язок або ланцюг атомів, який ковалентно приєднує антитіло щонайменше до одного цитотоксичного агента.

Лінкери можуть бути отримані з використанням безлічі біфункціональних агентів, що зв'язують білки, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні імідоєфірів (такі як диметиладипімідат HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидо-з'єднання (такі як біс(п-азидобензоїл)гександіамін), біс-діазонію похідні (такі як біс(п-діазонію бензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Мічена вуглецем-14 1-ізотіоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) є прикладом хелатуючого агента для кон'югації цитотоксичних агентів з адресуючою системою. Іншими зв'язуючими реагентами можуть бути BMPS, EMCS, GMBS,

HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC і сульфо-SMPB і SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон) бензоат), які є комерційно доступними (наприклад, від Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Іллінойс, США).

5 Лінкер может бути "нерозщеплюваним" або "розщеплюваним".

У переважному втіленні він складається з "розщеплюваного лінкера", що полегшує вивільнення цитотоксичного агента в клітині. Наприклад, може бути використаний кислотно-лабільний лінкер, чутливий до пептидази лінкер, фотолабільний лінкер, диметиловий лінкер або лінкер, що містить дисульфід. У переважному втіленні лінкер розщеплюється у

10 внутрішньоклітинних умовах таким чином, що розщеплення лінкера вивільняє цитотоксичний агент з антитіла у внутрішньоклітинне середовище.

Наприклад, у деяких втіленнях лінкер розщеплюється розщеплювальним агентом, який присутній у внутрішньоклітинному середовищі (наприклад, у лізосомі або ендосомі, або кавеолі). Лінкер може бути, наприклад, пептидильним лінкером, який розщеплюється

15 внутрішньоклітинним ферментом пептидазою або протеазою, у тому числі, але не обмежуючись ними, лізосомальною або ендосомальною протеазою. Зазвичай, пептидильний лінкер має щонайменше дві амінокислоти у довжину або щонайменше три амінокислоти у довжину. Розщеплювальні агенти можуть включати катепсини В і D і плазмін, які, як відомо, гідролізують дипептидні похідні лікарських засобів, приводячи до вивільнення активного лікарського засобу

20 усередині клітини-мішені. Наприклад, може бути використаний пептидильний лінкер, який розщеплюється тіол-залежною протеазою катепсином В, яка експресується на високому рівні в раковій тканині (наприклад, лінкер Phe-Leu або Gly-Phe-Leu-Gly). У конкретних втіленнях пептидильним лінкером, що розщеплюється внутрішньоклітинною протеазою, є лінкер Val-Cit або лінкер Phe-Lys. Одна з переваг використання внутрішньоклітинного протеолітичного

25 вивільнення цитотоксичного агента полягає в тому, що агент, зазвичай, ослаблюється при кон'югації, і сироваткова стабільність кон'югатів, зазвичай, є високою.

В інших втіленнях розщеплюваний лінкер є рН-чутливим, тобто чутливим до гідролізу при певних значеннях рН. Як правило, рН-чутливий лінкер гідролізується у кислих умовах. Наприклад, може бути використаний кислотно-лабільний лінкер, який гідролізується в лізосомах

30 (наприклад, гідразон, семикарбазон, тіосемикарбазон, цис-аконітовий амід, ортоєфір, ацеталь, кеталь і т.п.). Такі лінкери відносно стабільні в нейтральних умовах рН, таких як умови в крові, але нестабільні при рН нижче 5,5 або 5,0, наближеному до рН лізосом. У деяких втіленнях лінкером, який гідролізують, є тіоефірний лінкер, такий як, наприклад, тіоефір, прикріплений до терапевтичного агента через ацилгідразоновий зв'язок.

В інших втіленнях лінкер розщеплюється у відновлюючих умовах (наприклад, дисульфідний лінкер). У даній області відоме велике число дисульфідних лінкерів, включаючи, наприклад, ті, які можуть бути утворені з використанням SATA (N-сукцинімідил-s-ацетилтіоацетату), SPDP (N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонової кислоти), SPDB (N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)бутирату) і SMPT (N-сукцинімідил-алкілоксикарбоніл-альфа-метил-альфа-(2-

35 піридил-дитіо)толуолу), SPDB і SMPT.

40 Як необмежувачий приклад нерозщеплюваних або "невідновних" лінкерів можна згадати імункон'югат трастузумаб-DM1 (TDM1), який об'єднує трастузумаб із зв'язаним хіміотерапевтичним агентом мейтанзином.

У переважному втіленні імункон'югат згідно з даним винаходом може бути отриманий будь-яким із способів, відомих фахівцям в даній області, таких як, але не обмежуючись ними, i) реакція нуклеофільної групи антитіла з двовалентним лінкерним реагентом з подальшою реакцією з цитотоксичним агентом, або ii) реакція нуклеофільної групи цитотоксичного агента з двовалентним лінкерним реагентом з подальшою реакцією з нуклеофільною групою антитіла.

Нуклеофільні групи на антитілі, включають, але не обмежуючись ними, N-кінцеві аміно-групи, аміногрупи бічного ланцюга, наприклад, лізину, тіолові групи бічного ланцюга і гідроксильні або аміно-групи цукрів, коли антигензв'язуючий білок глікозилований. Аміно-, тіолові і гідроксильні групи є нуклеофільними і здатні вступати в реакцію з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами на лінкерних угрупованнях і лінкерних реагентах, включаючи, але не обмежуючись ними, активні складні ефіри, такі як складні ефіри NHS, складні ефіри HOBt, галогенформіати і галогеніди кислот; алкіл- і бензилгалогеніди, такі як галогенацетаміди; альдегіди, кетони, карбоксильні і малеїмідні групи. Антитіло може мати відновлювані міжланцюгові дисульфідні, тобто цистеїнові містки. Антитіло можна зробити реакційноздатним для кон'югації з лінкерними реагентами шляхом обробки відновлювальним агентом, таким як DTT (дитіотреїтол). Кожний цистеїновий місток, таким чином, формуватиме,

50

55

60 теоретично, два реактивних тіолових нуклеофіла. Додаткові нуклеофільні групи можуть бути

введені в антитіло за допомогою будь-якої реакції, відомої фахівцям в даній області. Як необмежуючий приклад, реакційноздатні тіолові групи можуть бути введені в антитіло шляхом введення одного або більше ніж одного залишку цистеїну.

Імунокон'югати також можуть бути отримані за допомогою модифікації антитіла введенням електрофільних угруповань, які можуть вступати в реакцію з нуклеофільними замісниками на лінкерному реагенті або цитотоксичному агенті. Цукри глікозильованого антитіла можуть бути окислені з утворенням альдегідних або кетонів груп, які можуть вступати в реакцію з аміно-групою лінкерних реагентів або цитотоксичного агента. Отримані в результаті імінові групи основ Шиффа можуть формувати стабільний зв'язок або можуть бути відновлені з утворенням стабільних аміно-зв'язків. В одному з втілень реакція вуглеводневої частини глікозильованого антитіла або з галактозооксидазою, або з метаперіодатом натрію може давати карбонільні (альдегідні і кетонів) групи в антитілі, які можуть взаємодіяти з відповідними групами на лікарському засобі. В іншому втіленні антитіла, що містять N-кінцеві залишки серину або треоніну, можуть вступати в реакцію з метаперіодатом натрію, що приводить до утворення альдегіду замість першої амінокислоти.

У деяких переважних втіленнях лінкерний блок може мати наступну загальну формулу:

--Ta - Ww - Yy--,

у якій:

-T- є розтяганням (розтягувальний блок);

а дорівнює 0 або 1;

-W- є амінокислотним блоком;

w незалежно є цілим числом від 1 до 12;

-Y- є спейсерним блоком;

у дорівнює 0, 1 або 2.

Розтягувальний блок (-T-), якщо він присутній, зв'язує антитіло з амінокислотним блоком (-W-). Використовувані функціональні групи, які можуть бути присутні на антитілі або від природи, або за рахунок хімічних маніпуляцій, включають сульфгідрильну, аміно-, гідроксильну, аномерну гідроксильну групу вуглеводню і карбоксильну групу. Відповідними функціональними групами є сульфгідрильні і аміно-групи. Сульфгідрильні групи можуть бути отримані при відновленні внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків антитіл, якщо вони присутні. Як альтернатива, сульфгідрильні групи можуть бути отримані в результаті реакції аміногрупи лізину антитіла з 2-імінотіолоном або іншими реагентами, що утворюють сульфгідрил. У конкретних втіленнях антитіло є рекомбінантним антитілом, і воно сконструйоване так, щоб нести один або більше ніж один лізин. Переважніше, антитіло може бути сконструйоване так, щоб нести один або більше ніж один цистеїн (див. ThioMab).

У деяких конкретних втіленнях розтягувальний блок утворює зв'язок з атомом сірки антитіла. Атом сірки може бути отриманий з сульфгідрильної (-SH) групи відновленого антитіла.

У деяких інших конкретних втіленнях розтягувальний блок зв'язаний з антитілом через дисульфідний зв'язок між атомом сірки антитіла і атомом сірки розтягувального блоку.

У інших конкретних втіленнях реакційноздатна група розтягання містить реакційноздатний сайт, який може реагувати з аміно-групою антитіла. Аміно-група може бути групою аргініну або лізину. Відповідні сайти, здатні реагувати з аміно-групою, включають, але не обмежуючись ними, активовані складні ефіри, такі як сукцинімідний складний ефір, 4-нітрофенілові ефіри, пентафторфенілові ефіри, ангідриди, кислі хлориди, сульфонілхлориди, ізоціанати і ізотіоціанати.

У ще одному аспекті реакційноздатна функціональна група розтягання містить реакційноздатний сайт, який може вступати в реакцію з модифікованою вуглеводневою групою, яка може бути присутня на антитілі. У конкретному втіленні антитіло глікозильється ферментативно, утворюючи вуглеводневе угруповання. Вуглеводень може бути злегка окислений таким реагентом як періодат натрію, і отриманий в результаті карбонільний блок окисненого вуглеводню може бути конденсований з розтяганням, яке містить функціональну групу, таку як гіdraзид, оксим, реакційноздатний амін, гіdraзин, тіосемикарбазид, гіdraзинкарбоксилат або арилгіdraзид.

Амінокислотний блок (-W-) зв'язує розтягувальний блок (-T-) зі спейсерним блоком (-Y-), якщо спейсерний блок присутній, і зв'язує розтягувальний блок з цитотоксичним агентом, якщо спейсерний блок відсутній.

Як згадувалося вище, -Ww- може бути дипептидним, трипептидним, тетрапептидним, пентапептидним, гексапептидним, гептапептидним, октапептидним, нонапептидним, декапептидним, ундекапептидним або додекапептидним блоком.

У деяких втіленнях амінокислотний блок може містити амінокислотні залишки, такі як, але не

обмежуючись ними, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, метіонін, фенілаланін, триптофан, пролін, захищений ацетилом або формілом лізин, аргінін, захищений тозил- або нітро-групами аргінін, гістидин, орнітин, захищений ацетилом або формілом орнітин і цитрулін. Ілюстративні амінокислотні лінкерні компоненти переважно включають дипептид, трипептид, тетрапептид або пентапептид.

Приклади дипептидів включають: Val-Cit, Ala-Val, Ala-Ala, Val-Ala, Lys-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Phe, Phe-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Phe-N<sup>9</sup>-тозил-Arg, Phe-N<sup>9</sup>-нітро-Arg.

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

Приклади тетрапептидів включають: Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:53), Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:54).

Приклади пентапептидів включають: Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO:55).

Амінокислотні залишки, які містять амінокислотний лінкерний компонент, включають природні, а також мінорні амінокислоти і аналоги амінокислот, що не зустрічаються в природі, такі як цитрулін. Амінокислотні лінкерні компоненти можуть бути розроблені і оптимізовані за їх селективністю відносно ферментативного розщеплювання конкретним ферментом, наприклад, асоційованою з пухлиною протеазою, катепсином В, С і D або протеазою плазміном.

Для вивільнення цитотоксичного агента амінокислотний блок лінкера може бути ферментативно відщеплений за допомогою ферменту, включаючи асоційовану з пухлиною протеазу, але не обмежуючись нею.

Амінокислотний блок може бути розроблений і оптимізований за його селективністю відносно ферментативного розщеплювання конкретною асоційованою з пухлиною протеазою. Відповідними блоками є ті, розщеплювання яких каталізується протеазами, катепсином В, С і D і плазміном.

Спейсерний блок (-Y-), якщо він присутній, зв'язує амінокислотний блок з цитотоксичним агентом. Спейсерні блоки бувають двох основних типів: такі, що саморуйнуються і такі, що не саморуйнуються. Спейсерний блок, що не саморуйнується, є таким, в якому частина або весь спейсерний блок залишається зв'язаним з цитотоксичним агентом після ферментативного відщеплення амінокислотного блоку з імунокон'югата. Приклади спейсерного блоку, що не саморуйнується, включають, але не обмежуючись ними, спейсерний блок "гліцин - гліцин" і спейсерний блок "гліцин". Для того, щоб вивільнити цитотоксичний агент, усередині клітини-мішені повинна відбутися незалежна реакція гідролізу, щоб розщепити зв'язок "гліцин - лікарський засіб".

В іншому втіленні спейсерний блок (-Y-), що не саморуйнується, є -GLy-.

В одному з втілень у імунокон'югаті відсутній спейсерний блок (y=0).

Як альтернатива, імунокон'югат, що містить спейсерний блок, що саморуйнується, може вивільнити цитотоксичний агент без необхідності окремого етапу гідролізу. У цих втіленнях -Y- є п-амінобензиловим спиртом (PAB), який зв'язаний з -Ww- через атом азоту групи PAB і з'єднаний безпосередньо з -D через карбонатну, карбаматну або ефірну групу.

Інші приклади спейсерів, що саморуйнуються, включають, але не обмежуючись ними, ароматичні сполуки, які електронно еквівалентні групі PAB, такі як похідні 2-аміноімідазол-5-метанолу і орто- або пара-амінобензилацеталі. Можуть бути використані спейсери, які легко піддаються циклізації після гідролізу амідного зв'язку, такі як заміщені і незаміщені аміди 4-аміномасляної кислоти, відповідним чином заміщені біцикло[2.2.1]- і біцикло[2.2.2]-кільцеві системи і аміди 2-амінофенілпропіонової кислоти.

У альтернативному втіленні спейсерний блок є розгалуженим біс(гідроксиметил)стироловим (BHMS) блоком, який може бути використаний для включення додаткових цитотоксичних агентів.

Лікарське завантаження, також зване співвідношенням "лікарський засіб - антитіло" (DAR), є середнім числом молекул PBD-препаратів на молекулу агента, що зв'язує клітину.

У випадку антитіла ізотипу IgG1, коли лікарські засоби зв'язуються з цистеїнами після часткового відновлення антитіла, лікарське завантаження може знаходитися в діапазоні від 1 до 8 молекул лікарського засобу (D) на молекулу антитіла, тобто коли 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 і 8 молекул лікарського засобу ковалентно приєднані до антитіла.

У випадку антитіла ізотипу IgG2, коли лікарські засоби зв'язуються з цистеїнами після часткового відновлення антитіла, лікарське завантаження може знаходитися в діапазоні від 1 до 12 молекул лікарського засобу (D) на молекулу антитіла, тобто коли 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 і 12 молекул лікарського засобу ковалентно приєднані до антитіла.

Композиції ADC включають колекції агентів, що зв'язують клітину, наприклад антитіла,

кон'юговані з діапазоном лікарських засобів, від 1 до 8 або від 1 до 12.

Якщо лікарські засоби зв'язані з лізінами, лікарське завантаження може знаходитися в діапазоні від 1 до 80 молекул препарату (D) на молекулу клітинного антитіла, хоча переважною може бути верхня межа 40, 20, 10 або 8. Композиції ADC включають колекції агентів, що зв'язують клітину, наприклад, антитіла, кон'юговані з діапазоном лікарських засобів від 1 до 80, від 1 до 40, від 1 до 20, від 1 до 10 або від 1 до 8.

Середнє число молекул лікарського засобу на молекулу антитіла в препаратах ADC з реакцій кон'югації можна охарактеризувати звичайними засобами. Кількісний розподіл ADC також може бути визначений по відношенню до коефіцієнта лікарського засобу. Для деяких кон'югатів "антитіло - лікарський засіб" коефіцієнт лікарського засобу може бути обмежений числом сайтів приєднання на антитілі. Наприклад, антитіло може мати лише одну або декілька тіолових груп цистеїну або може мати лише одну або декілька досить реакційноздатних тіолових груп, через які може бути приєднаний лінкер. Вище лікарське завантаження, наприклад, коефіцієнт лікарського засобу  $> 5$ , може викликати агрегацію, нерозчинність, токсичність або втрату клітинної проникності деяких кон'югатів "антитіло - лікарський засіб".

Деякі антитіла мають відновлювані міжланцюгові дисульфіди, тобто цистеїнові містки. Антитіла можна зробити здатними до реакції кон'югації з лінкерними реагентами шляхом обробки відовлювальним агентом, таким як DTT (дитіотреїтол). Таким чином, кожний цистеїновий місток теоретично формуватиме два реакційноздатних тіолових нуклеофіла. Додаткові нуклеофільні групи можна вводити в антитіла за допомогою реакції лізину з 2-імінотіолоном (реагент Траута), що приводить до перетворення аміну в тіол. Реакційноздатні тіолові групи можна ввести в антитіло (або в його фрагмент) шляхом інженерії одного, двох, трьох, чотирьох або більше залишків цистеїну (наприклад, отримуючи мутантні антитіла, що містять один або більше ніж один ненативний залишок амінокислоти цистеїну). У US 7521541 описана інженерія антитіл шляхом введення реакційноздатних амінокислот цистеїнів.

Амінокислоти цистеїнів можуть бути сконструйовані на реакційноздатних сайтах в антитілі і можуть бути такими, які не формують внутрішньоланцюгові або міжмолекулярні дисульфідні зв'язки (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249). Тіоли інженерних цистеїнів можуть вступати в реакцію з лінкерними реагентами або реагентами "лікарський засіб - лінкер" згідно з даним винаходом, які мають електрофільні групи, здатні реагувати з тіолами, такі як maleimide- або альфа-галоген-аміди, для формування ADC з цистеїн-інженерними антитілами і лікарськими угрупованнями PBD. Таким чином, розташування лікарського угруповання може бути розроблене, проконтрольоване і відоме. Лікарське завантаження можна контролювати, оскільки інженерні тіолові групи цистеїну, як правило, вступають в реакцію з лінкерними реагентами, здатними реагувати з тіолами, або з реагентами "лікарський засіб - лінкер" з високим виходом. Інженерія антитіла IgG для введення амінокислот цистеїнів шляхом заміщення на одному сайті на важкому або легкому ланцюзі дає два нових цистеїна на симетричному антитілі. Лікарське завантаження із приблизним значенням 2 можна отримати з близькою гомогенністю продукту кон'югації ADC.

Крім того, даний винахід також відноситься до імунокон'югата або кон'югата "антитіло - лікарський засіб", описаного вище, для застосування як лікарський засіб.

Крім того, даний винахід також відноситься до імунокон'югата або кон'югата "антитіло - лікарський засіб", описаного вище, для застосування в лікуванні раку.

Даний винахід відноситься до кон'югата "антитіло - лікарський засіб", описаного вище, для застосування як лікарський засіб. У конкретному втіленні даний винахід відноситься до кон'югата "антитіло - лікарський засіб", описаного вище, для застосування у лікуванні раку. У конкретнішому втіленні даний винахід відноситься до кон'югата "антитіло - лікарський засіб", описаного вище, для застосування у лікуванні раку, експресуючого IGF-1R, або IGF-1R-зв'язаних видів раку.

IGF-1R-зв'язані види раку включають пухлинні клітини, що експресують або надекспресують цілий IGF-1R або його частину на своїй поверхні.

Конкретніше, зазначені види раку включають рак молочної залози, товстої кишки, карциному стравоходу, гепатоцелюлярний рак, рак шлунка, гліому, рак легенів, меланому, остеосаркому, рак яєчників, передміхурової залози, рабдоміосаркому, рак нирки, щитоподібної залози, матки і ендометрію, а також будь-які явища лікарської стійкості.

У іншому своєму аспекті даний винахід відноситься до застосування кон'югата "антитіло - лікарський засіб" згідно з даним винаходом для лікування раку, що експресує IGF-1R.

Іншим об'єктом даного винаходу є фармацевтична композиція, що містить антитіло згідно з даним винаходом або кон'югат "антитіло - лікарський засіб", або імунокон'югат, описаний в

даному документі.

Конкретніше, даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить антитіло згідно з даним винаходом або кон'югат "антитіло - лікарський засіб", або імунокон'югат, описаний вище, і щонайменше ексципієнт і/або фармацевтично прийнятний носій.

5 Даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить антитіло або кон'югат "антитіло - лікарський засіб", описаний вище, і щонайменше ексципієнт і/або фармацевтично прийнятний носій.

У даному описі вираз "фармацевтично прийнятний носій" або "ексципієнт" використовується для позначення сполуки або комбінації сполук, що входять у фармацевтичну композицію, не провокують побічних реакцій, яка, наприклад, полегшує введення активної сполуки (сполук), збільшує тривалість її життя і/або ефективність в організмі, збільшує її розчинність в розчині або покращує її збереження. Ці фармацевтично прийнятні носії і ексципієнти добре відомі і можуть бути адаптовані фахівцем в даній області залежно від природи і способу введення вибраної активної сполуки (сполук).

15 Переважно ці імунокон'югати будуть введені системним шляхом, зокрема, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, внутрішньошкірно, внутрішньоочеревинно або підшкірно, або пероральним шляхом. У більш переважному способі композицію, що містить ці імунокон'югати, вводитимуть кілька разів послідовним чином.

20 Способи введення, дозування і оптимальні фармацевтичні форми можуть бути визначені відповідно до критеріїв, які зазвичай беруться до уваги при розробці лікування, адаптованого до пацієнта, наприклад, до віку або ваги тіла пацієнта, тяжкості його/її загального стану, стійкості до лікування і виявлених побічних ефектів.

У іншому аспекті даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить антитіло згідно з даним винаходом або кон'югат "антитіло - лікарський засіб", або імунокон'югат, описаний вище, і щонайменше ексципієнт і/або його фармацевтично прийнятний носій, для застосування в лікуванні раку. У конкретнішому аспекті даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить антитіло згідно з даним винаходом або кон'югат "антитіло - лікарський засіб", або імунокон'югат, описаний вище, і щонайменше ексципієнт і/або фармацевтично прийнятний носій, для застосування в лікуванні раку, експресуючого IGF-1R.

30 Винахід також відноситься до способу лікування у суб'єкта раку і, зокрема, лікування IGF-1R-експресуючого раку, що включає введення зазначеному суб'єкту ефективної кількості щонайменше кон'югата "антитіло - лікарський засіб" згідно з винаходом.

Даний винахід також відноситься до способу лікування у суб'єкта раку і, зокрема, лікування IGF-1R-експресуючого раку, що включає введення зазначеному суб'єкту ефективної кількості фармацевтичної композиції згідно з винаходом.

35 У іншому втіленні даний винахід відноситься до способу доставки лікарського препарату або медикаменту до IGF-1R-експресуючої ракової клітини у суб'єкта, що включає введення зазначеному суб'єкту ефективної кількості щонайменше кон'югата "антитіло - лікарський засіб" згідно з винаходом або фармацевтичної композиції згідно з винаходом.

40 Інші відмітні ознаки і переваги даного винаходу стануть ясні в продовженні опису з прикладами і графічними матеріалами, підписи до яких надані нижче.

Підписи до графічних матеріалів

Фіг. 1: Приклад профілю зв'язування Biacore, отриманого з 3 антитілами на hIGF-1R ECD, захопленому анти-His-Tag-антитілом.

45 Фіг. 2: Схема картування епітопів, визначених в панелі 15 моноклональних анти-hIGF-1R-антитіл з визначеними 5 групами епітопів. Нумерація груп не пов'язана ні з позицією відносно послідовності, ні з 3D-структурою антигена.

Фіг. 3A-3C: Зв'язування антитіл до людських нативних IGF-1R у FACS-аналізі. Фіг. 3A представляє криву титрування на клітинній лінії MCF-7 одного з химерних анти-IGF-1R-антитіл, репрезентативних для кожної групи кластерів епітопів. MFI є середньою величиною інтенсивності флуоресценції. Фіг. 3B представляє EC<sub>50</sub> як мишачих, так і химерних анти-IGF-1R-антитіл на клітинній лінії MCF-7. Фіг. 3C представляє B<sub>max</sub> химерних анти-IGF-1R-антитіл на клітинній лінії MCF-7.

50 Фіг. 4A і 4B: Оцінка розпізнавання hIGF-1R за допомогою трансфікованих і нетрансфікованих клітин. Фіг. 4A представляє криві титрування одного з химерних анти-IGF-1R-антитіл, репрезентативного для кожної групи кластерів епітопів, на клітинній лінії IGF-1R<sup>+</sup>. MFI є середньою величиною інтенсивності флуоресценції. Фіг. 4B представляє зв'язування одного з химерних анти-IGF-1R-антитіл, репрезентативного для кожної групи кластерів епітопів, на людській лінії клітин IGF-1R<sup>-</sup>. MFI є середньою величиною інтенсивності флуоресценції.

60 Фіг. 5A і 5B: Оцінка специфічності антитіл проти hIGF-1R і hIR з використанням

трансфікованих клітин. Фіг. 5A представляє зв'язування мишачого анти-IGF-1R-антитіла на hIR<sup>+</sup>-трансфікованій клітинній лінії. Фіг. 5B представляє зв'язування химерного анти-IGF-1R-антитіла на IR<sup>+</sup> клітинній лінії. MFI є середньою величиною інтенсивності флуоресценції. У панелі A і B комерційно доступне анти-hIR-антитіло, описане як GRO5 (Calbiochem), було введено як позитивний контроль.

Фіг. 6: Зв'язування мишачого анти-IGF-1R-антитіла на клітинній лінії IM-9. MFI є середньою величиною інтенсивності флуоресценції. Анти-hIR-MKA GRO5 було введено як позитивний контроль.

Фіг. 7A, 7B і 7C: Оцінка розпізнавання мавпячого IGF-1R. Фіг. 7A представляє криві титрування одного з химерних анти-IGF-1R-антитіл, репрезентативного для кожної групи кластерів епітопів, на клітинній лінії COS-7. MFI є середньою величиною інтенсивності флуоресценції. Фіг. 7B представляє EC<sub>50</sub> як мишачих, так і химерних анти-IGF-1R-антитіл на клітинній лінії COS-7. Фіг. 7C представляє EC<sub>50</sub> химерних анти-IGF-1R-антитіл як на hIGF-1R<sup>+</sup>-трансфікованих клітинах, так і на клітинах COS-7. GR11L (Calbiochem) був введений як позитивний контроль.

Фіг. 8: Порівняння зв'язування c208F2 з hIGF-1R ECD або з hIGF-1R ECD яванського макака з використанням аналізу Біасоре. Сенсограми, отримані за допомогою Біасоре X100 на основі технології поверхневого плазмонного резонансу (SPR), використовуючи сенсорний чіп CM5, активований більше 11000 резонансних одиниць (PO) мишачого анти-Tag His-антитіла, хімічно прищепленого до карбоксиметилдекстранової матриці. Експеримент проводять при швидкості потоку 30 мкл/хв при 25 °C з використанням HBS-EP+ як робочого буфера і буфера для розведення зразків. На цій фіг. представлено накладення 4 незалежних сенсограм, вирівняних на осі x за початком першого введення речовин, які аналізують, і на осі y за базальним рівнем, визначеним безпосередньо перед цим першим введенням. Сенсограми, отримані при захопленні послідовності на основі людського рекомбінантного розчинного IGF-1R, позначені ромбами. Сенсограми, отримані при захопленні послідовності на основі рекомбінантного розчинного IGF-1R яванського макака, позначені трикутниками. Білі символи відповідають порожнім циклам (5 введень робочого буфера), а чорні символи відповідають введенням зростаючого діапазону концентрацій c208F2 (5, 10, 20, 40 і 80 нм).

Фіг. 9: Оцінка власного впливу анти-hIGF-1R-антитіл на фосфорилування рецептора порівняно з IGF1.

Фіг. 10: Інгібування фосфорилування IGF-1R у відповідь на IGF-1 мишачим анти-hIGF-1R.

Фіг. 11: Зв'язування анти-IGF-1R-антитіл на клітинній поверхні пригнічується при температурі 37 °C. Клітини MCF-7 інкубували при 4 °C або при 37 °C протягом 4 годин з 10 мкг/мл кожного антитіла. Фігура представляє ΔMFI.

Фіг. 12A і 12B: Розпад антитіла на поверхні. Антитіло, зв'язане з поверхнею клітини, оцінювали через 10, 20, 30, 60 і 120 хв при 37 °C. На фіг. 12A представлений % від IGF-1R, що залишилося, порівняно з інтенсивністю сигналу, виміряного при температурі 4 °C. Фіг. 12B представляє обчислення періоду напівжиття за допомогою програмного забезпечення Prims Software і з використанням налаштувань експоненціального розпаду.

Фіг. 13: Кінетика інтерналізації антитіл, яку оцінювали шляхом FACS-аналізу. Клітини інкубували з 10 мкг/мл мишачих антитіл протягом 0, 30 або 60 хв при 37 °C. Клітини пермеабілізували або не пермеабілізували і інкубували з вторинним протимишачим антитілом IgG, кон'югованим з Alexa 488. Мембранне значення відповідає інтенсивності сигналу без пермеабілізації, а загальне значення відповідає сигналу інтенсивності після клітинної пермеабілізації, а цитоплазматичне значення відповідає інтерналізованому антитілу. Назву кожного оцінюваного антитіла приведено у верхній частині кожного графіка.

Фіг. 14A і 14B: Візуалізація інтерналізації антитіла. Фіг. 14a: клітини MCF-7 інкубували з m208F2 протягом 20 хв при 4 °C і промивали перед інкубацією [a)] при 37 °C протягом 15 [b)], 30 [c)] і 60 [d)] хвилин. Клітини фіксували і пермеабілізували. Антитіло m208F2 виявляли за допомогою протимишачого IgG-антитіла, кон'югованого з Alexa 488, а Lamp-1 виявляли за допомогою кролячого анти-Lamp-1-антитіла і вторинного протикролячого IgG, кон'югованого з Alexa 555. Фіг. 14B (частини з I по III): клітини MCF-7 інкубували протягом 30 хвилин при 37 °C з кожним з інших мишачих анти-hIGF-1R-антитіл, які аналізували, а потім забарвлювали, як описано вище. Колокалізацію ідентифікували за допомогою плагіна для виділення колокалізації в програмному забезпеченні Image J.

Фіг. 15: Участь лізосомального шляху у деградації антитіл.

Фіг. 16: Оцінка зв'язування мишачих анти-hIGF-1R-антитіл при різних значеннях pH. EC<sub>50</sub> зв'язування різних антитіл оцінювали на MCF-7 з використанням буфера з різним pH в діапазоні від 5 до 8.



Фіг. 17: Оцінка здатності вибраних анти-IGF-1R-антитіл індукувати цитотоксичність в аналізі Fab-ZAP. А) Клітини MCF-7 інкубували зі зростаючими концентраціями химерних анти-IGF-1R-антитіл у поєднанні з набором для людського Fab-ZAP. Життєздатність клітин вимірювали з використанням люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo®. Химерне антитіло c9G4 використовували як нерелевантне антитіло. В) IC<sub>50</sub> з результатів, зображених на А).

Фіг. 18: Кореляція між i) цитотоксичною активністю, ii) впливом pH на зв'язування антитіло/IGF-1R, iii) впливом антитілу на IGF-1-індуковане фосфорилування IGF-1R і iv) кластеризацією антитілу.

Фіг. 19A-19D: Зв'язуюча характеристика першої гуманізованої форми MKA c208F2. Зв'язуючі властивості MKA hz208F2 VH3/VL3 оцінювали на людській клітинній лінії MCF-7 (фіг. 19A), на мавпячій клітинній лінії COS-7 (фіг. 19B) і на трансфікованій мишачій клітинній лінії, що експресує рецептор людського інсуліну (фіг. 19C). Зв'язування як мишачих, так і химерних MKA 208F2 оцінювали паралельно. Клон анти-hIR-антитіла GRO5 використовували для перевірки експресії hIR на трансфікованій клітинній лінії (фіг. 19D).

Фіг. 20A-20D: ELISA-валідація поліклонального антитіла AF305-NA, яке було використане для IHC-аналізів (тобто імуногістохімічних аналізів). Фіг. 20A: Зв'язування з hIGF-1R. Фіг. 20B: Зв'язування з людським рекомбінантним IR. Немає розпізнавання hIR EDC і клітинного IR, експресованого трансфікованими клітинами (фіг. 20D) порівняно з контрольним антитілом GRO5 на цих hIR-трансфікованих клітинах (фіг. 20C).

Фіг. 21: Валідація забарвлення hIGF-IR на FFPE-зрізах (тобто зафіксованих у формаліні і залитих парафіном) ксенотрансплантатів, що експресують різні рівні hIGF-1R. Hs746T було введено як негативний контроль.

Фіг. 22A і 22B: Оцінка експресії hIGF-IR на FFPE-зрізах нормальних тканин. Зрізи плаценти були використані як позитивний контроль для нормальних тканин, а позитивні пухлинні тканини ксенотрансплантатів були введені у кожний цикл, щоб відкалібрувати експресію hIGF-IR.

Фіг. 23: Оцінка експресії hIGF-IR на FFPE-зрізах тканини NSCL (недрібноклітинного раку легені). Чотири випадки, які є репрезентативними для сильного забарвлення, спостережуваного у великій панелі проаналізованих тканин.

Фіг. 24: Оцінка експресії hIGF-IR на FFPE-зрізах тканини раку молочної залози. Три випадки, які є репрезентативними для сильного забарвлення, спостережуваного в тестованій панелі проаналізованих тканин.

Фіг. 25: Оцінка експресії hIGF-IR на FFPE-зрізах тканин різних пухлин.

Фіг. 26: Суміщення сенсограм, отриманих за допомогою пристрою Biacore X100 на основі SPR при температурі 25 °C з сенсорним чіпом CM5, активованим на обох проточних комірках за допомогою приблизно 12000 РО мишачих моноклональних анти-His-Tag-антитіл, хімічно прищеплених до карбоксиметилдекстранової матриці, з використанням HBS-EP+ в якості робочого буфера при швидкості потоку 30 мкл/хв. Кожна сенсограма (перша позначена трикутниками, а друга позначена ромбами) відповідає повному циклу:

1 - введення протягом однієї хвилини розчину рекомбінантного h-IGF-1R (10 мкг/мл) у другу проточну комірку.

2 - для першої сенсограми: 5 введень робочого буфера, кожне по 90 с.

- для другої сенсограми: п'ять введень розчинів анти-IGF-1R-антитіла c208F2 із зростаючим діапазоном концентрацій, кожне по 90 с.

3 - затримка 300 с для визначення кінетичних швидкостей дисоціації.

4 - регенерація поверхні за допомогою введення буфера з 10 mM гліцином, HCl pH 1,5, протягом 45 с.

Фіг. 27: Сенсограма, що відповідає відніманню фонові сенсограми (5 введень HBS-EP+) з сенсограми, отриманої з розчинами анти-IGF-1R-антитіла c208F2 із зростаючим діапазоном концентрацій, показана в сірому кольорі. Теоретична сенсограма, що відповідає моделі 1:1 з наступними параметрами:  $k_{on} = (1,206 \pm 0,036) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ,  $k_{off} = (7,81 \pm 0,18) \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ ,  $R_{max} = 307,6 \pm 0,3 \text{ РО}$  показана тонкою чорною лінією. Розраховані концентрації c208F2 показані на графіку: лише найвища концентрація (24 нМ) розглядається як константа.

Фіг. 28: Константи дисоціації відповідають середньому значенню від чотирьох експериментів для кожного антитіла і відповідають співвідношенню:  $k_{off}/k_{on} \times 10^{12}$ , будучи вираженими в одиницях "нМ". Столпці помилок відповідають стандартній помилці (n дорівнює 4). Фіг.

29: Періоди напівжиття відповідають середньому значенню від чотирьох експериментів для кожного антитіла і відповідають співвідношенню:  $\text{Ln}(2)/k_{off}/3600$ , будучи вираженими в одиницях "год". Столпці помилок відповідають стандартній помилці (n дорівнює 4).

Фіг. 30: Суміщення двох сенсограм, що відповідають двом циклам експерименту, проведеним на пристрої Biacore X100 при швидкості потоку 30 мкл/хв і при 25 °C.

Перший етап циклу відповідає введенню розчину антитіла c208F2 у концентрації 10 мкг/мл протягом 60 с у другу проточну комірку мікрочіпа CM5, активованого приєднанням більше ніж 10500 РО мишачого моноклонального антитіла проти людського Fc IgG, хімічно зв'язаного з карбоксиметилдекстрановою матрицею за рахунок його функціональних аміно-груп. Другий етап

відповідає введенню розчинів позаклітинного домену або h-IGF-1R (заштриховані ромби), або m-IGF-1R (незаштриховані ромби) з неочищених клітинних культуральних супернатантів протягом 120 секунд із затримкою 120 секунд. Двонаправлені стрілки вказують точки вимірювання рівня захоплення антитіла і рівня зв'язування IGF-1R, використовувані в даному дослідженні.

Фіг. 31: Гістограми, що представляють співвідношення рівня зв'язування IGF-1R, отриманого для кожної з химерних h/m IGF-1R-конструкцій, і рівня c208F2, захопленого на другій проточній комірці на сенсорному чіпі протягом відповідного циклу.

Фіг. 32A і B: Гістограми, що представляють EC<sub>50</sub> для hz208F2 H076/L024 при значеннях pH від 5 до 8, кислий pH знижує зв'язувальну здатність гуманізованих IGF-1R-антитіл hz208F2 H076/L024 (A) і hz208F2 H077/L018 (B).

Фіг. 33: Зв'язування hz208F2 (10 мкг/мл) на 170 РО розчинної версії h-IGF1R дикого типу (чорний ромб) або на 120 PE мутанта C29 (Asp491>Ala) цього рецептора. Кожний рецептор був захоплений на сенсорному чіпі CM5 через його C-кінцеву 66His-мітку. Експеримент проводили на пристрої Biacore X100 при 25 °C зі швидкістю потоку 30 мкл/хв з використанням класичного HBS-EP+ як робочого буфера.

#### Приклади

Всі гібридоми, згадані в даному винаході, збережені у CNCM (Інститут Пастера, Франція) і вказані в таблиці 7.

Таблиця 7

Назва гібридоми	CNCM №	Дата
101H8	I-4733	24 квітня 2013
201F1	I-4769	26 червня 2013
208F2	I-4757	30 травня 2013
212A11	I-4773	26 червня 2013
214F8	I-4775	26 червня 2013
219D6	I-4736	24 квітня 2013
213B10	I-4774	26 червня 2013
102H8	I-4767	26 червня 2013
110G9	I-4768	26 червня 2013
415A8	I-4778	26 червня 2013
410G4	I-4777	26 червня 2013
414E1	I-4738	24 квітня 2013
433H9	I-4780	26 червня 2013
105G2	I-4735	24 квітня 2013
832E5	I-4765	30 травня 2013

#### Приклад 1: Створення IGF-1R-антитіл

Для створення мишачих моноклональних антитіл (МКА) проти позаклітинного домену (ECD) людського рецептора IGF-1 (hIGF-1R) 5 мишей BALB/c імунізували 3 рази підшкірно 10 мкг білка rhIGF-1R (R&D Systems, кат. № 391-GR). Як альтернатива, деяким тваринам були виконані три додаткові імунізації з використанням 10 мкг мишачого позаклітинного домену (ECD) IGF-1R (R&D Systems, кат. № 6630-GR/Fc). Першу імунізацію проводили у присутності повного ад'юванта Фрейнда (Sigma, Сент-Луїс, Меріленд, США). До наступних імунізацій додавали неповний ад'ювант Фрейнда (Sigma). За три дні до злиття імунізованих мишей бустували з використанням 10 мкг білка rhIGF-1R. Потім отримували спленоцити і лімфоцити шляхом перфузії селезінки і подрібнення проксимальних лімфатичних вузлів, відповідно, зібраних від 1 з 5 імунізованих мишей (вибраної після титрування сироваток всіх мишей), і зливали їх з клітинами міеломи SP2/0-Ag14 (ATCC, Роквілл, Меріленд, США). Протокол злиття описаний Kohler і Milstein (Nature, 256:495-497, 1975). Потім гібридні клітини піддавали НАТ-селекції (селекції з використанням гіпоксантину, аміноптерину і тимідину). Як правило, для отримання моноклональних антитіл або їх функціональних фрагментів, особливо мишачого походження, можна звернутися до методик які описані, зокрема, в керівництві "Antibodies" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726,

1988). Приблизно через 10 днів після злиття колонії гібридних клітин піддавали скринінгу. Для первинного скринінгу супернатанти гібридом оцінювали на предмет секреції МКА, вироблених проти білка rhIGF-1R ECD, за допомогою FACS-аналізу з використанням клітин людської пухлини молочної залози MCF7 (ATCC) і/або клітин мавпи COS7 (клітини нирки африканської зеленої мавпи, трансформовані SV40), які експресують мавпячий IGF-1R на своїй клітинній поверхні. Точніше, для відбору за допомогою проточної цитометрії  $10^5$  клітин (MCF7 або COS7) висівали в кожну лунку 96-лункового планшета в PBS, що містить 1% BSA і 0,01% азид натрію (FACS-буфері), при 4 °C. Після 2 хв центрифугування при 2000 об/хв буфер видаляли і додавали гібридомні супернатанти, які потрібно було проаналізувати. Через 20 хв інкубації при температурі 4 °C клітини двічі промивали і додавали Alexa 488-кон'юговане цапине протимишаче антитіло, розведене 1/500 у FACS-буфері (№ A11017, Molecular Probes Inc., Юджін, США), і інкубували протягом 20 хв при температурі 4 °C. Після фінального промивання FACS-буфером клітини аналізували за допомогою FACS (FACSCalibur, Becton-Dickinson) після додавання пропідію йодиду в кожну пробірку в кінцевій концентрації 40 мкг/мл. Лунки, що містять лише клітини, і лунки, що містять клітини, інкубовані з вторинним Alexa 488-кон'югованим антитілом, були включені як негативні контролю. Ізотипічні контролю використовували в кожному експерименті (Sigma, № M90351MG). Для обчислення середнього значення інтенсивності флуоресценції (MFI) оцінювали щонайменше 5000 клітин.

Крім того, проводили аналіз інтерналізації для того, щоб вибрати тільки інтерналізовані антитіла. Для цього аналізу лінію пухлинних клітин MCF7 культивували в RPMI 1640 без фенолу червоного, з 1% L-глутаміном і 10% FACS протягом 3 днів до початку експерименту. Потім клітини відокремлювали за допомогою трипсину, і 100 мкл клітинної суспензії зі щільністю  $4 \times 10^5$  клітин/мл висівали в 96-лункові планшети в RPMI 1640 без фенолу червоного, з 1% L-глутаміном і 5% FBS. Після 2 хв центрифугування при 2000 об/хв клітини ресуспендували у 50 мкл гібридомного супернатанту або розчинів контрольних антитіл (позитивні і ізотипічні контролю у концентрації 1 мкг/мл). Після інкубації протягом 20 хв при 4 °C клітини центрифугували 2 хв при 2000 об/хв і ресуспендували або в холодному (4 °C), або в теплому (37 °C) повному культуральному середовищі. Потім клітини інкубували протягом 2 годин або при 37 °C, або при 4 °C. Потім клітини промивали три рази FACS-буфером. Alexa 488-мічене цапине протимишаче IgG антитіло інкубували протягом 20 хв і клітини промивали три рази перед FACS-аналізом популяції клітин, негативних при забарвленні пропідію йодидом.

Після FACS-аналізу визначали два параметри: (i) різницю флуоресцентного сигналу, виявленого на поверхні клітин, інкубованих при 4 °C, і сигналу, отриманого з клітинами, інкубованими при 37 °C, з супернатантом однієї гібридоми і (ii) відсоток IGF-1R, що залишився, на поверхні клітини.

Відсоток hIGF-1R, що залишився, обчислюється так:

$$\% \text{ IGF-1R, що залишився} = (\text{MFI}_{\text{при } 37^\circ\text{C}} / \text{MFI}_{\text{при } 4^\circ\text{C}}) \times 100$$

Крім цього, проводили три ELISA (або до, або після клонування) для вивчення зв'язування антитіл з рекомбінантним людським (hIGF-1R) і мишачим (mIGF-1R) білками, а також з білком рекомбінантного людського рецептора інсуліну (hIR). Зберігали гібридоми, секретуючі антитіла, які демонстрували зв'язування з rh-, і/або rm-IGF-1R і не зв'язувалися з rhIR. Коротко, 96-лункові планшети для ELISA (Costar 3690, Corning, Нью-Йорк, США) покривали 100 мкл/лунка або розчину білка rhIGF-1R (R&D Systems, кат. № 391-GR) з концентрацією 0,6 мкг/мл, або розчину білка rmIGF-1R (R&D Systems, кат. № 6630-GR/FC) з концентрацією 1 мкг/мл, або розчину білка rhIR (R&D Systems, кат. № 1544-, IR/CF) з концентрацією 1 мкг/мл у PBS протягом ночі при температурі 4 °C. Потім планшети блокували за допомогою PBS, що містить 0,5% желатин (№ 22151, Serva Electrophoresis GmbH, Гейдельберг, Німеччина) протягом 2 годин при 37 °C. Відразу після видалення буфера насичення шляхом струшування планшетів, в лунки додавали по 100 мкл кожного розведення супернатанту (або нерозведеного супернатанту від гібридоми, або серійних розведень супернатантів) і інкубували протягом 1 години при 37 °C. Після трьох промивань додавали 100 мкл кон'югованого з пероксидазою хрину поліклонального цапиного протимишачого антитіла IgG (№ 115-035-164, Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc., Вест-Гров, Пенсильванія, США) у розведенні 1/5000 в PBS, що містить 0,1% желатин і 0,05% Tween 20 (за масою) на 1 годину при температурі 37 °C. Потім ELISA-планшети промивали 3 рази і додавали субстрат TMB (№ UP664782, Uptima, Interchim, Франція). Після 10-хвилинного періоду інкубації при кімнатній температурі реакцію зупиняли за допомогою 1 M сірчаної кислоти і вимірювали оптичну щільність при довжині хвилі 450 нм.

Гібридому, секретуючу антитіло, яке представляє інтерес, розмножували і клонували шляхом серійних розведень. Після ізоціювання один клон кожного коду розмножували і заморожували. Кожне антитіло, що представляє інтерес, отримували в системах продукції in

in vitro під назвою CellLine (Integra Biosciences) для подальшої характеристики.

Додаткові аналізи для визначення специфічності зв'язування проводили за допомогою FACS-аналізу на клітинах IM9 (людські IR-експресуючі В-лімфобласти), а також на hIGF-1R-трансфікованих клітинах у порівнянні з нетрансфікованими клітинами.

Усі дані, що відповідають вибраним антитілам, підсумовані в таблиці 8. Цікаво зазначити, що серед антитіл, вибраних i) на підставі їх селективності по відношенню до hIGF-1R порівняно з hIR і ii) на підставі їх здатності індукувати інтерналізацію IGF-1R, деякі були здатні розпізнавати свою мішень як в ELISA, так і в FACS-умовах, тоді як інші дуже добре зв'язувалися при дослідженні за допомогою цитометрії і дуже погано зв'язувалися при дослідженні шляхом ELISA. m280F2, m212A11, m213B10, m214F8 і m219D6 належать до цієї останньої групи, яка добре не розпізнає білок, зв'язаний з планшетом для ELISA.

Таблиця 8

	Назва гібридоми	ELISA (SNT at 5 µg/ml) D.O 450 nm			Аналіз інтерналізації (АТ при 5 мкг/мл)				FACS (АТ при 5 мкг/мл)			
		rh IGF-1R	m IGF-1R	rh рецептор інсуліну	MFI		% rhIGF1R, що лігандується	Δ (MFI 4°C - MFI 37°C)	MFI			
					4°C	37°C			IM9 (h IR*)	COS7 (мавіячі rhIGF1R*)	Tf hIGF1R*	нетрансф. клітина (rhIGF1R*)
1	101H8	1.552	0.115	0.125	373	128	34	246	9	145	1902	10
2	102H8	1.988	0.136	0.130	360	140	39	220	10	136	2026	10
3	105G2	2.409	0.166	0.205	301	114	38	187	9	114	1673	11
4	110G9	1.989	0.133	0.153	396	126	32	270	10	146	2208	7
5	201F1	1.756	0.165	0.156	357	81	23	276	8	119	1987	15
6	208F2	0.163	0.099	0.140	355	94	27	261	4	106	2197	22
7	212A11	0.232	0.102	0.141	390	106	27	284	7	125	2187	23
8	213B10	0.399	0.127	0.110	386	115	30	271	7	122	2055	23
9	214F8	0.349	0.102	0.115	386	111	29	275	7	132	2137	20
10	219D6	0.329	0.112	0.106	349	106	30	243	7	114	2110	21
11	410G4	2.937	0.135	0.095	619	229	37	390	11	158	2260	34
12	414E1	3.009	0.099	0.093	729	188	26	540	13	204	2740	36
13	415A8	3.044	0.107	0.089	727	174	24	553	12	188	2960	32
14	433H9	3.104	0.154	0.131	617	153	25	464	13	206	2590	24
15	832E5	1.854	0.107	0.048	134	82	61	52	5	24*	nd	nd
15	mlgG1	0.093	0.116	0.127	9	8	94	1	5	14	24	22

\*FACS проведено з використанням очищеного антитіла

\*FACS проведено з використанням очищеного антитіла

Приклад 2: Характеристика кластеризації епітопів анти-IGF-1R-антитіла в експериментах з картування з використанням технології BIAcore на основі SPR

Щоб вивчити різноманітність відповідей проти IGF-1R, вибрані антитіла картували за допомогою BIAcore і виконували кластеризацію цих антитіл згідно з конкурентними властивостями.

Коротко, експерименти з картування епітопів проводили на пристрої BIAcore X з використанням сенсорного чіпа CM5, активованого анти-His-Tag-антитілом (набір His Capture Kit від GE Healthcare, кат. номер 28-9950-56). Більше ніж 11000 РО антитіл хімічно приєднували до карбоксиметилдекстранової матриці з використанням набору для амінової хімічної реакції. Експерименти проводили при 25 °C зі швидкістю потоку 1 мкл/хв з використанням буфера HBS-EP (GE Healthcare) як робочого буфера і буфера для розведення зразків.

Експеримент з картування епітопів проводили за тією ж схемою:

1 - Розчин розчинного варіанту гетеротетрамеру hIGF-1R (ланцюги 2α і позаклітинні домени ланцюгів 2β, експресовані з додатковою С-кінцевою 10-His-міткою (R&D Systems, каталожний номер 305-GR)) вводять у концентрації 5 мкг/мл з розрахунку на обидві проточні комірки протягом 1 хвилини.

2 - Потім розчин анти-hIGF-1R-антитіла, яке аналізують, (класично 50 мкг/мл) вводять тільки в проточну комірку 1 протягом 60-90 секунд, щоб досягти насичення сайтів зв'язування hIGF-1R (або хоча б наблизитися до цього).

3 - Розчин другого антитіла, використовуюваного як потенційний конкурент, вводять в тих самих умовах або в обидві проточні комірки, або тільки в другу проточну комірку.

4 - Нарешті, розчин третього антитіла може бути введений в тих самих умовах в обидві проточні комірки.

5 - Потім поверхню регенерують введенням буфера з 10 мМ гліцином, HCl, pH 1,5, протягом 30 с.

Цей тип експерименту ясно показує, чи можуть два антитіла зв'язуватися одночасно з однією і тією ж молекулою hIGF-1R, демонструючи, що зв'язуючі області (епітопи) кожного антитіла досить віддалені одна від одної, щоб дозволити це. Навпаки, якщо зв'язування антитіла з hIGF-1R запобігає зв'язуванню другого антитіла, то припускається, що обидва антитіла розпізнають один і той же епітоп. Нарешті, у разі часткової конкуренції можна запідозрити перекривання епітопів, розпізнаваних двома антитілами, які аналізують. Таким чином визначаються групи областей епітопів. Складність результату, зазвичай, зростає із збільшенням розміру панелі антитіл, використовуваних у експерименті.

На фіг. 1 приведений приклад типового циклу експерименту з картування епітопів з використанням пристрою Bioscye X на основі SPR. Сенсограми показують відповідь (РО - у резонансних одиницях) як функцію від часу (у секундах) на проточній комірці 1 (чорні ромби) і 2 (білі ромби). У фазі 1 розчин антигена - розчинний рекомбінантний hIGF-1R з двома C-кінцевими 10-His-мітками - вводиться в обидві проточні комірки сенсорного чіпа CM5 з мишачим анти-His-Tag-антитілом, хімічно зв'язаним з карбоксиметилдекстрановою матрицею, у концентрації 5

мкг/мл і зі швидкістю потоку 10 мкл/хв. У фазі 2 розчин першого антитіла (219D6), яке аналізують, у концентрації 50 мкг/мл вводять у проточну комірку 1. Потім у фазі 3 розчин другого антитіла (101H8) у концентрації 50 мкг/мл вводять у проточну комірку 2, а потім у фазі 4 вводять розчин третього антитіла (201F1) у концентрації 50 мкг/мл в обидві проточні комірки. Відповідь на це введення ясно показує, що зв'язування 201F1 з IGF-1R запобігається антитілом 101H8, але не антитілом 219D6. Антитіла 201F1 і 219D6, вочевидь, належать до різних груп епітопів. Кластеризація, що приводить до цілого аналізу 15 відібраних кандидатів, описана на фіг. 2, і показано, що імунізація мишей hIGF-1R дає підвищення серії антитіл, що демонструють хорошу різноманітність. Дійсно, були отримані 5 різних груп моноклональних антитіл, що розпізнають різні епітопи.

Приклад 3: Зв'язування антитіл з людським нативним IGF-1R у FACS-аналізах

Зв'язувальні властивості серії анти-IGF-1R-антитіл оцінювали за допомогою FACS-аналізів на клітинній лінії людської аденокарциноми молочної залози MCF-7 (ATCC № HTB-22) з використанням зростаючих концентрацій антитіла. З цією метою клітини ( $1 \times 10^6$  клітин/мл) інкубували з анти-IGF-1R-антитілами протягом 20 хв при 4 °C у FACS-буфері (PBS, 0,1% BSA, 0,01% NaN<sub>3</sub>). Потім їх промивали 3 рази і інкубували з відповідним вторинним антитілом, кон'югованим з Alexa 488, протягом 20 додаткових хвилин при 4 °C у темряві, а потім промивали 3 рази FACS-буфером. Зв'язування анти-IGF-1R-антитіл негайно проводили на життєздатних клітинах, які ідентифікували за допомогою пропідію йодиду (який забарвлює мертві клітини). Максимум інтенсивності сигналу, отриманий з кожним антитілом, позначали як  $V_{max}$  і виражали в середній інтенсивності флуоресценції (MFI).  $EC_{50}$  зв'язування виражали в молярності (M), яку розраховували за допомогою нелінійного регресійного аналізу (GraphPad Prims 4.0).

Криві титрування кожного мишачого або химерного антитіла показали, що усі створені антитіла здатні розпізнавати нативну форму IGF-1R з типовим профілем насичення (фіг. 3A). Для того, щоб ранжирувати антитіла і порівняти зв'язувальні властивості мишачих і химерних антитіл, для кожної сполуки визначали  $EC_{50}$  зв'язування з використанням нелінійного регресійного аналізу. Порівняння  $EC_{50}$  кожного мишачого антитіла з  $EC_{50}$  його відповідної химерної форми показало, що дві форми демонстрували ті самі зв'язувальні властивості, показуючи, що химеризація антитіла не впливала на розпізнавання IGF-1R (фіг. 3B).  $EC_{50}$  коливалися в діапазоні від  $1,2 \times 10^{-8}$  до  $4,4 \times 10^{-10}$ . Антитіла, що належать до групи 2, і c102H8, що належить до групи 3A, показали кращу  $EC_{50}$ . Що стосується аналізів  $V_{max}$  (фіг. 3C), три антитіла (414E1 (G3B), 105G2 (G4) і 832E5 (G5)) мали нижчий  $V_{max}$  порівняно з іншими. Значення  $V_{max}$  і  $EC_{50}$  підсумовані в таблиці 9.

Таблиця 9

Група	Антитіло	$V_{max}$	$EC_{50}(M)$
G1	c101H8	905	2,8E-09
G3a	c102H8	951	8,5E-10
G4	c105G2	805	4,9E-09
G3a	c110G9	992	1,4E-09
G1	c201F1	936	1,5E-08
G2	c208F2	981	6,7E-10
G2	c212A11	991	6,7E-10
G2	c214F8	1069	5,0E-10
G2	c219D6	993	4,7E-10
G2	c213B10	1103	4,4E-10
G3b	c410G4	1020	2,6E-09
G3b	c414E1	795	6,0E-09
G3a	c415A8	1142	1,6E-09
G3b	c433H9	1032	1,7E-09
G5	c832E5	691	1,2E-08

Приклад 4: Підтвердження специфічності антитіл з використанням IGF-1R- або IR-

трансфікованих клітин або клітин IM9, які природним чином експресують суттєві рівні IR

Для того, щоб підтвердити специфічність створених антитіл відносно hIGF-1R порівняно з hIR, стабільні трансфектанти, що експресують або hIGF-1R, або hIR, оцінювали за допомогою FACS-аналізу. Коротко, зростаючі концентрації химерних моноклональних антитіл інкубували з клітинами протягом 20 хв при 4 °C у FACS-буфері (PBS, 0,1% BSA, 0,01% NaN<sub>3</sub>). Потім клітини промивали 3 рази і інкубували з відповідним вторинним антитілом, кон'югованим з Alexa 488, і інкубували протягом 20 додаткових хвилин при 4 °C у темряві, а потім промивали 3 рази у FACS-буфері. EC<sub>50</sub> зв'язування виражали в молярності (M), яку розраховували за допомогою нелінійного регресійного аналізу (GraphPad Prims 4.0).

Криві титрування, отримані на клітинній лінії, трансфікованій hIGF-1R (фіг. 4A), порівняно з нетрансфікованими клітинами (фіг. 4B) підтвердили специфічність зв'язування химерних антитіл з людським IGF-1R. Значення B<sub>max</sub> і EC<sub>50</sub> підсумовані в таблиці 10. У цьому аналізі антитіла з груп G2 і G3a показали кращі EC<sub>50</sub>.

Таблиця 10

Група	Антитіло	B <sub>max</sub>	EC <sub>50</sub> (M)
G1	c101H8	2107	1,2E-09
G1	C201F1	2500	1,1E-08
G2	C208F2	2008	3,2E-10
G2	C212A11	2513	4,4E-10
G2	C214F8	2094	2,7E-10
G2	C219D6	2521	5,5E-10
G2	C213B10	2029	3,3E-10
G3a	C102H8	2594	5,4E-10
G3a	C110G9	2189	5,2E-10
G3a	c415A8	2728	7,0E-10
G3b	c410G4	1667	7,1E-10
G3b	c414E1	2265	1,9E-09
G3b	c433H9	2165	6,5E-10
G4	c105G2	2396	1,7E-09
G5	c832E5	1998	7,3E-09

Для того, щоб підтвердити відсутність зв'язування мишачих і химерних антитіл з hIR, використовували клітинну лінію, стабільно експресуючу людський IR. Розпізнавання людського hIR клітинної поверхні як мишачим, так і химерним антитілом проводили шляхом FACS-аналізів. Зростаючі концентрації мишачих або химерних моноклональних антитіл інкубували з hIR<sup>+</sup>-трансфікованою клітинною лінією протягом 20 хв при 4 °C у FACS-буфері (PBS, 0,1% BSA, 0,01% NaN<sub>3</sub>). Потім клітини промивали 3 рази і інкубували з відповідним вторинним антитілом, кон'югованим з Alexa 488, і інкубували протягом 20 додаткових хвилин при 4 °C у темряві, а потім промивали 3 рази у FACS-буфері. Зв'язування анти-IGF-1R-антитіл негайно проводили на життєздатних клітинах, які ідентифікували за допомогою пропідію йодиду (який забарвлює мертві клітини). EC<sub>50</sub> зв'язування виражали в молярності (M), яку обчислювали за допомогою нелінійного регресійного аналізу (GraphPad Prims 4.0). Комерційне специфічне анти-IGF-1R-антитіло, клон GR11L, і анти-hIR-антитіло, клон GRO5, використовували як позитивні контролю. c9G4 вводили як нерелевантне антитіло (ізотипічний контроль).

Високий рівень експресії hIR на клітинній поверхні трансфікованих клітин підтверджували з використанням комерційного анти-hIR-антитіла GRO5. Навіть з використанням високих концентрацій або мишачого (фіг. 5A), або химерного (фіг. 5B) анти-hIGF-1R-антитіл ніякого зв'язування на клітинній поверхні hIR<sup>+</sup>-трансфікованих клітин не спостерігалось. Ці результати показали, що ні мишачі, ні химерні анти-hIGF-1R-антитіла не розпізнають hIR.

Ця специфічність розпізнавання hIGF-1R порівняно з IR також була продемонстрована з використанням клітин IM9, клітинної лінії В-лімфоми, яка експресує hIR (фіг. 6). Для цього FACS-аналізу протокол був такий самий, як описаний вище, а мишачі анти-IGF-1R-антитіла використовували для того, щоб запобігти перехресній реактивності вторинного протилюдського антитіла (клітини IM9 експресують людський імуноглобулін на своїй клітинній поверхні). Результати, представлені на фіг. 6, ще раз показали, що очікуваний сигнал спостерігався при використанні анти-hIR-антитіла GRO5, тоді як жодне з оцінюваних мишачих антитіл не демонструвало будь-якого істотного сигналу зв'язування на цій клітинній лінії.

Приклад 5: Зв'язування антитіла с нативним мавпячим IGF-1R в аналізах FACS і Biacore

Однією з перших передумов для контрольних токсикологічних досліджень є виявлення релевантного виду тварини для оцінки вибраної сполуки. Оскільки серія антитіл, описаних в цьому документі, не здатна розпізнавати мишачий IGF-1R, то, швидше за все, видом для токсикологічної оцінки буде примат, що не є людиною (non human primate, NHP).

Для того, щоб оцінити зв'язування анти-IGF-1R-антитіл з мавпячим IGF-1R, оцінювали зв'язування як мишачих, так і химерних анти-hIGF-1R-антитіл за допомогою FACS-аналізу на лінії клітин COS-7 з використанням зростаючих концентрацій антитіл. Клітини ( $1 \times 10^6$  клітин/мл) інкубували з анти-IGF-1R-антитілами протягом 20 хвилин при  $4^\circ\text{C}$  у FACS-буфері (PBS, 0,1% BSA, 0,01%  $\text{NaN}_3$ ). Потім клітини промивали 3 рази і інкубували з відповідним вторинним антитілом, кон'югованим з Alexa 488, а потім інкубували протягом 20 додаткових хвилин при  $4^\circ\text{C}$  у темряві, і потім промивали 3 рази у FACS-буфері. Зв'язування анти-IGF-1R-антитіл негайно проводили на життєздатних клітинах, які ідентифікували за допомогою пропідію йодиду (який забарвлює мертві клітини).  $\text{EC}_{50}$  зв'язування виражали в молярності (M), яку розраховували за допомогою нелінійного регресійного аналізу (GraphPad Prims 4.0).

Криві титрування, отримані на лінії клітин мавп COS-7, показали, що всі анти-hIGF-1R-антитіла, за винятком MKA 832E5, специфічно розпізнавали IGF-1R, експресований на поверхні лінії клітин мавп (фіг. 7A). Визначення  $\text{EC}_{50}$  для кожного з мишачих і химерних антитіл показало, що два з них є порівняно хорошими стосовно їх властивостей зв'язування мавпячого IGF-1R (фіг. 7B). Ці результати показали, що усі створені анти-hIGF-1R-MKA, за винятком MKA 832E5, розпізнають мавпячий IGF-1R.

Порівняння  $\text{EC}_{50}$  зв'язування на клітинах COS-7 і IGF-1R-трансфікованих клітинах проводили з метою перевірки величини розпізнавання химерного антитіла на людському IGF-1R порівняно з мавпячим IGF-1R. Результати, показані на фіг. 7B, продемонстрували аналогічне розпізнавання людського і мавпячого IGF-1R усіма антитілами, за винятком MKA 832E5.

Для того, щоб підтвердити розпізнавання на іншому типі мавп, клітини трансфікували IGF-1R від яванського макака, отримуючи розчинний мавпячий IGF-1R ECD, і виконували експерименти Biacore з одним з химерних антитіл (c208F2), щоб порівняти його зв'язувальні властивості або на hIGF-1R, або на IGF-1R яванського макака.

Експерименти з розпізнавання проводили на пристрої Biacore X з використанням сенсорного чіпа CM5, активованого анти-His-Tag-антитілом (набір His Capture Kit від GE Healthcare, кат. номер 28-9950-56). Більше ніж 11000 РО антитіл хімічно приєднували до карбоксиметилдекстранової матриці з використанням набору для амінової хімічної реакції. Експерименти проводили при  $25^\circ\text{C}$  зі швидкістю потоку 30 мкл/хв з використанням буфера HBS-EP (GE Healthcare) як робочого буфера і буфера для розведення зразків. Кінетичну схему з одним циклом використовували для певних кінетичних параметрів зв'язування химерної форми анти-IGF-1R-антитіла c208F2 (c208F2) на hIGF-1R порівняно з IGF-1R макака.

Розчин розчинного рекомбінатного варіанту гетеротетрамера hIGF-1R, що складається з ланцюгів 2 $\beta$  і позаклітинних доменів ланцюгів 2 $\alpha$ , експресованих з додатковою C-кінцевою 10-His-міткою, основаного або на людській послідовності (R&D Systems, кат. номер 305-GR-50), або послідовності яванського макака (отриманий самостійно), вводили протягом 1 хвилини у другу проточну комірку в розведенні, визначеному для захоплення приблизно 160 РЕ антигена. Розчин другого антитіла вводили в тих самих умовах або в обидві проточні комірки, або тільки в другу проточну комірку. Після фази захоплення 5 разів вводили або робочий буфер (кожне введення по 90 с), або зростаючий діапазон 5 концентрацій c208F2 (кожне введення по 90 с) в обидві проточні комірки. У кінці п'ятого введення проганяли робочий буфер для визначення швидкості дисоціації. Потім поверхню піддавали регенерації шляхом введення буфера з 10 мМ гліцином, HCl, pH 1,5, протягом 30 с.

Обчислений сигнал відповідає різниці між відповіддю з проточної комірки 2 (з захопленням IGF-1R) і відповіддю з проточної комірки 1 (фіг. 8).

Для кожної молекули IGF-1R (людини або мавпи) сигнал від введення зростаючого діапазону концентрацій c208F2 коригували шляхом віднімання сигналу, отриманого з 5 введеннями буфера (подвійний референс). Отримані сенсограми аналізували з використанням програмного забезпечення BIAevaluation з моделлю 1:1. Кінетичні показники оцінювали або незалежно (2 кінетичних швидкості зв'язування c208F2 на кожному IGF-1R) або разом (одні й ті ж кінетичні швидкості зв'язування c208F2 на IGF-1R людини і яванського макака). Якість підгонки оцінювали за співвідношенням  $\chi^2/\text{Rmax}$  нижче 0,05 РО.

Кінетичні швидкості зв'язування (див. таблицю 11), визначені окремо для кожного IGF-1R, були близькі, і підгонка обох сенсограм з однаковими кінетичними швидкостями має хорошу якість. Антитіло c208F2 розпізнає рекомбінантні IGF-1R людини і яванського макака з константою дисоціації (KD) приблизно 0,2 нМ. Афіності, визначені в цьому дослідженні,

відповідають функціональним афінностям (або авідностям) антитіл з рівнем захопленого IGF-1R людини і яванського макака в районі 160 PO.

Таблиця 11

IGF1R	kon [1/M.s]	koff[1/s]	Kd[nM]	Chi2/Rmax
людина	1,52E+06	3,40E-04	0,23	0,045
яванський макак	1,85E+06	3,10E-04	0,17	0,032
людина і макак	1,52E+06	3,33E-04	0,22	0,039

#### 5 Приклад 6: Власний вплив створених антитіл на фосфорилування IGF-1R

Добре відомо, що антитіла можуть індукувати агоністичну дію, коли вони зв'язуються з тирозинкіназними рецепторами. Оскільки ми не хотіли вибирати такі антитіла-агоністи, ми проводили оцінку фосфорилування hIGF-1R з використанням химерних антитіл.

3 цією метою клітини MCF-7 інкубували у безсироватковому середовищі протягом ночі. Потім додавали або IGF-1 (100 nM), або антитіла, які аналізували, (10 мкг/мл) на 10 хвилин при 37 °C. Середовище відкидали і клітини зіскоблювали у лізуючий буфер (pH 7,5), що містить 10 mM буфер Tris-HCl (pH 7,5), 15% розчин NaCl (1 M), 10% суміш детергентів (10 mM Tris-HCl, 10% лізуючий буфер Igepal) (Sigma Chemical Co.), 5% дезоксихолат натрію (Sigma Chemical Co.), 1 таблетку суміші інгібіторів протеаз TM (Roche), 1% суміш інгібіторів фосфатаз Cocktail Set II (Calbiochem), на 90 хвилин при температурі 4 °C. Лізати просвітлювали центрифугуванням при 4 °C, нагрівали протягом 5 хв при 100 °C і зберігали при мінус 20 °C або відразу завантажували у 4-12% SDS-PAGE-гель. Інкубацію з первинним антитілом проводили протягом 2 год при кімнатній температурі, а потім проводили інкубацію з HRP-зв'язаними вторинними антитілами протягом 1 год при кімнатній температурі. Мембрани промивали у TBST, а потім візуалізували білки за допомогою ECL. Блоти оцінювали кількісно, використовуючи програмне забезпечення Image J. Значення "фосфор - білок" нормували за GAPDH. Фосфорилування hIGF-1R у відповідь на IGF-1 розглядали як 100% стимуляції. Вплив анти-hIGF-1R-антитіл на фосфорилування hIGF-1R визначали як % фосфорилування, індукований IGF-1.

Результати, описані на фіг. 9, є середнім значенням від % pIGF-1R у відповідь на химерні анти-IGF-1R-антитіла з трьох незалежних експериментів +/- S.D. порівняно з IGF-1. Як було показано, при інкубації клітин MCF-7 з 10 мкг анти-IGF-1R-антитіл не було виявлено ніякого істотного або мінорного (<20%) фосфорилування hIGF-1R.

Приклад 7: Інгібування фосфорилування IGF-1R у відповідь на IGF-1 мишачими анти-hIGF-1R-антитілами

Щоб охарактеризувати вибрані антитіла, досліджували їх здатність інгібувати IGF1-індуковане фосфорилування. З цією метою клітини MCF-7 інкубували у безсироватковому середовищі протягом ночі. Потім клітини інкубували протягом 5 хвилин з мишачими анти-hIGF-1R-антитілами, а потім додавали IGF-1 на 2 хв при 37 °C. Середовище відкидали і клітини зіскоблювали у лізуючий буфер (pH 7,5), що містить 10 mM буфер Tris-HCl (pH 7,5), 15% розчин NaCl (1 M), 10% суміш детергентів (10 mM Tris-HCl, 10% лізуючий буфер Igepal) (Sigma Chemical Co.), 5% дезоксихолат натрію (Sigma Chemical Co.), 1 таблетку суміші інгібіторів протеаз TM (Roche), 1% суміш інгібіторів фосфатаз Cocktail Set II (Calbiochem), на 90 хв при температурі 4 °C. Лізати просвітлювали центрифугуванням при 4 °C, нагрівали протягом 5 хв при 100 °C і зберігали при мінус 20 °C або відразу завантажували у 4-12% SDS-PAGE-гель. Інкубацію з первинним антитілом проводили протягом 2 год при кімнатній температурі, а потім проводили інкубацію з HRP-зв'язаними вторинними антитілами протягом 1 год при кімнатній температурі. Мембрани промивали у TBST, а потім візуалізували білки за допомогою ECL. Блоти оцінювали кількісно, використовуючи програмне забезпечення Image J. Значення "фосфор - білок" нормували за GAPDH. Фосфорилування hIGF-1R у відповідь на IGF-1 розглядали як 100% стимуляції. Вплив анти-hIGF-1R-антитіл на фосфорилування hIGF-1R визначали як % фосфорилування, індукований IGF-1.

Додавання m105G2, m101H8 або m9G4, нерелевантних мишачих антитіл, не інгібувало фосфорилування hIGF-1R у відповідь на IGF-1 (фіг. 10). Додавання m201F1 помірно знижувало фосфорилування hIGF-1R у відповідь на IGF-1 (приблизно 40% зниження). Усі інші анти-IGF-1R-антитіла сильно інгібували фосфорилування hIGF-1R у відповідь на IGF-1 (зниження > 80%). Кращими інгібіторами IGF1-індукованого фосфорилування hIGF-1R є MKA m208F2, m212A11 і m214F8.

Приклад 8: Дослідження інтерналізації IGF-1R після зв'язування зі створеними анти-IGF-1R-антитілами за допомогою FACS-аналізу



Клітини MCF-7 інкубували з 10 мкг/мл химерних антитіл при 4 °C протягом 20 хв. Потім клітини промивали і інкубували при 4 °C або 37 °C протягом 4 год. Кількість антитіл, зв'язаних з клітинною поверхнею, визначали за допомогою вторинного антитіла на проточному цитометрі FACSCalibur (Becton Dickinson).  $\Delta$ MFІ, яке визначали як різницю між MFІ, виміряною при 4 °C, і MFІ, виміряною при 37 °C, після закінчення періоду інкубації 4 години, відповідало кількості інтерналізованого антитіла.  $\Delta$ MFІ представлено на фіг. 11A і 11B і в таблиці 12. Відсоток інтерналізації при 10 мкг/мл антитіла розрахований як  $100 \cdot (\text{MFІ при } 4^\circ\text{C} - \text{MFІ при } 37^\circ\text{C}) / \text{MFІ при } 4^\circ\text{C}$  і представлений у таблиці 11. Максимум  $\Delta$ MFІ, розрахований для кожного химерного антитіла (фіг. 11A і 11B), не показав ніякої кореляції між групою і максимумом інтерналізації.

Таблиця 12

Група	Антитіла	% інтерналізації	$\Delta$ MFІ	EC <sub>50</sub>
G1	c101H8	75	254	4,2E-09
G1	c201F1	75	222	8,4E-08
G2	c208F2	83	288	1,8E-10
G2	c212A11	80	322	2,7E-10
G2	c214F8	87	403	2,2E-10
G2	c219D6	80	353	4,4E-10
G2	c213B10	85	369	2,3E-10
G3a	c102H8	71	262	7,9E-10
G3a	c110G9	79	309	1,2E-09
G3a	c415A8	78	327	1,2E-09
G3b	c410G4	82	321	3,7E-09
G3b	c414E1	68	229	3,1E-09
G3b	c433H9	79	323	1,1E-09
G4	c105G2	81	260	7,2E-09
G5	c832E5	40	92	2,0E-08

Щоб визначити, чи можуть антитіла, які також розпізнають мавпячий IGF-1R, інтерналізувати цей рецептор, проводили такий самий експеримент з інтерналізації. Результати, підсумовані у таблиці 13, показують, що всі проаналізовані антитіла здатні опосередкувати інтерналізацію мавпячого IGF-1R.

Таблиця 13

Група	Антитіла	Мишачі антитіла		Химерні антитіла	
		$\Delta$ MFІ	% інтерналізації	$\Delta$ MFІ	% інтерналізації
G1	101H8	73	73	85	73
G1	201F1	66	65	76	60
G2	208F2	53	74	52	67
G2	212A11	83	73	98	75
G2	214F8	76	71	98	72
G2	219D6	80	71	102	74
G2	213B10	84	74	101	73
G3a	102H8	60	55	74	54
G3a	110G9	69	59	93	61
G3a	415A8	89	65	121	68
G3b	410G4	51	49	87	58
G3b	414E1	93	67	59	54
G3b	433H9	80	61	98	63
G4	105G2	68	67	94	72

Також оцінювали кінетику зменшення кількості антитіла, зв'язаного з клітинною поверхнею. З цією метою клітини MCF-7 висівали в 96-лункові планшети і інкубували з 10 мкг/мл мишачого антитіла протягом 20 хвилин при температурі 4 °C. Потім клітини промивали для видалення незв'язаного антитіла і в середовищах при температурі 37 °C протягом 10, 20, 30, 60 або 120 хв. У кожний момент часу клітини центрифугували, а потім на льоду мітили поверхню вторинним протимишачим антитілом IgG-Alexa 488 для визначення кількості антитіла, що залишилося на

поверхні клітини. Інтенсивність флуоресценції для кожного мишачого антитіла і для кожної точки часу нормували за сигналом, отриманим при 4 °C (% IGF-1R, що залишилося), і підводили до експоненціального згасання, щоб визначити період напівжиття ( $t_{1/2}$ ).  $t_{1/2}$  розглядали як час, необхідний для отримання зменшення на 50% сигналу, виміряного при 4 °C. Як показано на

фiг. 12A і 12B, поверхневий рівень усіх мишачих антитіл швидко падав протягом перших 30 хвилин, і зниження було майже максимальним через 60 хвилин інкубації (фiг. 12A). Розрахований період напівжиття знаходився в діапазоні від 10 до 18 хв стосовно мишачого антитіла (фiг. 12B). Між розпадом антитіла на поверхні і групою антитіл не було виявлено ніякої кореляції.

Для того, щоб підтвердити, що зменшення сигналу з клітинної поверхні обумовлене інтерналізацією антитіла, а не злушчуванням рецептора, клітини інкубували з мишачими антитілами протягом 0, 30 і 60 хв при 37 °C (фiг. 13). Потім клітини фіксували і пермеабілізували або не пермеабілізували для того, щоб визначити сигнал від антитіла, зв'язаного з клітинною поверхнею (без пермеабілізації), і загальний сигнал від антитіла, який відповідає антитілу, зв'язаному з клітинною поверхнею + інтерналізованому антитілу (з пермеабілізацією). Кількість інтерналізованого антитіла (цитоплазматичний сигнал) визначали таким чином: MFI після пермеабілізації - MFI без пермеабілізації. Цей експеримент показав, що зменшення антитіла, зв'язаного з клітинною поверхнею, було пов'язане зі збільшенням цитоплазматичних антитіл, доводячи, що антитіла були інтерналізовані (фiг. 13). Крім того, деградація антитіл починалася через 1 год інкубації, що показано зменшенням сигналу після пермеабілізації (загальний сигнал).

Приклад 9: Дослідження інтерналізації IGF-1R після зв'язування створених анти-IGF-1R-антитіл шляхом конфокальних аналізів

Для подальшого підтвердження інтерналізації антитіл проводили конфокальну мікроскопію, щоб оцінити субклітинний розподіл антитіл після клітинного переміщення. Клітини інкубували з анти-hIGF-1R-антитілами при 37 °C, фіксували і пермеабілізували. Потім клітини забарвлювали за допомогою вторинного антитіла Alexa-488 і кролячого анти-Lamp-1-антитіла, яке виявляли за допомогою вторинного протикролячого антитіла IgG, кон'югованого з Alexa 555. Перед інкубацією при 37 °C мишаче антитіло 208F2 локалізували на мембрані клітин MCF-7 (фiг. 14A), і при використанні плагіна для виділення колокалізації в програмному забезпеченні Image J з лізосомним маркером, lamp-1, колокалізацію не було помічено. Кількість зв'язаних з поверхнею клітини антитіл різко зменшувалася після 15-хвилинної інкубації. Одночасно із зменшенням кількості антитіла, зв'язаного з клітинною поверхнею, внутрішньоклітинне антитіло визначалося у везикулах. Можна було спостерігати рідкісну колокалізацію з lamp-1. Після 30-хвилинної інкубації антитіло, зв'язане з клітинною поверхнею, майже не виявлялося. Проте, колокалізація антитіла в лізосомах збільшувалася. Через 1 годину інкубації внутрішньоклітинне забарвлення антитіла зменшувалося, як і рівень колокалізації з lamp-1. Кінетика антитіла, зв'язаного з клітинною поверхнею, і його внутрішньоклітинне накопичення корелювало з кінетикою розпаду поверхневого антитіла, виміряною за допомогою FACS. Крім того, як вже було описано в FACS-дослідженнях, деградація мишачих антитіл починалася через 1 годину інкубації за результатами конфокальної мікроскопії.

Також оцінювали інтерналізацію усіх інших мишачих анти-hIGF-1R-антитіл і їх колокалізацію з lamp-1 (фiг. 14B).

Приклад 10: Інгібування деградації антитіл за допомогою лізосомального інгібітора, бафіломіцину A1

Для того, щоб підтвердити, що антитіла, які досягли лізосом, були деградовані, клітини обробляли або не обробляли бафіломіцином A1, сильним інгібітором лізосомальної функції. Потім клітини інкубували з 10 мкг/мл антитіла, яке аналізували, при 4 °C, промивали і інкубували протягом 2 годин при 37 °C. Інтерналізоване антитіло виявляли після клітинної пермеабілізації з використанням вторинного протимишачого антитіла IgG-Alexa 488. Додавання бафіломіцину A1 запобігало деградації внутрішньоклітинного антитіла (фiг. 15), що вказувало на те, що антитіла були ефективно інтерналізовані і деградували в лізосомах.

Приклад 11: Вплив pH на зв'язування IGF-1R-антитіла і кореляція с цитотоксичною активністю

Оскільки антитіла вибирали на підставі їх потенціалу інтерналізації, і раніше була показана колокалізація з ранніми ендосомами перед входом у лізосомальний компартмент, підхід, що цікавить, полягав у виборі антитіл, для яких стабільність зв'язування "hIGF-1R - антитіло" модулюється відносно pH середовища, і переважними є такі антитіла, які переважно дисоціюють від IGF-1R, коли pH середовища стає кислим. Справді, основна відмінність між ранніми ендосомами і лізосомами полягає в їх порожнинному pH: в ендосомальному

компартменті pH складає приблизно 6, тоді як в лізосомальному компартменті pH складає приблизно 4,5.

Добре відомо, що hIGF-IR, одного разу інтерналізований після зв'язування ліганда (IGF1), повертається назад на поверхню клітини через шлях рециркуляції.

Без зв'язку з будь-якою теорією, описана в цьому документі гіпотеза полягає в тому, що антитіла, більш схильні до раннього звільнення від їх мішеней при кислому pH, ймовірно, сприятимуть рециркуляції мішені до мембрани, і, отже, їх можна розглядати як більш відповідних кандидатів для підходів з використанням імунокон'югатів. Для того, щоб дослідити деякі з наших антитіл, що демонструють таку властивість, і щоб співвіднести цю властивість з цитотоксичною активністю, було проведено зв'язування мишачих анти-hIGF-IR-МКА на клітинній лінії MCF-7 у буферах з різними значеннями pH. Зростаючі концентрації мишачих МКА інкубували на клітинній лінії MCF-7 протягом 20 хвилин при 4 °C і різних pH в діапазоні від 5 до 8. Потім ці клітини промивали 3 рази і інкубували з відповідним вторинним антитілом, кон'югованим з Alexa 488, у FACS-буфері. Клітини інкубували протягом 20 додаткових хвилин при 4 °C у темряві, а потім промивали 3 рази FACS-буфером. Зв'язування анти-hIGF-1R-антител негайно проводили на життєздатних клітинах, які ідентифікували за допомогою пропідію йодиду, який забарвлює мертві клітини. EC<sub>50</sub> зв'язування виражали в молярності (M), яку розраховували за допомогою нелінійного регресійного аналізу (GraphPad Prims 4.0).

EC<sub>50</sub> анти-hIGF-1R, що належить до групи кластерів епітопів 3B, по суті не залежала від pH (фіг. 16). Зв'язувальна здатність анти-hIGF-IR-антител, що належать до групи кластерів епітопів 3a, часто посилювалася при кислому pH. Навпаки, зв'язувальна здатність анти-hIGF-IR-антител, що належать до групи кластерів епітопів 1, 2 і 4, зменшувалася при кислому pH.

Для визначення того, чи чинить кислий pH позитивний вплив на цитотоксичність, індуковану імунокон'югатом, використовували комерційно доступний аналіз для людського Fab-ZAP (ATS BIO). Коротко, клітини MCF-7 висівали у кількості 2000 клітин/лунка в 96-лункові планшети і залишали на ніч для прикріплення. Наступного дня клітини обробляли 0,45 мкг/мл Fab-ZAP і зростаючими концентраціями химерних анти-IGF-1R-антитіл. Моноклональне антитіло c9G4, яке не зв'язується з поверхнею клітини, використовували як негативний контроль. На 6-й день життєздатність клітин вимірювали за допомогою аналізу CellTiter Glo Luminescence Cell Viability від Promega (Медісон, Вісконсин). Як показано на фіг. 17A, анти-IGF-1R-антитіла з груп 4 і 5 не індукували ніякої цитотоксичності на клітинах MCF-7, тоді як в інших групах була виміряна цитотоксичність від помірної (групи 1, 3a і 3b) до високої (група 2). На фіг. 17B визначення IC<sub>50</sub> показало, що група 2 має найвищу цитотоксичну активність, підтверджуючи, що ці антитіла будуть найбільш відповідними для підходу з використанням ADC (кон'югат "антитіло - лікарський засіб") або АТС.

Результати, представлені на фіг. 17, показали, що серед 15 оцінюваних химерних МКА кращого цитотоксичного ефекту досягли c208F2, c219D5, c212A11, c213B10 і c214F8, при цьому усі вони належать до групи 2. Проте, інші антитіла з групи 1 і 4, які також демонстрували чутливість до кислого pH при зв'язуванні IGF-1R, не були кластеризовані як кращі кандидати для цитотоксичності, підтверджуючи, що ця властивість може бути необхідною, але не достатньою для пояснення конкретних властивостей антитіл з групи 2. Для того, щоб краще зрозуміти особливі характеристики цього набору антитіл, були проведені дослідження кореляцій стосовно даних, наявних для усіх створених антитіл. Результати цього аналізу підтвердили, що і інгібування фосфорилування, і зниження здатності зв'язування з hIGF-1R при кислому pH середовища потрібні, щоб отримати кращу цитотоксичну активність (фіг. 18). Дійсно, 101H8 (G1), 201F1 (G1) і 105G2 (G4), зв'язування яких було понижене в кислому середовищі, але які були поганими інгібіторами фосфорилування, показали низькі цитотоксичні активності. З іншого боку, 102H8 (G3a), 110G9 (G3a), 415A8 (G3a), 410G4 (G3b), 414E1 (G3b) і 433H9 (G3b) були потужними інгібіторами IGF1-індукованого фосфорилування, але були не чутливими до змінення pH або такими, чиє зв'язування посилювалося при кислому pH, показуючи лише помірну цитотоксичну активність в аналізі для людського Fab-ZAP.

Зв'язування гуманізованих анти-IGF-1R-МКА на клітинній лінії MCF-7 було проведено у буферах з різними значеннями pH. Зростаючі концентрації гуманізованих МКА інкубували на клітинній лінії MCF-7 протягом 20 хв при 4 °C і різних pH у діапазоні від 5 до 8. Потім ці клітини промивали 3 рази і інкубували з відповідним вторинним антитілом, кон'югованим з Alexa 488, у FACS-буфері. Клітини інкубували протягом 20 додаткових хвилин при 4 °C у темряві, а потім промивали 3 рази FACS-буфером. Зв'язування анти-IGF-1R-антитіл негайно проводили на життєздатних клітинах, які ідентифікували за допомогою пропідію йодиду, який забарвлює мертві клітини. EC<sub>50</sub> зв'язування виражали в молярності (M), яку обчислювали за допомогою нелінійного регресійного аналізу (GraphPad Prims 4.0). Гуманізовані анти-IGF-1R-антитіла

показали нижчу зв'язувальну здатність при кислому pH, як показано на фіг. 32A і 32B.

Приклад 12: Оцінка гуманізованих форм МКА 208F2

12.1 Оцінка зв'язування і інтерналізації першої гуманізованої форми hz208F2 VH3/VL3 (також згадуваної як hz208F2 H026/L024)

Зв'язування першої гуманізованої форми МКА c208F2 оцінювали на клітинних лініях MCF-7, COS-7 і NIH-3T3 IR<sup>+</sup>. Зростаючі концентрації m208F2, c208F2 або hz208F2 VH3/VL3 додавали до кожної клітинної лінії протягом 20 хвилин при 4 °C. Потім клітини промивали і зв'язування аналізованого МКА виявляли за допомогою відповідного вторинного антитіла. Для валідації експресії людського IR на трансфікованій клітинній лінії використовували комерційне анти-hIR-антитіло, клон GRO5, і його профіль розпізнавання, проілюстрований на фіг. 19D.

Порівняння гуманізованої форми або з мишачою, або з химерною формою на MCF-7 (фіг. 19A) або мавпячих клітинах COS-7 (фіг. 19B) показало близькі профілі для трьох проаналізованих форм. Процес гуманізації не змінював специфічності розпізнавання антитіла, яка була відмінно порівнювана з мишачою і химерною формами стосовно відсутності перехресної реактивності з рецептором людського інсуліну (фіг. 19C).

Розраховані EC<sub>50</sub> першої гуманізованої форми c208F2 на лінії клітин людини MCF-7 і лінії клітин мавпи COS-7 були схожі на ті, які були визначені для мишачої або химерної форми 208F2.

Здатність МКА hz208F2 VH3/VL3 бути інтерналізованим оцінювали за допомогою проточної цитометрії. Клітини MCF-7 інкубували з 10 мкг/мл антитіл при 4 °C протягом 20 хв. Потім клітини промивали і інкубували при 4 °C або 37 °C протягом 4 год. Кількість антитіл, зв'язаних з клітинною поверхнею, визначали за допомогою вторинного антитіла. ΔMFI, яке визначали як різницю між MFI, виміряною при 4 °C, і MFI, виміряною при 37 °C, після закінчення періоду інкубації 4 години, відповідало кількості інтерналізованого антитіла. ΔMFI представлене в таблиці 14a. Відсоток інтерналізації при 10 мкг/мл антитіла розрахований як 100\*(MFI при 4 °C - MFI при 37 °C)/MFI при 4 °C і представлений у таблиці 14a. Таким чином, гуманізоване hz208F2 VH3/VL3 мало властивості зв'язування і інтерналізації, схожі з виміряними у відповідного мишачого і химерного антитіл 208F2.

Таблиця 14a

	ΔMFI	% інтерналізації
m208F2	294	88
c208F2	278	82
Hz208F2 VH3/VL3	344	87

12.2 Оцінка зв'язування наступних гуманізованих форм hz208F2

МКА 208F2 гуманізували і оцінювали зв'язувальні властивості шістнадцяти гуманізованих варіантів (у тому числі першої форми, описаної в 12.1). Зв'язувальні властивості гуманізованих варіантів оцінювали шляхом FACS-аналізів на клітинній лінії людської аденокарциноми молочної залози MCF-7 і лінії клітин мавпи COS-7 з використанням зростаючих концентрацій антитіл. З цією метою клітини (1×10<sup>6</sup> клітин/мл) інкубували з гуманізованими анти-IGF-1R-антитілами протягом 20 хвилин при 4 °C у FACS-буфері (PBS, 0,1% BSA, 0,01% NaN<sub>3</sub>). Потім ці клітини промивали 3 рази і інкубували з відповідним вторинним антитілом, кон'югованим з Alexa 488, протягом 20 додаткових хвилин при 4 °C у темряві, а потім промивали 3 рази FACS-буфером. Зв'язування анти-IGF-1R-антитіл негайно проводили на життєздатних клітинах, які ідентифікували за допомогою пропідію йодиду (який забарвлює мертві клітини). EC<sub>50</sub> зв'язування виражали в молярності (M), яку розраховували за допомогою нелінійного регресійного аналізу (GraphPad Prims 4.0).

EC<sub>50</sub> гуманізованих варіантів показали, що всі гуманізовані варіанти демонструють еквівалентні зв'язувальні властивості як на людській, так і на мавпячій лінії клітин.

EC<sub>50</sub> гуманізованих антитіл підсумовані в таблиці 14b.

Таблиця 14b

		EC50(M)	
		MCF-7	Cos-7
	hz208F2 H026/L024	7,09E-10	5,1E-10
	hz208F2 H037/L018	4,9E-10	7,4E-10
	hz208F2 H047/L018	7,7E-10	9,2E-10
	hz208F2 H049/L018	4,9E-10	6,9E-10
	hz208F2 H051/L018	5,7E-10	7,2E-10
	hz208F2 H052/L018	8,4E-10	9,9E-10
	hz208F2 H057/L018	5,8E-10	8,3E-10
	hz208F2 H068/L018	1,1E-09	1,2E-09
	hz208F2 H070/L018	4,6E-10	7,3E-10
	hz208F2 H071/L018	5,5E-10	1,1E-09
	hz208F2 H076/L018	6,5E-10	1,1E-09
	hz208F2 H077/L018	7,7E-10	1,1E-09
	hz208F2 H037/L021	4,8E-10	8,2E-10
	hz208F2 H049/L021	6,6E-10	8,5E-10
	hz208F2 H052/L021	5,7E-10	1,2E-09
	hz208F2 H076/L021	5,8E-10	1,1E-09

Гуманізовані варіанти

12.3 Оцінка інтерналізації іншої гуманізованої форми hz208F2

- 5 Клітини MCF-7 інкубували з 10 мкг/мл гуманізованих антитіл при 4 °C протягом 20 хв. Потім клітини промивали і інкубували при 4 °C або 37 °C протягом 4 год. Кількість антитіл, зв'язаних з клітинною поверхнею, визначали за допомогою вторинного антитіла на проточному цитометрі FACSCalibur (Becton Dickinson). ΔMFI, яке визначали як різницю між MFI, виміряною при 4 °C, і MFI, виміряною при 37 °C, після закінчення періоду інкубації 4 години, відповідало кількості
- 10 інтерналізованого антитіла. ΔMFI представлене в таблиці 14с. Відсоток інтерналізації при 10 мкг/мл антитіла розрахований як  $100 \cdot (\text{MFI при } 4^\circ\text{C} - \text{MFI при } 37^\circ\text{C}) / \text{MFI при } 4^\circ\text{C}$ . Гуманізоване антитіло hz208F2 H077/L018 здатне індукувати значну інтерналізацію IGF-1R.

Таблиця 14с

	ΔMFI	% інтерналізації
hz208F2 H077/L018	468	88

- 15 Приклад 13: IGF-1R як мішень для підходу із застосуванням імунокон'югатів

ІНС- дослідження були розроблені для того, щоб валідувати hIGF-1R в якості мішені для підходу із застосуванням імунокон'югатів. Дійсно, корисна мішень для такого підходу вимагає значної надекспресії на пухлинних клітинах порівняно з нормальними клітинами. Ще одна властивість відповідної мішені для підходу із застосуванням імунокон'югатів полягає в її

20 переважаючій надекспресії у значного відсотка пацієнтів в популяції при багатьох показаннях.

Для того, щоб оцінити, чи можна розглядати hIGF-1R як відповідну мішень для підходу із застосуванням імунокон'югатів, було вибране комерційно доступне поліклональне антитіло (AF305-NA від R&D Systems), описане як специфічний позаклітинний домен (ECD) hIGF-1R, порівняно з hIR. Першим етапом нашого процесу було перевірити специфічність AF305-NA

25 відносно hIGF-1R ECD і відсутність розпізнавання hIR. З цією метою був виконаний ряд тестів ELISA на людських білках IGF-1R і hIR ECD з використанням протоколів, вже описаних вище.

Результати, описані на фіг. 20A, показали, що поліклональне анти-hIGF-1R-антитіло ефективно розпізнавало hIGF-1R ECD. Антитіло GR11L (Calbiochem), яке використали як позитивний контроль, давало очікуваний профіль. Як було описано, на фіг. 20B показано, що

30 AF305-NA не розпізнає hIR на відміну від анти-hIR-МКА GRO5 (Calbiochem), використовуваного як позитивний контроль в ELISA. Так само оцінка зв'язування поліклонального AF305-NA на hIR<sup>+</sup>-трансфікованих клітинах шляхом FACS-аналізу підтвердила, що воно не розпізнає клітинну форму hIR (фіг. 20D), тоді як анти-hIR-антитіло GRO5 (фіг. 20C) давало очікуваний профіль на трансфікованих клітинах, демонструючи, що вони експресують hIR на високому рівні. Як і

35 очікувалося, GR11L, що розпізнає hIGF-1R і введений в експеримент в якості негативного

контролю, не показує ніякого сигналу на hIR<sup>+</sup>-трансфікованих клітинах (фіг. 20C).

Коли антитіло AF305-NA було повністю валідоване для дослідження розподілу hIGF-1R, був розроблений протокол IHC на Discovery Ultra autostainer Ventana. Коротко, після депарафінування проводили демаскування антигена за допомогою розчину CC1, що відповідає EDTA-буферу з pH 8, протягом 32 хвилин при температурі 96 °C. Первинне антитіло (AF305-NA) інкубували протягом 1 години при 37 °C. Після промивання інкубували полімер HRP-Омар протицапиний IgG (Ventana) протягом 16 хвилин при температурі 37 °C, і потім виявляли за допомогою хромогена DAB. Нарешті, забарвлювали тканини з використанням гематоксиліну. Потім зрізи заливали у середовище Eukitt. Для валідації IHC-забарвлення була вибрана панель пухлинних тканин ксенотрансплантатів, що стосується експресії hIGF-1R *in vitro*. Як показано на фіг. 21, сильне мембранозне забарвлення спостерігається у 3 позитивних тканинах (MCF-7, NCI-H23 і NCI-H82). Мембранозне забарвлення не спостерігалось в пухлині Hs746t, вибраній в якості негативного контролю. Для аналізу забарвлення зрізи сканували за допомогою сканера HT від Roche Ventana, і забарвлення IGF-1R кількісно оцінювали з використанням програмного забезпечення Virtuoso (Roche Ventana). Для аналізу тканини оцінювали 4 поля зору (fields of view, FOV) в кожній пухлині, коли це було можливо, з більше ніж 50 клітинами з метою підвищення статистичної точності алгоритму. Тканини оцінювали як +++ (також позначається як 3+), від ++ до +++ (також позначається як від 2+ до 3+ або ++/+++), ++ (також позначається як 2+), + (також позначається як 1+) відповідно до мембранозного алгоритму HER2. Оцінку проводили згідно з керівництвом для тестування CAP/ASCO як (+) для слабкого або неповного забарвлення мембрани або слабкого повного забарвлення мембрани в менше ніж 10% клітин у зразку. Оцінка (++) описувалася як повне забарвлення мембрани, яке є неоднорідним або слабким, але з очевидним периферичним розподілом щонайменше в 10% клітин, або як інтенсивне повне мембранне забарвлення 30% або менше пухлинних клітин. Оцінка (+++) відповідає рівномірному інтенсивному забарвленню мембрани більше 30% інвазивних пухлинних клітин. Якщо оцінка пухлини складала від (++) до (+++), це означало гетерогенність у проаналізованій пухлинній тканині, (-) означає, що не було виявлено ніякої експресії hIGF-1R, а (c) означає, що забарвлення було виключно цитоплазматичним. Цитоплазматичне забарвлення характеризується відсутністю мембранозного забарвлення, яке мають окремі клітини.

Потім проводили поглиблене дослідження на нормальних і пухлинних тканинах з використанням описаного вище протоколу (фіг. 22 A і B).

Для цих досліджень були використані людські нормальні і пухлинні TMA від Superbiochips для проведення досліджень з розподілу і поширенню. Два різних контролю були введені в кожний цикл автозабарвлювання. Один контроль складався із зрізів плаценти, відомої як позитивний контроль на предмет експресії IGF-1R і наданої з нормальними тканинами TMA. Друга серія контролів складалася з трьох зрізів тканин пухлинних ксенотрансплантатів, що надають оцінку 2+ або 3+ (MCF-7 і NCI-H23, NCI-H82, відповідно). Цей останній контроль додавали в кожному циклі забарвлювання для калібрування експресії.

Як і слід було чекати, плацента і тканини від ксенотрансплантатів були позитивними відносно hIGF-1R. У цих 4 контролях спостерігалось сильне мембранозне забарвлення. У першій панелі нормальних тканин людини (фіг. 22A) в шлунково-кишковому тракті (стравохід, тонка кишка, товста кишка і пряма кишка) спостерігалось незначне мембранозне виявлення IGF-1R, яке ніколи не перевищувало 1+. В усіх інших аналізованих тканинах мембранозна експресія IGF-1R не спостерігалася. У другій панелі нормальних тканин людини (фіг. 22B) легке мембранозне виявлення IGF-1R, що ніколи не перевищувало 1+, спостерігалось в ниркових структурах. Сильне мембранне забарвлення (++) спостерігалось в епітелії передміхурової залози і в уротелії. За винятком цих обох тканин сильне мембранозне забарвлення не спостерігалось. Цей патерн експресії значно підтвердив, що hIGF-1R може бути хорошою мішенню для підходів із застосуванням ADC або ATC.

Для того, щоб визначити потенційні показання до застосування імунокон'югатів, націлених на IGF-1R, були проаналізовані зразки від пацієнтів з пухлиною легенів, молочної залози, голови і шиї, сечового міхура і нирок на предмет експресії ними IGF-1R з використанням протоколу, описаного вище.

З 69 досліджених зразків легенів 67 випадків були інтерпретовані. Експресію IGF-1R оцінювали кількісно, як описано вище. Як показано на фіг. 23, сильна мембранозна експресія виявляється на багатьох карциномах порівняно з нормальними навколишніми тканинами, які є негативними відповідно до того, що ми вже описали вище на нормальних тканинах. Усі проаналізовані випадки підсумовані в таблиці 15. Спостерігалось 55% випадків з оцінкою ++ або +++, включаючи усі підтипи раку легенів. Плоскоклітинні карциноми легенів були найвище експресуючі hIGF-1R пухлинами з 70% випадків з оцінкою ++, ++/+++ або +++ і 43% випадків, що

містять тільки пухлини +++ і ++/+++. Ці результати узгоджуються з літературними даними, що описують часті високі полісомії або ампліфікації hIGF-1R у пацієнтів з плоскоклітинною карциномою легені.

Таблиця 15

	експресія IGF-1R	нормальні тканини
Аденокарцинома легені, високо диференційована 18/30 T2bN2M0 IIIA 103 6	(-)	(-)
Аденокарцинома легені, високо диференційована 0/15 T2aN0M0 IB 104 6	(-)	(-)
Аденокарцинома легені, високо диференційована 0/39 T2aN0M0 IB 108 6	(+)	(-)
Аденокарцинома легені, високо диференційована 22/22 T3N2M0 IIIA 157 6	(-)	(-)
Аденокарцинома легені, помірно диференційована 0/6 T2bN0M0 IB 156 6	(+)	(-)
Аденокарцинома легені, помірно диференційована 0/30 T2aN0M0 IB 102 6	(+)	(-)
Аденокарцинома легені, помірно диференційована 0/12 T2aN0M0 IB 158 6	(+)	(-)
Аденокарцинома легені, помірно диференційована 2/15 T3N2M0 IIIA 159 6	(-)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 5/43 T2aN1M0 IIA 101 6	Від (+) до (++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 0/15 T2aN0M0 IB 109 6	Від (+) до (++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 2/20 T3N2M0 IIIA 113 6	(+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 4/61 T2aN1M0 IIA 115 6	Від (++) до (+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 0/17 T2aN0M0 IB 120 6	Від (++) до (+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 1/46 T2bN1M0 IIB 121 6	Від (++) до (+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 1/43 T2aN1M0 IIA 123 6	Від (++) до (+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 8/28 T2aN2M0 IIIA 136 6	(++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 0/17 T2aN0M0 IB 137 6	(++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 0/19 T2aN0M0 IB 139 6	(++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 4/32 T2aN2M0 IIIA 144 6	(++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 0/24 T2bN0M0 IIA 148 6	(+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 5/40 T2bN1M0 IIB 150 6	(+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, помірно диференційована 0/20 T2aN0M0 IB 155 6	(+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, помірно диференційована 1/15 T2bN1M0 IIB 105 6	(+)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, помірно диференційована 0/8 T2aN0M0 IB 106 6	Від (+) до (++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, помірно диференційована 0/16 T3N0M0 IIB 110 6	(+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, помірно диференційована	(-)	(-)

Таблиця 15

	експресія IGF-1R	нормальні тканини
0/16 T2aN0M0 IB 118 6		
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 0/34 T2bN0M0 IIA 119 6	(++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 5/18 T2aN2M0 IIIA 126 6	(+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 1/25 T2aN1M0 IIA 129 6	(+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 0/22 T2bN0M0 IIA 130 6	Від (++) до (+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 3/21 T2aN1M0 IIA 131 6	(-)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 2/18 T1bN1M0 IIA 134 6	Від (+) до (++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 1/33 T2aN1M0 IIA 138 6	(++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 1/25 T2aN1M0 IIA 145 6	(+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 0/21 T2aN0M0 IB 146 6	Від (++) до (+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, високо диференційована 0/28 T3N0M0 IIB 151 6	(++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, слабо диференційована 0/50 T4N0M0 IIIA 132 6	(+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, слабо диференційована 1/3 T2aN2M0 IIIA 135 6	(-)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, слабо диференційована 0/22 T3N0M0 IIB 140 6	Від (+) до (++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, слабо диференційована 0/22 T2aN0M0 IB 141 6	(+++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, слабо диференційована 0/18 T2bN0M0 IIA 128 6	(++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, слабо диференційована 0/11 T2aN0M0 IB 147 6	Від (+) до (++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, слабо диференційована 0/12 T2aN0M0 IB 152 6	(++)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, слабо диференційована 0/14 T3N0M0 IIB 153 6	(-)	(-)
Плоскоклітинна карцинома легені, веретеноподібна клітина 0/10 T1bN0M0 IA 122 6	(++)	(-)
Карциносаркома легені 0/6 T3N0M0 IIB 111 6	(-)	(-)
Карциносаркома легені 0/14 T2aN0M0 IB 154 6	(+++)	(-)
Крупноклітинна нейроендокринна карцинома легені 0/7 T2aN0M0 IB 112 6	(+++)	(-)
Крупноклітинна нейроендокринна карцинома легені 0/38 T3N0M0 IIB 133 6	(+)	(-)
Крупноклітинний рак легені 0/9 T2aN0M0 IB 114 6	Від (++) до (+++)	(-)
Крупноклітинний рак легені 0/14 T1bN0M0 IA 125 6	(+)	(-)
Крупноклітинний рак легені 0/33 T2aN0M0 IB 142 6	(++)	(-)
Бронхоальвеолярна карцинома легені, не муциозна 7/17 T3N2M0 IIIA 107 6	(-)	(-)
Бронхоальвеолярна карцинома легені, не муциозна 0/8 T2bN0M0 IIA 116 6	(-)	(-)
Бронхоальвеолярна карцинома легені, не муциозна 2/24 T1aN1M0 IIA 149 6	(+)	(-)
Бронхоальвеолярна карцинома легені, муциозна 0/8	(-)	(-)



Таблиця 15

	експресія IGF-1R	нормальні тканини
T2aN0M0 IB 117 6		
Бронхоальвеолярна карцинома легені, муцинозна 0/24 T2aN0M0 IB 124 6	(++)	(-)
Бронхоальвеолярна карцинома легені, муцинозна 0/9 T3N0M0 IIB 127 6	немає даних	(-)
Бронхоальвеолярна карцинома легені, муцинозна 1/11 T1bN1M0 IIA 143 6	(+)	(-)

- 5 Інше дослідження експресії IGF-1R проводили на серії з 10 зразків раку молочної залози. Результати показані на фіг. 24, яка показує, що IGF-1R високо експресується в ракових тканинах порівняно з навколишніми нормальними тканинами. Дані з забарвлення підсумовані в таблиці 16, яка показує, що 66% проаналізованих випадків мали оцінку ++, ++/+++ або +++, а 22% проаналізованих випадків мали оцінку +++ або ++/+++.

Таблиця 16

	експресія (забарвлення мембрани)	нормальні тканини
Інфільтруюча протокова карцинома молочної залози T2N0M0	(+++)	(+)
Інфільтруюча протокова карцинома молочної залози T3N2aM0	(+)	(с)
Інфільтруюча протокова карцинома молочної залози T2N3aM0	немає даних	немає даних
Інфільтруюча протокова карцинома молочної залози T3N1aM0	(+)	(+)
Інфільтруюча папілярна карцинома молочної залози з перстнеподібно-клітинним раком T3N1aM0*	Від (++) до (+++)	(+)
Інфільтруюча протокова карцинома молочної залози T3N3aM0	(++)	(+)
Змішана інфільтруюча протокова і глобулярна карцинома молочної залози T3N2aM0	(++)	(с)
Медулярний рак молочної залози T3N0M0*	Від (+) до (++)	Від 0 до (+)
Атипівний медулярний рак молочної залози T2N1aM0	(++)	Від 0 до (+)
Інфільтруюча протокова карцинома молочної залози T2N0M0*	(++)	Від 0 до (+)

\* випадки проілюстровані

- 10 Нарешті, надекспресія IGF-1R була показана в серії пухлин, включаючи пухлини голови і шиї, сечового міхура і нирок (фіг. 25). Знову ж таки, висока надекспресія IGF-1R була виявлена у зразках пухлин у порівнянні з нормальними навколишніми тканинами.

Взяті разом, ці результати узгоджуються з підходом із застосуванням імунокон'югатів для лікування багатьох IGF-1R-позитивних пухлин, у тому числі пухлин легенів, молочної залози, голови і шиї, сечового міхура і нирок.

- 15 Приклад 14: Визначення константи дисоціації ( $K_D$ ) зв'язування п'яти химерних анти-IGF-1R-антитіл (с208F2, с213B10, с212A11, с214F8 і с219D6) і гуманізованої версії (VH3/VL3) антитіла 208F2 на розчинному рекомбінантному людському IGF-1R

- 20 Константи дисоціації ( $K_D$ ) зв'язування антитіл на рекомбінантному розчинному людському IGF-1R визначали за співвідношенням між швидкістю дисоціації ( $K_{off}$ ) і швидкістю асоціації ( $K_{on}$ ). Кінетичні експерименти проводили на пристрої Biacore X100 з використанням сенсорного чіпа CM5, активованого мишачим моноклональним анти-His-Tag-антитілом. Приблизно 12000 РО антитіл хімічно приєднували до карбоксиметилдекстранової матриці з використанням набору для амінової хімічної реакції.

Експерименти проводили при 25 °C зі швидкістю потоку 30 мкл/хв з використанням буфера

HBS-EP+ (GE Healthcare) як робочого буфера і буфера для розведення зразків.

Кінетичну схему з одним циклом використали для визначення кінетичних параметрів зв'язування анти-IGF-1R-антитіл на розчинному рекомбінантному людському hIGF-1R, захопленому за допомогою двох його С-кінцевих 10-His-міток.

1 - Розчин розчинного рекомбінантного варіанту людського гетеротетрамера hIGF-1R: ланцюги 2 $\alpha$  і позаклітинні домени ланцюгів 2 $\beta$ , експресовані з додатковою С-кінцевою 10-His-міткою (R&D Systems, кат. номер 305-GR-50) вводили протягом 1 хвилини у другу проточну комірку в концентрації 10 мкг/мл. У середньому 587 РО (із стандартним відхиленням 24 РО) розчинного рецептора було захоплено в кожному з 24 циклів, реалізованих у даному дослідженні.

2 - Після фази захоплення в обидві проточні комірки вводили або робочий буфер 5 разів (кожне введення по 90 с), або зростаючий діапазон з 5 концентрацій одного з шести антитіл (кожне введення по 90 с). У кінці п'ятого введення робочий буфер проганяли протягом 5 хвилин для визначення швидкості дисоціації.

3 - Потім поверхню піддавали регенерації введенням буфера з 10 мМ гліцином, HCl, рН 1,5, протягом 45 с.

Обчислений сигнал відповідає різниці між відповіддю з проточної комірки 2 (із захопленням IGF-1R) і відповіддю з проточної комірки 1 (без будь-яких молекул IGF-1R).

Для кожного IGF-1R сигнал від введення зростаючого діапазону концентрацій одного антитіла коригували шляхом віднімання сигналу, отриманого з 5 введеннями буфера (подвійний референс), див. фіг. 26.

Отримані сенсограми аналізували з використанням програмного забезпечення BIAevaluation з моделлю 1:1.

Для кожного антитіла були проведені чотири досліди з використанням двох різних діапазонів концентрацій: 40, 20, 10, 5 і 2,5 нМ для двох перших експериментів і 24, 12, 6, 3 і 1,5 нМ для двох останніх експериментів для кожного антитіла.

У цьому експерименті для 6 аналізованих антитіл експериментальні дані підводили з моделлю 1:1 зі значними значеннями  $K_{off}$ , коли більш висока концентрація була визначена як константа, а інші чотири концентрації обчислені (див. фіг. 27).

Константи дисоціації ( $K_D$ ), розраховані як відношення:  $K_{off}/K_{on}$ , і періоди напівжиття комплексів, розраховані як відношення  $\ln(2)/K_{off}$ , представлені на фіг. 28 і 29. Вони відповідають середньому значенню від чотирьох незалежних експериментів, проведених для кожного антитіла. Стовпці помилок відповідають стандартним помилкам ( $n=4$ ) значень.

Константи дисоціації знаходяться в діапазоні від 10 до 100 пМ. Антитіло c208F2 показує слабкішу афінність (більш високе значення константи дисоціації) по відношенню до hIGF-1R (з  $K_D$  близько 75 пМ), а його гуманізований варіант є щонайменше таким же хорошим, як химерний варіант (з  $K_D$  близько 60 пМ). Чотири інших химерних анти-IGF-1R-антитіл показують дуже схожу афінність по відношенню до hIGF1-R (з  $K_D$  близько 30 пМ). Різниця в афінності головним чином пов'язана зі швидкістю дисоціації або результируючим періодом напівжиття комплексів. У 208F2 період напівжиття комплексу складає від 2 до 3 годин для химерної і гуманізованої (VN3/VL3) версій. Для чотирьох інших химерних антитіл середні періоди напівжиття складають від 7,0 до 9,4 годин.

Ці дуже низькі значення кінетики дисоціації однозначно пов'язані з двовалентною структурою антитіл, які здатні зв'язуватися одночасно обома своїми Fab-гілками з двома сусідніми hIGF-1R-молекулами. У цьому випадку рівень захоплених молекул IGF-1R може вплинути на швидкість дисоціації. Афінності, визначені в цьому дослідженні, відповідають функціональним афінностям (або авідностям) антитіл на рівні захопленого hIGF-1R приблизно 600 РО. 3-кратна різниця  $K_D$ , яка спостерігалася між даними, наведеними вище (таблиця 10), і значеннями, представленими в прикладі 13, пов'язана зі зміною рівня захоплення hIGF-1R (600РО порівняно з 160 РО в прикладі 5).

Приклад 15: Визначення мишачих IGF-1R-специфічних залишків, які запобігають зв'язуванню c208F2, з використанням розчинних форм химерних h/m рекомбінантних білків IGF-1R

Зв'язування розчинних форм химерних h/m рекомбінантних білків IGF-1R в експериментах з антитілом c208F2 виконували на пристрої Biacore X100 з використанням сенсорного чіпа CM5, який активується мишачим протилюдським IgG Fc моноклональним антитілом. Більше 10500 РО анти-Fc-антитіла хімічно приєднували до карбоксиметилдекстранової матриці обох проточних комірок з використанням набору для амінової хімічної реакції.

Експерименти проводили при 25 °C зі швидкістю потоку 30 мкл/хв з використанням буфера HBS-EP як робочого буфера і буфера для розведення зразків.

Умови експерименту були наступні:

1 - Розчин c208F2 в концентрації 10 мкг/мл вводили протягом 60 с у другу проточну комірку.

2 - Аналізовані конструкції IGF-1R відповідали концентрованим супернатантам культурального середовища, розведеним у 10 разів в робочому буфері. Одну конструкцію вводили в кожному циклі протягом 120 с із затримкою 120 с.

3 - Обидві проточні комірки піддавали регенерації шляхом введення буфера з 10 мМ гліцином, HCl, pH 1,5, протягом 30 с.

На фіг. 30 показано накладення двох циклів. Протягом першого і другого циклів, відповідно, вводили супернатанти h-IGF-1R і m-IGF-1R. Цей експеримент наочно показує нездатність m-IGF-1R зв'язуватися з позиціями антитіла c208F2, використовуваними для визначення рівня захоплення c208F2, і рівень зв'язування IGF-1R помічений двонаправленими стрілками.

Позаклітинні домени IGFR (без сигнального пептиду) складаються з 805 і 806 амінокислот для людської і мишачої послідовності, відповідно.

869 залишків (96%) є однаковими в обох структурах. 37 залишків мишачої послідовності відрізняються від відповідної людської послідовності. Одна з відмінностей відповідає розриву.

Як показано на фіг. 31, серед семи химерних проаналізованих конструкцій чотири (C1 (SEQ ID NO:83), C4 (SEQ ID NO:86), C7 (SEQ ID NO:88) і C8 (SEQ ID NO:89)) зв'язуються, як і h-IGF-1R, з c208F2, три конструкції (C2 (SEQ ID NO:84), C3 (SEQ ID NO:85) і C6 (SEQ ID NO:87)), як і m-IGF-1R (SEQ ID NO:91), не зв'язуються з c208F2.

Зв'язування C1 і відсутність зв'язування C2 підтверджує, що мишачі специфічні залишки, що блокують зв'язування c208F2, розташовані на N-кінцевій половині білка. Таким чином, останні одинадцять специфічних мишачих амінокислот, розташовані в C-кінцевій половині, не мають ніякого впливу на зв'язування c208F2.

Відсутність зв'язування C3 демонструє великий внесок одного мишачого специфічного залишку Arg замість His у позиції 494. Цей результат підтверджується відсутністю зв'язування C6, який містить два мишачих специфічних залишки: His494>Arg і Ser501>Trp.

Зв'язування C4 підтверджує, що тільки мишачий специфічний залишок Trp у позиції 501 даного химерного IGF-1R не несе відповідальності за відсутність зв'язування C2 і C6.

Зв'язування C7 підтверджує, що жоден з 17 мишачих специфічних залишків, присутніх в цих конструкціях, не має ніякого впливу на блокування зв'язування c208F2.

Так само зв'язування C8 виключає 4 інші мишачі специфічні залишки.

C12-мутант людського IGF1R, який має три мишачі залишки в домені L1, тобто Phe у позиції 28 замість Tyr, Ile у позиції 125 замість Val і Leu у позиції 156 замість Met, зв'язує c208F2 з субнаномольною константою дисоціації. Цей експеримент підтверджує, що домен L1 не бере участі в зв'язуванні антитіла, або що щонайменше 3 позиції, які відрізняються в мишачій і людській послідовностях, не несуть відповідальності за відсутність зв'язування антитіла з мишачою формою IGF1R.

Як показано на фіг. 33, hz208F2 не здатне зв'язуватися з 120 PO мутанта C29 (Asp491>Ala) розчинної форми h-IGF1, захопленої на сенсорному чіпі CM5 через його C-кінцеву 6His-мітку (білі ромби), тоді як той самий розчин антитіла чітко зв'язує (чорні ромби) до 170 PO форми розчинного рецептора дикого типу. Як і His 494, Asp 491 має вирішальне значення для афінності hz208F2 відносно IGF1R. Кристалографічні дані показують, що обидва залишки експоновані на поверхні рецептора в домені FnR3.

У сукупності ці результати показують, що hz208F2 зв'язується з доменом FnR3 IGF-1R, і епітоп, розпізнаваний цим антитілом, містить His 494 і Asp 491, які мають вирішальне значення для зв'язування антитіла.

#### ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> АНТИТІЛО ПРОТИ IGF-1R І ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ ЯК АДРЕСУЮЧОГО ПЕРЕНОСНИКА ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАКУ

<130> 367603D33596

<150> US61984160

<151> 2014-04-25

<160> 92

<170> PatentIn version 3.5

```

5  <210> 1
   <211> 8
   <212> PRT
   <213> artificial

   <220>
   <223> Consensus CDR -H1

10  <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (3)..(3)
   <223> Thr may be replaced by Ser

15  <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (8)..(8)
   <223> Tyr may be replaced by Phe

20  <400> 1

    Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
    1          5

25  <210> 2
   <211> 8
   <212> PRT
   <213> artificial

30  <220>
   <223> Consensus CDR-H2

   <400> 2

35  Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr
    1          5

   <210> 3
   <211> 13
   <212> PRT
   <213> artificial

   <220>
   <223> Consensus CDR-H3

   <400> 3

50  Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr
    1          5          10

   <210> 4
   <211> 6
   <212> PRT
   <213> artificial

55  <220>
   <223> Consensus CDR-L1

60  <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (4)..(4)
   <223> Ser may be replaced by Asn

65  <400> 4

    Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
    1          5

70

```

```

    <210> 5
    <211> 3
    <212> PRT
    <213> artificial
5
    <220>
    <223> Consensus CDR-L2

    <400> 5
10
Tyr Thr Ser
1

    <210> 6
    <211> 9
    <212> PRT
    <213> artificial
15

    <220>
    <223> Consensus CDR-L3
20

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (5)..(5)
    <223> Thr may be replaced by Ala
25

    <400> 6
30
Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

    <210> 7
    <211> 8
    <212> PRT
    <213> artificial
35

    <220>
    <223> CDR-H1
40

    <400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
1 5
45

    <210> 8
    <211> 8
    <212> PRT
    <213> artificial
50

    <220>
    <223> CDR-H1

    <400> 8
55
Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Phe
1 5

    <210> 9
    <211> 6
    <212> PRT
    <213> artificial
60

    <220>
    <223> CDR-L1
65

    <400> 9

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
1 5
70

```

5 <210> 10  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> CDR-L1  
 10 <400> 10  
 Gln Asp Ile Asn Lys Tyr  
 1 5  
 15 <210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> CDR-L3  
 <400> 11  
 25 Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 12  
 <211> 9  
 30 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> CDR-L3  
 35 <400> 12  
 Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr Thr  
 1 5  
 40 <210> 13  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 45 <220>  
 <223> c208F2, heavy chain, VH  
 <400> 13  
 50 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 55 20 25 30  
 Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 60 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 65 70 75 80  
 Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 70 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

	100	105	110
	Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
5			
	<210> 14		
	<211> 120		
	<212> PRT		
10	<213> artificial		
	<220>		
	<223> c212A11, heavy chain, VH		
15	<400> 14		
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
	1 5 10 15		
20	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
	20 25 30		
	Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
	35 40 45		
25	Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
	50 55 60		
	Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
30	65 70 75 80		
	Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
	85 90 95		
35	Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
	100 105 110		
	Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser		
	115 120		
40			
	<210> 15		
	<211> 120		
	<212> PRT		
45	<213> artificial		
	<220>		
	<223> c214F8, heavy chain, VH		
50	<400> 15		
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
	1 5 10 15		
55	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
	20 25 30		
	Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
	35 40 45		
60	Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe		
	50 55 60		
	Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	65 70 75 80		
	Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
	85 90 95		
70	Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		

	100	105	110
	Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
5			
	<210> 16		
	<211> 120		
	<212> PRT		
10	<213> artificial		
	<220>		
	<223> c219D6, heavy chain, VH		
15	<400> 16		
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Asp		
	1 5 10 15		
20	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr		
	20 25 30		
	Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
	35 40 45		
25	Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
	50 55 60		
	Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
30	65 70 75 80		
	Met Phe Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
	85 90 95		
35	Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
	100 105 110		
	Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser		
	115 120		
40			
	<210> 17		
	<211> 120		
	<212> PRT		
45	<213> artificial		
	<220>		
	<223> c213B10, heavy chain, VH		
50	<400> 17		
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
	1 5 10 15		
55	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
	20 25 30		
	Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
60	35 40 45		
	Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe		
	50 55 60		
65	Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
	65 70 75 80		
	Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
	85 90 95		
70			



Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

5 Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

10 <210> 18  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> artificial

15 <220>  
<223> c208F2, light chain, VL  
<400> 18

20 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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
20 25 30

25 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile 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

30 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Val Glu Gln  
65 70 75 80

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

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

40 <210> 19  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> artificial

45 <220>  
<223> c212A11, light chain, VL  
<400> 19

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

55 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
65 70 75 80

65 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

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

70

<210> 20  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 5 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> c214F8, light chain, VL  
 10 <400> 20  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 15 Asp Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 20 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 25 Arg 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 Gly Ser Ala Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 30 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
  
 <210> 21  
 35 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 40 <223> c219D6, light chain, VL  
 <400> 21  
 45 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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 50 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln 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  
 55 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 60 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
  
 65 <210> 22  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 70

<220>  
<223> c213B10, light chain, VL

<400> 22

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

<210> 23  
<211> 449  
<212> PRT  
30 <213> artificial

<220>  
<223> c208F2, heavy chain, full length

<400> 23

35 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
40 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45  
45 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60  
Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95  
55 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110  
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125  
60 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
130 135 140  
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
65 145 150 155 160  
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
165 170 175  
70 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

	180	185	190
	Ser Ser Ser 195	Leu Gly Thr Gln Thr 200	Tyr Ile Cys Asn Val 205
5	Pro Ser 210	Asn Thr Lys Val Asp 215	Lys Arg Val Glu Pro 220
10	Lys Thr His Thr Cys 225	Pro 230	Cys Pro Ala Pro 235
	Pro Ser Val Phe 245	Leu Phe Pro Pro Lys 250	Pro Glu Leu Leu Gly 240
15	Ser Arg Thr 260	Glu Val Thr Cys Val 265	Val Val Asp Val Ser 270
	Asp Pro Glu 275	Val Lys Phe Asn Trp 280	Tyr Val Asp Gly Val 285
20	Asn Ala 290	Lys Thr Lys Pro Arg 295	Glu Glu Gln Tyr Asn 300
	Val Val Ser Val Leu 305	Thr 310	Val Leu His Gln Asp 315
25	Glu Tyr Lys Cys 325	Lys Val Ser Asn Lys 330	Ala Leu Pro Ala Pro 335
30	Lys Thr Ile Ser 340	Lys Ala Lys Gly Gln 345	Pro Arg Glu Pro Gln 350
	Thr Leu Pro 355	Pro Ser Arg Glu Glu 360	Met Thr Lys Asn Gln 365
35	Thr Cys 370	Leu Val Lys Gly Phe 375	Tyr Pro Ser Asp Ile 380
40	Glu Ser Asn Gly Gln 385	Pro 390	Glu Asn Asn Tyr Lys 395
	Leu Asp Ser Asp Gly 405	Ser Phe Phe Leu Tyr 410	Ser Lys Leu Thr Val 415
45	Lys Ser Arg Trp 420	Gln Gln Gly Asn Val 425	Phe Ser Cys Ser Val 430
	Glu Ala Leu 435	His Asn His Tyr Thr 440	Gln Lys Ser Leu Ser 445
50	Gly		
55	<210> 24		
	<211> 449		
	<212> PRT		
	<213> artificial		
60	<220>		
	<223> c212A11, heavy chain, full length		
	<400> 24		
65	Gln Val Gln Leu 1	Gln Gln Ser Gly 5	Pro Glu Leu Val Lys 10
	Ser Val Lys Met 20	Ser Cys Lys Ala 25	Ser Gly Tyr Thr Phe 30
70	Tyr Ile His Trp Val	Lys Gln Arg Pro Gly	Gln Gly Leu Glu Trp Ile

		35					40					45						
5		Gly	Trp	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	
		50						55					60					
		Lys	Gly	Lys	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
		65					70					75					80	
10		Met	Phe	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	
					85						90					95		
		Ala	Ser	Pro	Met	Ile	Thr	Pro	Asn	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
					100					105					110			
15		Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
				115					120					125				
		Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
20			130					135					140					
		Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
		145					150					155					160	
25		Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
					165						170					175		
		Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
					180					185					190			
30		Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
				195					200					205				
		Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
35			210					215					220					
		Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
		225					230					235					240	
40		Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
					245						250					255		
		Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
					260					265					270			
45		Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				275					280					285				
		Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
50			290					295					300					
		Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
		305					310					315					320	
55		Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
					325						330					335		
		Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
					340					345					350			
60		Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
				355					360					365				
		Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
65			370					375					380					
		Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
		385					390					395					400	
70		Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	

					405					410					415		
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			
5	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
			435					440					445				
	Gly																
10																	
	<210>	25															
	<211>	449															
	<212>	PRT															
15	<213>	artificial															
	<220>																
	<223>	c214F8, heavy chain, full length															
20	<400>	25															
	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
25	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	
				20					25					30			
	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35					40					45				
30	Gly	Trp	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Arg	Phe	
		50					55					60					
	Lys	Gly	Lys	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
35	65					70					75					80	
	Met	Phe	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	
					85					90					95		
40	Ala	Ser	Pro	Met	Ile	Thr	Pro	Asn	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
			115					120					125				
45	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
		130					135					140					
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
50	145					150					155					160	
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
				165						170					175		
55	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
			195					200					205				
60	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
		210					215					220					
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
65	225					230					235					240	
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245						250					255		
70	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	

	260	265	270
	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
5	275	280	285
	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
	290	295	300
10	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
	305	310	315
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
		325	330
15	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
		340	345
	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
		355	360
20	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
		370	375
	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
25	385	390	395
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
		405	410
30	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
		420	425
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
		435	440
35			445
	Gly		
	<210> 26		
40	<211> 449		
	<212> PRT		
	<213> artificial		
	<220>		
45	<223> c219D6, heavy chain, full length		
	<400> 26		
50	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Asp		
	1	5	10
	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr		
		20	25
55	Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
		35	40
	Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
		50	55
60	Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
		60	65
	65	70	75
65	Met Phe Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
		85	90
	Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
		100	105
70	Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
		110	

	115					120					125					
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
5		130					135					140				
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
	145					150					155					160
10	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				165						170					175	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
				180					185					190		
15	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			195					200					205			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
20		210					215					220				
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
	225					230					235					240
25	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245						250					255	
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				260					265					270		
30	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
			275					280					285			
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
35		290					295					300				
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310					315					320
40	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
					325					330					335	
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				340					345					350		
45	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			355					360					365			
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
50		370					375					380				
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
55	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				405						410					415	
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420					425					430		
60	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
			435					440					445			
	Gly															
65	<210>	27														
	<211>	449														
	<212>	PRT														
	<213>	artificial														
70																



<220>  
<223> c213B10, heavy chain, full length

<400> 27

```

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

```

	340		345		350												
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
			355					360					365				
5	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
		370					375					380					
10	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385					390					395					400	
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
					405					410					415		
15	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			
20	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
			435					440					445				
	Gly																
25	<210>	28															
	<211>	214															
	<212>	PRT															
	<213>	artificial															
30	<220>																
	<223>	c208F2, light chain, full length															
	<400>	28															
35	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	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr	
				20					25					30			
40	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Gln	Pro	Asp	Gly	Thr	Ile	Lys	Leu	Leu	Ile	
			35					40					45				
	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
45		50					55					60					
	Arg	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Val	Glu	Gln	
	65					70					75					80	
50	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Ser	Thr	Leu	Pro	Tyr	
					85				90						95		
	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
				100					105					110			
55	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	
60		130					135					140					
	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
	145					150					155					160	
65	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			
70																	

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

5 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

10 <210> 29  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> artificial

15 <220>  
<223> c212A11, light chain, full length  
<400> 29

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

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

30 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

40 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
65 70 75 80

45 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

85 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

90 <210> 30  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> artificial

95 <220>  
<223> c214F8, light chain, full length  
<400> 30

	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
	1				5					10					15	
5	Asp	Arg	Val	Thr	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr
				20					25					30		
	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Gln	Pro	Asp	Gly	Thr	Ile	Lys	Leu	Leu	Ile
			35					40					45			
10	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50					55					60				
	Arg	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Asn	Leu	Glu	Gln
15	65					70					75					80
	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Ser	Ala	Leu	Pro	Tyr
					85					90					95	
20	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	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			
25	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
30	145					150					155					160
	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
					165					170					175	
35	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			
40	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
		210														
45	<210>	31														
	<211>	214														
	<212>	PRT														
	<213>	artificial														
50	<220>															
	<223>	c219D6, light chain, full length														
	<400>	31														
55	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	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr
				20					25					30		
60	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Gln	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
65		50					55					60				
	Arg	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln
	65					70					75					80
70	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Ser	Thr	Leu	Pro	Tyr

	85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
5	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
10	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
15	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
20	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
25	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
30	<210> 32 <211> 214 <212> PRT <213> artificial		
35	<220> <223> c213B10, light chain, full length <400> 32		
40	Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly		
	Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr		
45	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile		
50	Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln		
55	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr		
60	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
65	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
70			

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 5 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  
 10 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
 15 <210> 33  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> hz208F2 (var.1) heavy chain, VH  
 <400> 33  
 25 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  
 30 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 35  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 40 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 45 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 50 <210> 34  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 55 <220>  
 <223> hz208F2 (var. 3), VH  
 <400> 34  
 60 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 65 Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 70

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 5 Met Phe Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 10 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 15 <210> 35  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> hz208F2 (var. 1), VL  
 <400> 35  
 25 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 Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 30 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 35 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 40 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105  
 45  
 <210> 36  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 50 <213> artificial  
 <220>  
 <223> hz208F2 (var.3), VL  
 55 <400> 36  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 60 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 65 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 70 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
                                     85                                    90                                    95  
 5 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                                     100                                    105  
  
 <210> 37  
 10 <211> 449  
     <212> PRT  
     <213> artificial  
  
 <220>  
 15 <223> hz208F2 (var. 1), heavy chain, full length  
  
 <400> 37  
  
 20 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  
 25 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                                     35                                    40                                    45  
 30 Gly Ile Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
                                     50                                    55                                    60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
     65                                    70                                    75                                    80  
 35 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                     85                                    90                                    95  
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
                                     100                                    105                                    110  
 40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
                                     115                                    120                                    125  
 45 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
                                     130                                    135                                    140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
     145                                    150                                    155                                    160  
 50 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
                                     165                                    170                                    175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
                                     180                                    185                                    190  
 55 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
                                     195                                    200                                    205  
 60 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
                                     210                                    215                                    220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
     225                                    230                                    235                                    240  
 65 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
                                     245                                    250                                    255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
                                     260                                    265                                    270  
 70



Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 5 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 10 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 15 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 20 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 25 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 30 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445  
 35 Gly  
 <210> 38  
 <211> 449  
 40 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> hz208F2 (var.3), heavy chain full length  
 45 <400> 38  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 50 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Phe Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 65 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 70 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
		130					135					140				
5	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
	145					150					155					160
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				165					170						175	
10	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
				180					185					190		
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
15			195					200					205			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
		210					215					220				
20	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
	225					230					235					240
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245						250					255	
25	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				260					265					270		
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
30			275					280					285			
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
		290					295					300				
35	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310					315					320
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
				325						330					335	
40	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				340					345					350		
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
45			355					360					365			
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
		370					375					380				
50	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				405						410					415	
55	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420					425					430		
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
60			435					440					445			
	Gly															
65	<210>	39														
	<211>	214														
	<212>	PRT														
	<213>	artificial														
70	<220>															

<223> hz208F2 (var. 1), light chain, full length

<400> 39

5 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
20 25 30  
10 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
15 Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
20 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95  
25 Thr Phe Gly Gly 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  
30 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  
35 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  
40 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205  
45 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 40

<211> 214

50 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> hz208F2 (var.3), light chain, full length

55

<400> 40

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

	65		70		75		80									
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Ser	Thr	Leu	Pro	Tyr
				85					90						95	
5	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
			100						105					110		
10	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				
15	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	
20	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			
25	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
		210														
30	<210>	41														
	<211>	120														
	<212>	PRT														
	<213>	artificial														
35	<220>															
	<223>	hz208F2 (var.2) heavy chain, VH														
40	<220>															
	<221>	MISC_FEATURE														
	<222>	(20)..(20)														
	<223>	Met may be replaced by Val														
45	<220>															
	<221>	MISC_FEATURE														
	<222>	(34)..(34)														
	<223>	Ile may be replaced by Met														
50	<220>															
	<221>	MISC_FEATURE														
	<222>	(35)..(35)														
	<223>	Tyr may be replaced by His														
55	<220>															
	<221>	MISC_FEATURE														
	<222>	(38)..(38)														
	<223>	Lys may be replaced by Arg														
60	<220>															
	<221>	MISC_FEATURE														
	<222>	(48)..(48)														
	<223>	Leu may be replaced by Met														
65	<220>															
	<221>	MISC_FEATURE														
	<222>	(50)..(50)														
	<223>	Trp may be replaced by Ile														
70	<220>															
	<221>	MISC_FEATURE														

```

<222> (59)..(59)
<223> Lys may be replaced by Ser

<220>
5 <221> MISC_FEATURE
  <222> (61)..(61)
  <223> Asn may be replaced by Ala

<220>
10 <221> MISC_FEATURE
   <222> (62)..(62)
   <223> Glu may be replaced by Gln

<220>
15 <221> MISC_FEATURE
   <222> (70)..(70)
   <223> Leu may be replaced by Met

<220>
20 <221> MISC_FEATURE
   <222> (72)..(72)
   <223> Ala may be replaced by Arg

<220>
25 <221> MISC_FEATURE
   <222> (74)..(74)
   <223> Lys may be replaced by Thr

<220>
30 <221> MISC_FEATURE
   <222> (76)..(76)
   <223> Ser may be replaced by Thr

<220>
35 <221> MISC_FEATURE
   <222> (77)..(77)
   <223> Asn may be replaced by Ser

<220>
40 <221> MISC_FEATURE
   <222> (79)..(79)
   <223> Ala may be replaced by Val

<220>
45 <221> MISC_FEATURE
   <222> (82)..(82)
   <223> Phe may be replaced by Glu

<220>
50 <221> MISC_FEATURE
   <222> (95)..(95)
   <223> Phe may be replaced by Tyr

<400> 41
55
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
60      20      25      30
Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35      40      45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
65      50      55      60
Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
70      65      70      75      80

```

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

5 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

10 <210> 42  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> artificial

15 <220>  
<223> hz208F2 (var. 2), light chain, VL

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (22)..(22)  
<223> Ser may be replaced by Thr

25 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (53)..(53)  
<223> Arg may be replaced by Ser

30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (55)..(55)  
<223> His may be replaced by Gln

35 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (65)..(65)  
<223> Arg may be replaced by Ser

40 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (71)..(71)  
<223> Tyr may be replaced by Phe

45 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (72)..(72)  
<223> Ser may be replaced by Thr

50 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (77)..(77)  
<223> Asn may be replaced by Ser

55 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (87)..(87)  
<223> Phe may be replaced by Tyr

60 <400> 42

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

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

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

70

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 5 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 10 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 43  
 <211> 329  
 15 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Constant domain (VH) IgG1  
 20 <400> 43  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 25 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 35 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 40 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 45 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 50 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 55 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 60 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 65 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 70

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

5 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

10 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
325

15

<210> 44  
<211> 326  
<212> PRT  
20 <213> artificial

<220>  
<223> Constant domain (VH) IgG4 (S228P)

25 <400> 44

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 35 40 45

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

40 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

45 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
50 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
130 135 140

55 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
165 170 175

60 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
65 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
210 215 220

70 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240



Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255  
 5 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285  
 10 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300  
 15 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 325  
 20  
 <210> 45  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Domain kappa (VL)  
 <400> 45  
 30 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15  
 35 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45  
 40 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60  
 45 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95  
 50 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105  
 55  
 <210> 46  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Human germline IGHV1-46\*01  
 60  
 <400> 46  
 65 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  
 70 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg

15 <210> 47  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> artificial

20 <220>  
<223> Human germline IGKV1-39\*01  
<400> 47

25 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 Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

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

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

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

<210> 48  
<211> 15  
45 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> Human germline IGHJ4\*01

50 <400> 48

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10 15

55 <210> 49  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> artificial

60 <220>  
<223> Human germline IGKJ4\*01  
<400> 49

65 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
1 5 10

70 <210> 50

<211> 1367  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> IGF-1R (human)

<400> 50

10 Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu  
 1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile  
 20 25 30

15 Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg  
 35 40 45

20 Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile  
 50 55 60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val  
 65 70 75 80

25 Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu  
 85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe  
 100 105 110

30 Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile  
 115 120 125

35 Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu  
 130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile  
 145 150 155 160

40 Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys  
 165 170 175

45 Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys  
 180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr  
 195 200 205

50 Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys  
 210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser  
 225 230 235 240

55 Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr  
 245 250 255

60 Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu  
 260 265 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala  
 275 280 285

65 Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met  
 290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr  
 305 310 315 320

70

	Cys	Ile	Pro	Cys	Glu 325	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys 330	Val	Cys	Glu	Glu	Glu 335	Lys
5	Lys	Thr	Lys	Thr 340	Ile	Asp	Ser	Val	Thr 345	Ser	Ala	Gln	Met	Leu 350	Gln	Gly
	Cys	Thr	Ile 355	Phe	Lys	Gly	Asn 360	Leu	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg 365	Arg	Gly	Asn
10	Asn	Ile 370	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu 375	Asn	Phe	Met	Gly	Leu 380	Ile	Glu	Val	Val
	Thr 385	Gly	Tyr	Val	Lys	Ile 390	Arg	His	Ser	His	Ala 395	Leu	Val	Ser	Leu	Ser 400
15	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu 405	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly 410	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu 415	Gly
	Asn	Tyr	Ser	Phe 420	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn 425	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln 430	Leu	Trp
	Asp	Trp	Asp 435	His	Arg	Asn	Leu	Thr 440	Ile	Lys	Ala	Gly	Lys 445	Met	Tyr	Phe
25	Ala	Phe 450	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys 455	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr 460	Arg	Met	Glu	Glu
	Val 465	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly 470	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly 475	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg 480
30	Asn	Asn	Gly	Glu	Arg 485	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser 490	Asp	Val	Leu	His	Phe 495	Thr
	Ser	Thr	Thr	Thr 500	Ser	Lys	Asn	Arg	Ile 505	Ile	Ile	Thr	Trp	His 510	Arg	Tyr
35	Arg	Pro	Pro 515	Asp	Tyr	Arg	Asp	Leu 520	Ile	Ser	Phe	Thr	Val 525	Tyr	Tyr	Lys
40	Glu	Ala 530	Pro	Phe	Lys	Asn	Val 535	Thr	Glu	Tyr	Asp	Gly 540	Gln	Asp	Ala	Cys
	Gly 545	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn 550	Met	Val	Asp	Val	Asp 555	Leu	Pro	Pro	Asn	Lys 560
45	Asp	Val	Glu	Pro	Gly 565	Ile	Leu	Leu	His	Gly 570	Leu	Lys	Pro	Trp	Thr 575	Gln
	Tyr	Ala	Val	Tyr 580	Val	Lys	Ala	Val	Thr 585	Leu	Thr	Met	Val	Glu 590	Asn	Asp
50	His	Ile	Arg 595	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu 600	Ile	Leu	Tyr	Ile	Arg 605	Thr	Asn	Ala
55	Ser	Val 610	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu 615	Asp	Val	Leu	Ser	Ala 620	Ser	Asn	Ser	Ser
	Ser 625	Gln	Leu	Ile	Val	Lys 630	Trp	Asn	Pro	Pro	Ser 635	Leu	Pro	Asn	Gly	Asn 640
60	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ile 645	Val	Arg	Trp	Gln	Arg 650	Gln	Pro	Gln	Asp	Gly 655	Tyr
	Leu	Tyr	Arg	His 660	Asn	Tyr	Cys	Ser	Lys 665	Asp	Lys	Ile	Pro	Ile 670	Arg	Lys
65	Tyr	Ala	Asp 675	Gly	Thr	Ile	Asp	Ile 680	Glu	Glu	Val	Thr	Glu 685	Asn	Pro	Lys
70	Thr	Glu	Val	Cys	Gly	Gly	Glu	Lys	Gly	Pro	Cys	Cys	Ala	Cys	Pro	Lys

	690		695		700											
	Thr	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Glu	Tyr	Arg	Lys
5	705					710					715					720
	Val	Phe	Glu	Asn	Phe	Leu	His	Asn	Ser	Ile	Phe	Val	Pro	Arg	Pro	Glu
				725						730					735	
10	Arg	Lys	Arg	Arg	Asp	Val	Met	Gln	Val	Ala	Asn	Thr	Thr	Met	Ser	Ser
				740					745					750		
	Arg	Ser	Arg	Asn	Thr	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Tyr	Asn	Ile	Thr	Asp	Pro
15			755					760					765			
	Glu	Glu	Leu	Glu	Thr	Glu	Tyr	Pro	Phe	Phe	Glu	Ser	Arg	Val	Asp	Asn
		770					775					780				
20	Lys	Glu	Arg	Thr	Val	Ile	Ser	Asn	Leu	Arg	Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr	Arg
	785					790					795					800
	Ile	Asp	Ile	His	Ser	Cys	Asn	His	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys	Ser
					805					810					815	
25	Ala	Ser	Asn	Phe	Val	Phe	Ala	Arg	Thr	Met	Pro	Ala	Glu	Gly	Ala	Asp
				820					825					830		
	Asp	Ile	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Trp	Glu	Pro	Arg	Pro	Glu	Asn	Ser	Ile
30			835					840					845			
	Phe	Leu	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Pro	Asn	Gly	Leu	Ile	Leu	Met
		850					855					860				
35	Tyr	Glu	Ile	Lys	Tyr	Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Asp	Gln	Arg	Glu	Cys	Val
	865					870					875					880
	Ser	Arg	Gln	Glu	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ala	Lys	Leu	Asn	Arg	Leu
40					885					890					895	
	Asn	Pro	Gly	Asn	Tyr	Thr	Ala	Arg	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Ser	Gly
				900					905					910		
45	Asn	Gly	Ser	Trp	Thr	Asp	Pro	Val	Phe	Phe	Tyr	Val	Gln	Ala	Lys	Thr
			915					920					925			
	Gly	Tyr	Glu	Asn	Phe	Ile	His	Leu	Ile	Ile	Ala	Leu	Pro	Val	Ala	Val
		930					935					940				
50	Leu	Leu	Ile	Val	Gly	Gly	Leu	Val	Ile	Met	Leu	Tyr	Val	Phe	His	Arg
	945					950					955					960
	Lys	Arg	Asn	Asn	Ser	Arg	Leu	Gly	Asn	Gly	Val	Leu	Tyr	Ala	Ser	Val
55					965					970					975	
	Asn	Pro	Glu	Tyr	Phe	Ser	Ala	Ala	Asp	Val	Tyr	Val	Pro	Asp	Glu	Trp
				980					985					990		
60	Glu	Val	Ala	Arg	Glu	Lys	Ile	Thr	Met	Ser	Arg	Glu	Leu	Gly	Gln	Gly
			995					1000					1005			
	Ser	Phe	Gly	Met	Val	Tyr	Glu	Gly	Val	Ala	Lys	Gly	Val	Val	Lys	
		1010					1015					1020				
65	Asp	Glu	Pro	Glu	Thr	Arg	Val	Ala	Ile	Lys	Thr	Val	Asn	Glu	Ala	
		1025					1030					1035				
	Ala	Ser	Met	Arg	Glu	Arg	Ile	Glu	Phe	Leu	Asn	Glu	Ala	Ser	Val	
70		1040					1045					1050				

	Met	Lys	Glu	Phe	Asn	Cys	His	His	Val	Val	Arg	Leu	Leu	Gly	Val
		1055					1060					1065			
5	Val	Ser	Gln	Gly	Gln	Pro	Thr	Leu	Val	Ile	Met	Glu	Leu	Met	Thr
		1070					1075					1080			
	Arg	Gly	Asp	Leu	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Met
		1085					1090					1095			
10	Glu	Asn	Asn	Pro	Val	Leu	Ala	Pro	Pro	Ser	Leu	Ser	Lys	Met	Ile
		1100					1105					1110			
	Gln	Met	Ala	Gly	Glu	Ile	Ala	Asp	Gly	Met	Ala	Tyr	Leu	Asn	Ala
		1115					1120					1125			
15	Asn	Lys	Phe	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	Val
		1130					1135					1140			
20	Ala	Glu	Asp	Phe	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Asp	Phe	Gly	Met	Thr	Arg
		1145					1150					1155			
	Asp	Ile	Tyr	Glu	Thr	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Lys	Gly	Gly	Lys	Gly	Leu
		1160					1165					1170			
25	Leu	Pro	Val	Arg	Trp	Met	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Lys	Asp	Gly	Val
		1175					1180					1185			
30	Phe	Thr	Thr	Tyr	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Val	Leu	Trp
		1190					1195					1200			
	Glu	Ile	Ala	Thr	Leu	Ala	Glu	Gln	Pro	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Asn
		1205					1210					1215			
35	Glu	Gln	Val	Leu	Arg	Phe	Val	Met	Glu	Gly	Gly	Leu	Leu	Asp	Lys
		1220					1225					1230			
40	Pro	Asp	Asn	Cys	Pro	Asp	Met	Leu	Phe	Glu	Leu	Met	Arg	Met	Cys
		1235					1240					1245			
	Trp	Gln	Tyr	Asn	Pro	Lys	Met	Arg	Pro	Ser	Phe	Leu	Glu	Ile	Ile
		1250					1255					1260			
45	Ser	Ser	Ile	Lys	Glu	Glu	Met	Glu	Pro	Gly	Phe	Arg	Glu	Val	Ser
		1265					1270					1275			
	Phe	Tyr	Tyr	Ser	Glu	Glu	Asn	Lys	Leu	Pro	Glu	Pro	Glu	Glu	Leu
		1280					1285					1290			
50	Asp	Leu	Glu	Pro	Glu	Asn	Met	Glu	Ser	Val	Pro	Leu	Asp	Pro	Ser
		1295					1300					1305			
55	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Leu	Pro	Asp	Arg	His	Ser	Gly	His
		1310					1315					1320			
	Lys	Ala	Glu	Asn	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Val	Leu	Val	Leu	Arg	Ala
		1325					1330					1335			
60	Ser	Phe	Asp	Glu	Arg	Gln	Pro	Tyr	Ala	His	Met	Asn	Gly	Gly	Arg
		1340					1345					1350			
	Lys	Asn	Glu	Arg	Ala	Leu	Pro	Leu	Pro	Gln	Ser	Ser	Thr	Cys	
		1355					1360					1365			
65															
	<210>	51													
	<211>	932													
	<212>	PRT													
70	<213>	artificial													

<220>

<223> IGF-1R ECD (human)

5 <400> 51

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

	Lys	Thr	Lys	Thr 340	Ile	Asp	Ser	Val	Thr 345	Ser	Ala	Gln	Met	Leu 350	Gln	Gly
5	Cys	Thr	Ile 355	Phe	Lys	Gly	Asn	Leu 360	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg 365	Arg	Gly	Asn
	Asn	Ile 370	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu 375	Asn	Phe	Met	Gly	Leu 380	Ile	Glu	Val	Val
10	Thr 385	Gly	Tyr	Val	Lys	Ile 390	Arg	His	Ser	His	Ala 395	Leu	Val	Ser	Leu	Ser 400
	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu 405	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly 410	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu 415	Gly
15	Asn	Tyr	Ser	Phe 420	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn 425	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln 430	Leu	Trp
20	Asp	Trp	Asp 435	His	Arg	Asn	Leu	Thr 440	Ile	Lys	Ala	Gly	Lys 445	Met	Tyr	Phe
	Ala	Phe 450	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys 455	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr 460	Arg	Met	Glu	Glu
25	Val 465	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly 470	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly 475	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg 480
	Asn	Asn	Gly	Glu	Arg 485	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser 490	Asp	Val	Leu	His	Phe 495	Thr
30	Ser	Thr	Thr	Thr 500	Ser	Lys	Asn	Arg	Ile 505	Ile	Ile	Thr	Trp	His 510	Arg	Tyr
35	Arg	Pro	Pro 515	Asp	Tyr	Arg	Asp	Leu 520	Ile	Ser	Phe	Thr	Val 525	Tyr	Tyr	Lys
	Glu	Ala 530	Pro	Phe	Lys	Asn	Val 535	Thr	Glu	Tyr	Asp	Gly 540	Gln	Asp	Ala	Cys
40	Gly 545	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn 550	Met	Val	Asp	Val	Asp 555	Leu	Pro	Pro	Asn	Lys 560
	Asp	Val	Glu	Pro	Gly 565	Ile	Leu	Leu	His	Gly 570	Leu	Lys	Pro	Trp	Thr 575	Gln
45	Tyr	Ala	Val	Tyr 580	Val	Lys	Ala	Val	Thr 585	Leu	Thr	Met	Val	Glu 590	Asn	Asp
50	His	Ile	Arg 595	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu 600	Ile	Leu	Tyr	Ile	Arg 605	Thr	Asn	Ala
	Ser	Val 610	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu 615	Asp	Val	Leu	Ser	Ala 620	Ser	Asn	Ser	Ser
55	Ser 625	Gln	Leu	Ile	Val	Lys 630	Trp	Asn	Pro	Pro	Ser 635	Leu	Pro	Asn	Gly	Asn 640
	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ile 645	Val	Arg	Trp	Gln	Arg 650	Gln	Pro	Gln	Asp	Gly 655	Tyr
60	Leu	Tyr	Arg	His 660	Asn	Tyr	Cys	Ser	Lys 665	Asp	Lys	Ile	Pro	Ile 670	Arg	Lys
65	Tyr	Ala	Asp 675	Gly	Thr	Ile	Asp	Ile 680	Glu	Glu	Val	Thr	Glu 685	Asn	Pro	Lys
	Thr	Glu 690	Val	Cys	Gly	Gly	Glu 695	Lys	Gly	Pro	Cys	Cys 700	Ala	Cys	Pro	Lys
70																



	Thr	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Glu	Tyr	Arg	Lys
	705					710					715					720
5	Val	Phe	Glu	Asn	Phe	Leu	His	Asn	Ser	Ile	Phe	Val	Pro	Arg	Pro	Glu
					725					730					735	
	Arg	Lys	Arg	Arg	Asp	Val	Met	Gln	Val	Ala	Asn	Thr	Thr	Met	Ser	Ser
				740					745					750		
10	Arg	Ser	Arg	Asn	Thr	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Tyr	Asn	Ile	Thr	Asp	Pro
			755					760					765			
	Glu	Glu	Leu	Glu	Thr	Glu	Tyr	Pro	Phe	Phe	Glu	Ser	Arg	Val	Asp	Asn
		770					775					780				
15	Lys	Glu	Arg	Thr	Val	Ile	Ser	Asn	Leu	Arg	Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr	Arg
	785					790					795					800
	Ile	Asp	Ile	His	Ser	Cys	Asn	His	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys	Ser
20					805					810					815	
	Ala	Ser	Asn	Phe	Val	Phe	Ala	Arg	Thr	Met	Pro	Ala	Glu	Gly	Ala	Asp
				820					825					830		
25	Asp	Ile	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Trp	Glu	Pro	Arg	Pro	Glu	Asn	Ser	Ile
			835					840					845			
	Phe	Leu	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Pro	Asn	Gly	Leu	Ile	Leu	Met
		850					855					860				
30	Tyr	Glu	Ile	Lys	Tyr	Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Asp	Gln	Arg	Glu	Cys	Val
	865					870					875					880
	Ser	Arg	Gln	Glu	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ala	Lys	Leu	Asn	Arg	Leu
35					885					890					895	
	Asn	Pro	Gly	Asn	Tyr	Thr	Ala	Arg	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Ser	Gly
				900					905					910		
40	Asn	Gly	Ser	Trp	Thr	Asp	Pro	Val	Phe	Phe	Tyr	Val	Gln	Ala	Lys	Thr
			915					920					925			
	Gly	Tyr	Glu	Asn												
		930														
45																
	<210>	52														
	<211>	512														
	<212>	PRT														
	<213>	artificial														
50																
	<220>															
	<223>	IGF-1R ECD Nterminal (human)														
	<400>	52														
55																
	Met	Lys	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly	Leu
	1				5					10					15	
	Leu	Phe	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Ser	Leu	Trp	Pro	Thr	Ser	Gly	Glu	Ile
60				20					25					30		
	Cys	Gly	Pro	Gly	Ile	Asp	Ile	Arg	Asn	Asp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Lys	Arg
			35					40					45			
65	Leu	Glu	Asn	Cys	Thr	Val	Ile	Glu	Gly	Tyr	Leu	His	Ile	Leu	Leu	Ile
		50					55					60				
	Ser	Lys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Arg	Phe	Pro	Lys	Leu	Thr	Val
	65					70					75					80
70																

	Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu <sub>85</sub>	Leu	Leu	Phe	Arg	Val <sub>90</sub>	Ala	Gly	Leu	Glu	Ser <sub>95</sub>	Leu
5	Gly	Asp	Leu	Phe <sub>100</sub>	Pro	Asn	Leu	Thr	Val <sub>105</sub>	Ile	Arg	Gly	Trp	Lys <sub>110</sub>	Leu	Phe
	Tyr	Asn	Tyr <sub>115</sub>	Ala	Leu	Val	Ile	Phe <sub>120</sub>	Glu	Met	Thr	Asn	Leu <sub>125</sub>	Lys	Asp	Ile
10	Gly	Leu <sub>130</sub>	Tyr	Asn	Leu	Arg	Asn <sub>135</sub>	Ile	Thr	Arg	Gly	Ala <sub>140</sub>	Ile	Arg	Ile	Glu
	Lys <sub>145</sub>	Asn	Ala	Asp	Leu	Cys <sub>150</sub>	Tyr	Leu	Ser	Thr	Val <sub>155</sub>	Asp	Trp	Ser	Leu	Ile <sub>160</sub>
15	Leu	Asp	Ala	Val	Ser <sub>165</sub>	Asn	Asn	Tyr	Ile	Val <sub>170</sub>	Gly	Asn	Lys	Pro	Pro <sub>175</sub>	Lys
	Glu	Cys	Gly	Asp <sub>180</sub>	Leu	Cys	Pro	Gly	Thr <sub>185</sub>	Met	Glu	Glu	Lys	Pro <sub>190</sub>	Met	Cys
20	Glu	Lys	Thr <sub>195</sub>	Thr	Ile	Asn	Asn	Glu <sub>200</sub>	Tyr	Asn	Tyr	Arg	Cys <sub>205</sub>	Trp	Thr	Thr
	Asn	Arg <sub>210</sub>	Cys	Gln	Lys	Met	Cys <sub>215</sub>	Pro	Ser	Thr	Cys	Gly <sub>220</sub>	Lys	Arg	Ala	Cys
25	Thr <sub>225</sub>	Glu	Asn	Asn	Glu	Cys <sub>230</sub>	Cys	His	Pro	Glu	Cys <sub>235</sub>	Leu	Gly	Ser	Cys	Ser <sub>240</sub>
30	Ala	Pro	Asp	Asn	Asp <sub>245</sub>	Thr	Ala	Cys	Val	Ala <sub>250</sub>	Cys	Arg	His	Tyr	Tyr <sub>255</sub>	Tyr
	Ala	Gly	Val	Cys <sub>260</sub>	Val	Pro	Ala	Cys	Pro <sub>265</sub>	Pro	Asn	Thr	Tyr	Arg <sub>270</sub>	Phe	Glu
35	Gly	Trp	Arg <sub>275</sub>	Cys	Val	Asp	Arg	Asp <sub>280</sub>	Phe	Cys	Ala	Asn	Ile <sub>285</sub>	Leu	Ser	Ala
40	Glu	Ser <sub>290</sub>	Ser	Asp	Ser	Glu	Gly <sub>295</sub>	Phe	Val	Ile	His	Asp <sub>300</sub>	Gly	Glu	Cys	Met
	Gln	Glu	Cys	Pro	Ser	Gly <sub>310</sub>	Phe	Ile	Arg	Asn	Gly <sub>315</sub>	Ser	Gln	Ser	Met	Tyr <sub>320</sub>
45	Cys	Ile	Pro	Cys	Glu <sub>325</sub>	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys <sub>330</sub>	Val	Cys	Glu	Glu	Glu <sub>335</sub>	Lys
	Lys	Thr	Lys	Thr <sub>340</sub>	Ile	Asp	Ser	Val	Thr <sub>345</sub>	Ser	Ala	Gln	Met	Leu <sub>350</sub>	Gln	Gly
50	Cys	Thr	Ile <sub>355</sub>	Phe	Lys	Gly	Asn	Leu <sub>360</sub>	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg <sub>365</sub>	Arg	Gly	Asn
55	Asn	Ile <sub>370</sub>	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu <sub>375</sub>	Asn	Phe	Met	Gly	Leu <sub>380</sub>	Ile	Glu	Val	Val
	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys	Ile <sub>390</sub>	Arg	His	Ser	His	Ala <sub>395</sub>	Leu	Val	Ser	Leu	Ser <sub>400</sub>
60	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu <sub>405</sub>	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly <sub>410</sub>	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu <sub>415</sub>	Gly
	Asn	Tyr	Ser	Phe <sub>420</sub>	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn <sub>425</sub>	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln <sub>430</sub>	Leu	Trp
65	Asp	Trp	Asp <sub>435</sub>	His	Arg	Asn	Leu	Thr <sub>440</sub>	Ile	Lys	Ala	Gly	Lys <sub>445</sub>	Met	Tyr	Phe
70																

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu  
450 455 460

5 Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg  
465 470 475 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr  
485 490 495

10 Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr  
500 505 510

15 <210> 53  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> artificial

20 <220>  
<223> tetrapeptide (linker)  
<400> 53

25 Gly Phe Leu Gly  
1

30 <210> 54  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> tetrapeptide (linker)

35 <400> 54

Ala Leu Ala Leu  
1

40 <210> 55  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> artificial

45 <220>  
<223> tetrapeptide (linker)  
<400> 55

50 Pro Val Gly Val Val  
1 5

55 <210> 56  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> hz208F2 heavy chain H037, VH

60 <400> 56

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 5 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 10 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 15  
 <210> 57  
 <211> 107  
 20 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> hz208F2 light chain L018, VL  
 25 <400> 57  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 30 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 40 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 45 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105  
 50 <210> 58  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 55 <223> hz208F2 heavy chain H037 full length  
 <400> 58  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 65 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 70

	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Tyr
	65					70					75					80
5	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
					85					90					95	
	Ala	Ser	Pro	Met	Ile	Thr	Pro	Asn	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
10	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			115					120					125			
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
		130					135					140				
15	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
	145					150					155					160
20	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
					165					170					175	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
				180					185					190		
25	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			195					200					205			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
		210					215					220				
30	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
	225					230					235					240
35	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
					245					250					255	
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				260					265					270		
40	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
			275					280					285			
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
		290					295					300				
45	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310					315					320
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
50					325					330					335	
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				340					345					350		
55	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			355					360					365			
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
		370					375					380				
60	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
65	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
					405					410					415	
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420					425					430		
70	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro

	435	440	445
	Gly		
5	<210> 59 <211> 214 <212> PRT <213> artificial		
10	<220> <223> hz208F2 light chain L018 full length		
15	<400> 59		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1 5 10 15		
20	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr		
	20 25 30		
	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
	35 40 45		
25	Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50 55 60		
	Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	65 70 75 80		
30	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr		
	85 90 95		
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
	100 105 110		
35	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
	115 120 125		
40	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		
45	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
	165 170 175		
	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
	180 185 190		
50	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195 200 205		
55	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
60	<210> 60 <211> 107 <212> PRT <213> artificial		
	<220> <223> hz208F2 light chain L021, VL		
65	<400> 60		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1 5 10 15		
70			

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 5 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 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  
 10 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 15 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 61  
 20 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 25 <223> hz208F2 light chain L021 full length  
 <400> 61  
 30 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 Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 35 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 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  
 40 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 45 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 50 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 55 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  
 60 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  
 65 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 70 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

```

    <210> 62
    <211> 120
    <212> PRT
5    <213> artificial

    <220>
    <223> hz208F2 heavy chain H047, VH
10   <400> 62

      Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      1          5          10          15
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 Met
      35          40          45
20   Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
      50          55          60
      Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
25   65          70          75
      Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85          90          95
30   Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      100          105          110
      Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115          120
35   <210> 63
    <211> 449
    <212> PRT
    <213> artificial
40   <220>
    <223> hz208F2 heavy chain H047 full length

    <400> 63
45   Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      1          5          10          15
50   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 Met
      35          40          45
55   Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
      50          55          60
      Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
60   65          70          75
      Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85          90          95
65   Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      100          105          110
      Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
      115          120          125
70   Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

```



	130		135		140												
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
5	145					150					155					160	
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
				165						170					175		
10	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
			195					200					205				
15	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
		210					215					220					
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
20	225					230					235					240	
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245						250					255		
25	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
30			275					280					285				
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
		290					295					300					
35	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305					310					315					320	
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
					325					330					335		
40	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
				340					345					350			
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
45			355					360					365				
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
		370					375					380					
50	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385					390					395					400	
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
					405					410					415		
55	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
60			435					440					445				
	Gly																
65	<210>	64															
	<211>	120															
	<212>	PRT															
	<213>	artificial															
70	<220>																
	<223>	hz208F2 heavy chain H049, VH															

<400> 64

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

<210> 65  
30 <211> 449  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
35 <223> hz208F2 heavy chain H049 full length

<400> 65

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

	165								170				175			
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
5				180					185					190		
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			195					200					205			
10	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
		210					215					220				
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
	225					230					235					240
15	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
					245					250					255	
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
20				260					265					270		
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
			275					280					285			
25	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
		290					295					300				
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310					315					320
30	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
					325					330					335	
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
35				340					345					350		
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			355					360					365			
40	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
		370					375					380				
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
45	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
					405					410					415	
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
50				420						425				430		
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
			435					440					445			
55	Gly															
	<210> 66															
	<211> 120															
	<212> PRT															
60	<213> artificial															
	<220>															
	<223> hz208F2 heavy chain H051, VH															
65	<400> 66															
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
	1				5					10					15	
70	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr

	20	25	30
	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
5	Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe		
10	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr		
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys		
15	Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
20	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	<210> 67		
	<211> 449		
	<212> PRT		
25	<213> artificial		
	<220>		
	<223> hz208F2 heavy chain H051 full length		
30	<400> 67		
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
35	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
40	Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe		
45	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr		
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys		
50	Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
55	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
60	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
65	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
70	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		

	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
		210					215					220				
5	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
	225					230					235					240
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
					245					250					255	
10	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				260					265					270		
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
			275					280					285			
15	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
		290					295					300				
20	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310					315					320
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
					325					330					335	
25	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				340					345					350		
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			355					360					365			
30	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
		370					375					380				
35	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
					405					410					415	
40	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420					425					430		
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
			435					440					445			
45	Gly															
	<210>	68														
50	<211>	120														
	<212>	PRT														
	<213>	artificial														
	<220>															
55	<223>	hz208F2 heavy chain H052, VH														
	<400>	68														
60	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
				20					25					30		
65	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
	Gly	Trp	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50					55					60				
70																

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 5 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 10 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 69  
 15 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 20 <223> hz208F2 heavy chain H052 full length  
 <400> 69  
 25 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  
 30 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 35 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 40 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 45 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 50 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 55 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 60 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 65 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 70

Ser Arg Thr Pro<sub>260</sub> Glu Val Thr Cys Val<sub>265</sub> Val Val Asp Val Ser<sub>270</sub> His Glu  
 5 Asp Pro Glu<sub>275</sub> Val Lys Phe Asn Trp<sub>280</sub> Tyr Val Asp Gly<sub>285</sub> Val Glu Val His  
 Asn Ala<sub>290</sub> Lys Thr Lys Pro Arg<sub>295</sub> Glu Glu Gln Tyr Asn<sub>300</sub> Ser Thr Tyr Arg  
 10 Val<sub>305</sub> Val Ser Val Leu Thr<sub>310</sub> Val Leu His Gln Asp<sub>315</sub> Trp Leu Asn Gly Lys<sub>320</sub>  
 Glu Tyr Lys Cys Lys<sub>325</sub> Val Ser Asn Lys Ala<sub>330</sub> Leu Pro Ala Pro Ile<sub>335</sub> Glu  
 15 Lys Thr Ile Ser<sub>340</sub> Lys Ala Lys Gly Gln<sub>345</sub> Pro Arg Glu Pro Gln<sub>350</sub> Val Tyr  
 20 Thr Leu Pro<sub>355</sub> Pro Ser Arg Glu Glu<sub>360</sub> Met Thr Lys Asn Gln<sub>365</sub> Val Ser Leu  
 Thr Cys<sub>370</sub> Leu Val Lys Gly Phe<sub>375</sub> Tyr Pro Ser Asp Ile<sub>380</sub> Ala Val Glu Trp  
 25 Glu<sub>385</sub> Ser Asn Gly Gln Pro<sub>390</sub> Glu Asn Asn Tyr Lys<sub>395</sub> Thr Thr Pro Pro Val<sub>400</sub>  
 30 Leu Asp Ser Asp Gly<sub>405</sub> Ser Phe Phe Leu Tyr<sub>410</sub> Ser Lys Leu Thr Val<sub>415</sub> Asp  
 Lys Ser Arg Trp<sub>420</sub> Gln Gln Gly Asn Val<sub>425</sub> Phe Ser Cys Ser Val<sub>430</sub> Met His  
 35 Glu Ala Leu<sub>435</sub> His Asn His Tyr Thr<sub>440</sub> Gln Lys Ser Leu Ser<sub>445</sub> Leu Ser Pro  
 Gly  
 40 <210> 70  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 45 <220>  
 <223> hz208F2 heavy chain H057, VH  
 <400> 70  
 50 Gln Val Gln Leu Val<sub>5</sub> Gln Ser Gly Ala Glu<sub>10</sub> Val Lys Lys Pro Gly Ala<sub>15</sub>  
 Ser Val Lys Val<sub>20</sub> Ser Cys Lys Ala Ser<sub>25</sub> Gly Tyr Thr Phe Thr<sub>30</sub> Ser Tyr  
 55 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala<sub>40</sub> Pro Gly Gln Gly Leu<sub>45</sub> Glu Trp Met  
 60 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp<sub>55</sub> Gly Ser Thr Lys Tyr<sub>60</sub> Ala Gln Lys Phe  
 Gln Gly Arg Val Thr Met<sub>70</sub> Thr Arg Asp Lys Ser<sub>75</sub> Thr Asn Thr Val Tyr<sub>80</sub>  
 65 Met Glu Leu Ser Ser<sub>85</sub> Leu Arg Ser Glu Asp<sub>90</sub> Thr Ala Val Tyr Tyr<sub>95</sub> Cys  
 70 Ala Ser Pro Met<sub>100</sub> Ile Thr Pro Asn Tyr<sub>105</sub> Ala Met Asp Tyr Trp<sub>110</sub> Gly Gln

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

5  
<210> 71  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> artificial

10  
<220>  
<223> hz208F2 heavy chain H057 full length

15  
<400> 71

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 20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val 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 Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg



	290		295		300												
5	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305					310					315					320	
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
					325					330					335		
10	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
				340					345					350			
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
			355					360					365				
15	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
		370					375					380					
20	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385					390					395					400	
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
					405					410					415		
25	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			
30	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
			435					440					445				
	Gly																
35	<210>	72															
	<211>	120															
	<212>	PRT															
	<213>	artificial															
40	<220>																
	<223>	hz208F2 heavy chain H068, VH															
	<400>	72															
45	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			
50	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
	Gly	Trp	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
55		50					55					60					
	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Asn	Thr	Val	Tyr	
	65					70					75					80	
60	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	
					85					90					95		
	Ala	Ser	Pro	Met	Ile	Thr	Pro	Asn	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
65	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115					120									
70	<210>	73															

<211> 449  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> hz208F2 heavy chain H068 full length

<400> 73

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

					325						330					335
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				340					345					350		
5	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			355					360					365			
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
10		370					375					380				
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
15	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
					405					410					415	
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420					425					430		
20	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
			435					440					445			
	Gly															
25																
	<210>	74														
	<211>	120														
	<212>	PRT														
30	<213>	artificial														
	<220>															
	<223>	hz208F2 heavy chain H070, VH														
35	<400>	74														
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
	1				5					10					15	
40	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
				20					25					30		
	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
45			35					40					45			
	Gly	Trp	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50						55					60				
50	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
	65					70					75				80	
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
55	Ala	Ser	Pro	Met	Ile	Thr	Pro	Asn	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
60			115					120								
	<210>	75														
	<211>	449														
65	<212>	PRT														
	<213>	artificial														
	<220>															
	<223>	hz208F2 heavy chain H070 full length														
70																

&lt;400&gt; 75

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 5 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 10 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 15 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445  
 Gly  
 20 <210> 76  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 25 <220>  
 <223> hz208F2 heavy chain H071, VH  
 <400> 76  
 30 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  
 35 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 40 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 45 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 50 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 55 <210> 77  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 60 <220>  
 <223> hz208F2 heavy chain H071 full length  
 <400> 77  
 65 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  
 70

	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
5	Gly	Trp	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50					55					60				
	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Asn	Thr	Val	Tyr
	65					70					75					80
10	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
	Ala	Ser	Pro	Met	Ile	Thr	Pro	Asn	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
15				100					105					110		
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			115					120					125			
20	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
		130					135					140				
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
25		145				150					155					160
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
					165					170					175	
30	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
				180					185					190		
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			195					200					205			
35	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
		210					215					220				
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
40		225				230					235					240
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
					245					250					255	
45	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				260					265					270		
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
			275					280					285			
50	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
		290					295					300				
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
55		305				310					315					320
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
					325					330					335	
60	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				340					345					350		
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			355					360					365			
65	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
		370					375					380				
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
70		385				390					395					400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 5 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445  
 10 Gly  
 15 <210> 78  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> hz208F2 heavy chain H076, VH  
 <400> 78  
 25 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  
 30 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 35 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 40 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 45 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 50 <210> 79  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 55 <220>  
 <223> hz208F2 heavy chain H076 full length  
 <400> 79  
 60 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 65 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 70

	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
	65					70					75					80
5	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
	Ala	Ser	Pro	Met	Ile	Thr	Pro	Asn	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
10	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			115					120					125			
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
15		130					135					140				
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
	145					150					155					160
20	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
					165					170					175	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
25				180					185					190		
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			195					200					205			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
30		210					215					220				
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
	225					230					235					240
35	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
					245					250					255	
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
40				260					265					270		
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
			275					280					285			
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
45		290					295					300				
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310					315					320
50	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
					325					330					335	
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
55				340					345					350		
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			355					360					365			
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
60		370					375					380				
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
65	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
					405					410					415	
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420					425					430		
70																



Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly

5

<210> 80  
<211> 120  
<212> PRT  
10 <213> artificial

<220>  
<223> hz208F2 heavy chain H077, VH

15 <400> 80

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

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

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

25 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

35 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

40

<210> 81  
<211> 449  
<212> PRT  
45 <213> artificial

<220>  
<223> hz208F2 heavy chain H077 full length

50 <400> 81

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

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

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

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

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

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

70 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

	100					105					110					
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
5			115					120					125			
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
		130					135					140				
10	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
	145					150					155					160
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				165						170					175	
15	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
				180					185					190		
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
20			195					200					205			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
		210					215					220				
25	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
	225					230					235					240
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245						250					255	
30	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				260					265					270		
35	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
		275						280					285			
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
		290					295					300				
40	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310					315					320
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
				325						330					335	
45	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
			340						345					350		
50	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
		355						360					365			
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
		370					375					380				
55	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				405						410					415	
60	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
			420						425					430		
65	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
		435						440					445			
	Gly															
70	<210>	82														

<211> 512  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Mutated IGF-1R ECD Nterminal with Arginine at position 494  
 <400> 82

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

	325								330					335				
	Lys	Thr	Lys	Thr	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Ala	Gln	Met	Leu	Gln	Gly		
5				340					345					350				
	Cys	Thr	Ile	Phe	Lys	Gly	Asn	Leu	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg	Arg	Gly	Asn		
			355					360					365					
10	Asn	Ile	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu	Asn	Phe	Met	Gly	Leu	Ile	Glu	Val	Val		
		370					375					380						
	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys	Ile	Arg	His	Ser	His	Ala	Leu	Val	Ser	Leu	Ser		
	385					390					395					400		
15	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu	Gly		
				405					410						415			
	Asn	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln	Leu	Trp		
20				420					425					430				
	Asp	Trp	Asp	His	Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	Lys	Met	Tyr	Phe		
			435					440					445					
25	Ala	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr	Arg	Met	Glu	Glu		
		450					455					460						
	Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg		
	465					470					475					480		
30	Asn	Asn	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	Asp	Val	Leu	Arg	Phe	Thr		
					485					490					495			
	Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp	His	Arg	Tyr		
35				500					505					510				
	<210>	83																
	<211>	941																
	<212>	PRT																
	<213>	Artificial																
40																		
	<220>																	
	<223>	C1 fragment with His Tag																
	<400>	83																
45	Met	Lys	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly	Leu		
	1				5				10					15				
50	Leu	Phe	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Ser	Leu	Trp	Pro	Thr	Ser	Gly	Glu	Ile		
				20					25					30				
	Cys	Gly	Pro	Gly	Ile	Asp	Ile	Arg	Asn	Asp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Lys	Arg		
			35					40					45					
55	Leu	Glu	Asn	Cys	Thr	Val	Ile	Glu	Gly	Tyr	Leu	His	Ile	Leu	Leu	Ile		
	50						55					60						
	Ser	Lys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Arg	Phe	Pro	Lys	Leu	Thr	Val		
60	65				70						75					80		
	Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu	Leu	Phe	Arg	Val	Ala	Gly	Leu	Glu	Ser	Leu			
					85				90				95					
65	Gly	Asp	Leu	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	Val	Ile	Arg	Gly	Trp	Lys	Leu	Phe		
				100					105					110				
	Tyr	Asn	Tyr	Ala	Leu	Val	Ile	Phe	Glu	Met	Thr	Asn	Leu	Lys	Asp	Ile		
			115					120					125					
70	Gly	Leu	Tyr	Asn	Leu	Arg	Asn	Ile	Thr	Arg	Gly	Ala	Ile	Arg	Ile	Glu		

		130					135					140						
5		Lys 145	Asn	Ala	Asp	Leu	Cys 150	Tyr	Leu	Ser	Thr	Val 155	Asp	Trp	Ser	Leu	Ile 160	
		Leu	Asp	Ala	Val	Ser 165	Asn	Asn	Tyr	Ile	Val 170	Gly	Asn	Lys	Pro	Pro 175	Lys	
10		Glu	Cys	Gly	Asp 180	Leu	Cys	Pro	Gly	Thr 185	Met	Glu	Glu	Lys	Pro 190	Met	Cys	
		Glu	Lys	Thr 195	Thr	Ile	Asn	Asn	Glu 200	Tyr	Asn	Tyr	Arg	Cys 205	Trp	Thr	Thr	
15		Asn	Arg 210	Cys	Gln	Lys	Met	Cys 215	Pro	Ser	Thr	Cys	Gly 220	Lys	Arg	Ala	Cys	
		Thr 225	Glu	Asn	Asn	Glu	Cys 230	Cys	His	Pro	Glu	Cys 235	Leu	Gly	Ser	Cys	Ser 240	
20		Ala	Pro	Asp	Asn	Asp 245	Thr	Ala	Cys	Val	Ala 250	Cys	Arg	His	Tyr	Tyr 255	Tyr	
		Ala	Gly	Val	Cys 260	Val	Pro	Ala	Cys	Pro 265	Pro	Asn	Thr	Tyr	Arg 270	Phe	Glu	
25		Gly	Trp	Arg 275	Cys	Val	Asp	Arg	Asp 280	Phe	Cys	Ala	Asn	Ile 285	Leu	Ser	Ala	
		Glu	Ser 290	Ser	Asp	Ser	Glu	Gly 295	Phe	Val	Ile	His	Asp 300	Gly	Glu	Cys	Met	
30		Gln 305	Glu	Cys	Pro	Ser	Gly 310	Phe	Ile	Arg	Asn	Gly 315	Ser	Gln	Ser	Met	Tyr 320	
		Cys	Ile	Pro	Cys	Glu 325	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys 330	Val	Cys	Glu	Glu	Glu 335	Lys	
40		Lys	Thr	Lys	Thr 340	Ile	Asp	Ser	Val	Thr 345	Ser	Ala	Gln	Met	Leu 350	Gln	Gly	
		Cys	Thr	Ile 355	Phe	Lys	Gly	Asn	Leu 360	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg 365	Arg	Gly	Asn	
45		Asn	Ile 370	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu 375	Asn	Phe	Met	Gly	Leu 380	Ile	Glu	Val	Val	
		Thr 385	Gly	Tyr	Val	Lys	Ile 390	Arg	His	Ser	His	Ala 395	Leu	Val	Ser	Leu	Ser 400	
50		Phe	Leu	Lys	Asn	Leu 405	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly 410	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu 415	Gly	
		Asn	Tyr	Ser	Phe 420	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn 425	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln 430	Leu	Trp	
55		Asp	Trp	Asp 435	His	Arg	Asn	Leu	Thr 440	Ile	Lys	Ala	Gly	Lys 445	Met	Tyr	Phe	
		Ala	Phe 450	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys 455	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr 460	Arg	Met	Glu	Glu	
65		Val 465	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly 470	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly 475	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg 480	
		Asn	Asn	Gly	Glu	Arg 485	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser 490	Asp	Val	Leu	His	Phe 495	Thr	
70		Ser	Thr	Thr	Thr 500	Ser	Lys	Asn	Arg	Ile 505	Ile	Ile	Thr	Trp	His 510	Arg	Tyr	

	Arg	Pro	Pro <sub>515</sub>	Asp	Tyr	Arg	Asp	Leu <sub>520</sub>	Ile	Ser	Phe	Thr	Val <sub>525</sub>	Tyr	Tyr	Lys
5	Glu	Ala <sub>530</sub>	Pro	Phe	Lys	Asn	Val <sub>535</sub>	Thr	Glu	Tyr	Asp	Gly <sub>540</sub>	Gln	Asp	Ala	Cys
	Gly <sub>545</sub>	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn <sub>550</sub>	Met	Val	Asp	Val	Asp <sub>555</sub>	Leu	Pro	Pro	Asn	Lys <sub>560</sub>
10	Glu	Gly	Glu	Pro	Gly <sub>565</sub>	Ile	Leu	Leu	His	Gly <sub>570</sub>	Leu	Lys	Pro	Trp	Thr <sub>575</sub>	Gln
	Tyr	Ala	Val	Tyr <sub>580</sub>	Val	Lys	Ala	Val	Thr <sub>585</sub>	Leu	Thr	Met	Val	Glu <sub>590</sub>	Asn	Asp
15	His	Ile	Arg <sub>595</sub>	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu <sub>600</sub>	Ile	Leu	Tyr	Ile	Arg <sub>605</sub>	Thr	Asn	Ala
20	Ser	Val <sub>610</sub>	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu <sub>615</sub>	Asp	Val	Leu	Ser	Ala <sub>620</sub>	Ser	Asn	Ser	Ser
	Ser <sub>625</sub>	Gln	Leu	Ile	Val	Lys <sub>630</sub>	Trp	Asn	Pro	Pro	Thr <sub>635</sub>	Leu	Pro	Asn	Gly	Asn <sub>640</sub>
25	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ile <sub>645</sub>	Val	Arg	Trp	Gln	Arg <sub>650</sub>	Gln	Pro	Gln	Asp	Gly <sub>655</sub>	Tyr
30	Leu	Tyr	Arg	His <sub>660</sub>	Asn	Tyr	Cys	Ser	Lys <sub>665</sub>	Asp	Lys	Ile	Pro	Ile <sub>670</sub>	Arg	Lys
	Tyr	Ala	Asp <sub>675</sub>	Gly	Thr	Ile	Asp	Val <sub>680</sub>	Glu	Glu	Val	Thr	Glu <sub>685</sub>	Asn	Pro	Lys
35	Thr	Glu <sub>690</sub>	Val	Cys	Gly	Gly	Asp <sub>695</sub>	Lys	Gly	Pro	Cys	Cys <sub>700</sub>	Ala	Cys	Pro	Lys
	Thr <sub>705</sub>	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln <sub>710</sub>	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu <sub>715</sub>	Ala	Glu	Tyr	Arg	Lys <sub>720</sub>
40	Val	Phe	Glu	Asn	Phe <sub>725</sub>	Leu	His	Asn	Ser	Ile <sub>730</sub>	Phe	Val	Pro	Arg	Pro <sub>735</sub>	Glu
45	Arg	Arg	Arg	Arg <sub>740</sub>	Asp	Val	Met	Gln	Val <sub>745</sub>	Ala	Asn	Thr	Thr	Met <sub>750</sub>	Ser	Ser
	Arg	Ser	Arg <sub>755</sub>	Asn	Thr	Thr	Val	Ala <sub>760</sub>	Asp	Thr	Tyr	Asn	Ile <sub>765</sub>	Thr	Asp	Pro
50	Glu	Glu <sub>770</sub>	Phe	Glu	Thr	Glu	Tyr <sub>775</sub>	Pro	Phe	Phe	Glu	Ser <sub>780</sub>	Arg	Val	Asp	Asn
	Lys <sub>785</sub>	Glu	Arg	Thr	Val	Ile <sub>790</sub>	Ser	Asn	Leu	Arg	Pro <sub>795</sub>	Phe	Thr	Leu	Tyr	Arg <sub>800</sub>
55	Ile	Asp	Ile	His	Ser <sub>805</sub>	Cys	Asn	His	Glu	Ala <sub>810</sub>	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys <sub>815</sub>	Ser
60	Ala	Ser	Asn	Phe <sub>820</sub>	Val	Phe	Ala	Arg	Thr <sub>825</sub>	Met	Pro	Ala	Glu	Gly <sub>830</sub>	Ala	Asp
	Asp	Ile	Pro <sub>835</sub>	Gly	Pro	Val	Thr	Trp <sub>840</sub>	Glu	Pro	Arg	Pro	Glu <sub>845</sub>	Asn	Ser	Ile
65	Phe	Leu <sub>850</sub>	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro <sub>855</sub>	Glu	Asn	Pro	Asn	Gly <sub>860</sub>	Leu	Ile	Leu	Met
70	Tyr <sub>865</sub>	Glu	Ile	Lys	Tyr	Gly <sub>870</sub>	Ser	Gln	Val	Glu	Asp <sub>875</sub>	Gln	Arg	Glu	Cys	Val <sub>880</sub>

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu  
 885 890 895  
 5 Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly  
 900 905 910  
 Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Pro Ala Lys Thr  
 915 920 925  
 10 Thr Tyr Glu Asn Phe Met His His His His His His His  
 930 935 940  
 <210> 84  
 15 <211> 939  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> C2 fragment with His Tag  
 <400> 84  
 25 Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Val Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile  
 20 25 30  
 30 Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg  
 35 40 45  
 35 Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Phe Leu His Ile Leu Leu Ile  
 50 55 60  
 Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val  
 65 70 75 80  
 40 Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu  
 85 90 95  
 Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe  
 100 105 110  
 45 Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile  
 115 120 125  
 50 Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu  
 130 135 140  
 Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Ile Asp Trp Ser Leu Ile  
 145 150 155 160  
 55 Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys  
 165 170 175  
 Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Leu Glu Glu Lys Pro Met Cys  
 180 185 190  
 60 Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr  
 195 200 205  
 65 Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Val Cys Gly Lys Arg Ala Cys  
 210 215 220  
 Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys His  
 225 230 235 240  
 70 Thr Pro Asp Asp Asn Thr Thr Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr

	245					250					255					
	Lys	Gly	Val	Cys 260	Val	Pro	Ala	Cys	Pro 265	Pro	Gly	Thr	Tyr	Arg 270	Phe	Glu
5	Gly	Trp	Arg 275	Cys	Val	Asp	Arg	Asp 280	Phe	Cys	Ala	Asn	Ile 285	Pro	Asn	Ala
10	Glu	Ser 290	Ser	Asp	Ser	Asp	Gly 295	Phe	Val	Ile	His	Asp 300	Asp	Glu	Cys	Met
	Gln 305	Glu	Cys	Pro	Ser	Gly 310	Phe	Ile	Arg	Asn	Ser 315	Thr	Gln	Ser	Met	Tyr 320
15	Cys	Ile	Pro	Cys	Glu 325	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys 330	Val	Cys	Gly	Asp	Glu 335	Glu
20	Lys	Lys	Thr	Lys 340	Thr	Ile	Asp	Ser	Val 345	Thr	Ser	Ala	Gln	Met 350	Leu	Gln
	Gly	Cys	Thr 355	Ile	Leu	Lys	Gly	Asn 360	Leu	Leu	Ile	Asn	Ile 365	Arg	Arg	Gly
25	Asn	Asn 370	Ile	Ala	Ser	Glu	Leu 375	Glu	Asn	Phe	Met	Gly 380	Leu	Ile	Glu	Val
30	Val 385	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys 390	Ile	Arg	His	Ser	His 395	Ala	Leu	Val	Ser	Leu 400
	Ser	Phe	Leu	Lys	Asn 405	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu 410	Gly	Glu	Glu	Gln	Leu 415	Glu
35	Gly	Asn	Tyr	Ser 420	Phe	Tyr	Val	Leu	Asp 425	Asn	Gln	Asn	Leu	Gln 430	Gln	Leu
	Trp	Asp	Trp 435	Asn	His	Arg	Asn	Leu 440	Thr	Val	Arg	Ser	Gly 445	Lys	Met	Tyr
40	Phe	Ala 450	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu 455	Cys	Val	Ser	Glu	Ile 460	Tyr	Arg	Met	Glu
45	Glu 465	Val	Thr	Gly	Thr	Lys 470	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys 475	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr 480
	Arg	Asn	Asn	Gly	Glu 485	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu 490	Ser	Asp	Val	Leu	Arg 495	Phe
50	Thr	Ser	Thr	Thr 500	Thr	Trp	Lys	Asn	Arg 505	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp 510	His	Arg
	Tyr	Arg	Pro 515	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp 520	Leu	Ile	Ser	Phe	Thr 525	Val	Tyr	Tyr
55	Lys	Glu 530	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn 535	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp 540	Gly	Gln	Asp	Ala
60	Cys 545	Gly	Ser	Asn	Ser	Trp 550	Asn	Met	Val	Asp	Val 555	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn 560
	Lys	Asp	Val	Glu	Pro 565	Gly	Ile	Leu	Leu	His 570	Gly	Leu	Lys	Pro	Trp 575	Thr
65	Gln	Tyr	Ala	Val 580	Tyr	Val	Lys	Ala	Val 585	Thr	Leu	Thr	Met	Val 590	Glu	Asn
	Asp	His	Ile 595	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser 600	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile 605	Arg	Thr	Asn
70	Ala	Ser	Val	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu	Asp	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser



	610		615		620												
	Ser 625	Ser	Gln	Leu	Ile	Val 630	Lys	Trp	Asn	Pro	Pro 635	Ser	Leu	Pro	Asn	Gly 640	
5	Asn	Leu	Ser	Tyr	Tyr 645	Ile	Val	Arg	Trp	Gln 650	Arg	Gln	Pro	Gln	Asp 655	Gly	
10	Tyr	Leu	Tyr	Arg 660	His	Asn	Tyr	Cys	Ser 665	Lys	Asp	Lys	Ile	Pro 670	Ile	Arg	
	Lys	Tyr	Ala 675	Asp	Gly	Thr	Ile	Asp 680	Ile	Glu	Glu	Val	Thr 685	Glu	Asn	Pro	
15	Lys	Thr 690	Glu	Val	Cys	Gly	Gly 695	Glu	Lys	Gly	Pro	Cys 700	Cys	Ala	Cys	Pro	
	Lys	Thr 705	Glu	Ala	Glu	Lys 710	Gln	Ala	Glu	Lys	Glu 715	Glu	Ala	Glu	Tyr	Arg 720	
20	Lys	Val	Phe	Glu	Asn 725	Phe	Leu	His	Asn	Ser 730	Ile	Phe	Val	Pro	Arg 735	Pro	
	Glu	Arg	Lys	Arg 740	Arg	Asp	Val	Met	Gln 745	Val	Ala	Asn	Thr	Thr 750	Met	Ser	
25	Ser	Arg	Ser 755	Arg	Asn	Thr	Thr	Ala 760	Ala	Asp	Thr	Tyr	Asn 765	Ile	Thr	Asp	
30	Pro	Glu 770	Glu	Leu	Glu	Thr	Glu 775	Tyr	Pro	Phe	Phe	Glu 780	Ser	Arg	Val	Asp	
	Asn 785	Lys	Glu	Arg	Thr	Val 790	Ile	Ser	Asn	Leu	Arg 795	Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr 800	
35	Arg	Ile	Asp	Ile	His 805	Ser	Cys	Asn	His	Glu 810	Ala	Glu	Lys	Leu	Gly 815	Cys	
40	Ser	Ala	Ser	Asn 820	Phe	Val	Phe	Ala	Arg 825	Thr	Met	Pro	Ala	Glu 830	Gly	Ala	
	Asp	Asp	Ile 835	Pro	Gly	Pro	Val	Thr 840	Trp	Glu	Pro	Arg	Pro 845	Glu	Asn	Ser	
45	Ile	Phe 850	Leu	Lys	Trp	Pro	Glu 855	Pro	Glu	Asn	Pro	Asn 860	Gly	Leu	Ile	Leu	
	Met 865	Tyr	Glu	Ile	Lys	Tyr 870	Gly	Ser	Gln	Val	Glu 875	Asp	Gln	Arg	Glu	Cys 880	
50	Val	Ser	Arg	Gln	Glu 885	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Gly 890	Gly	Ala	Lys	Leu	Asn 895	Arg	
	Leu	Asn	Pro	Gly 900	Asn	Tyr	Thr	Ala	Arg 905	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser 910	Leu	Ser	
55	Gly	Asn	Gly 915	Ser	Trp	Thr	Asp	Pro 920	Val	Phe	Phe	Tyr	Val 925	Gln	Ala	Lys	
60	Thr	Gly 930	Tyr	Glu	Asn	His	His 935	His	His	His	His						
65	<210>	85															
	<211>	938															
	<212>	PRT															
	<213>	Artificial															
70	<220>																
	<223>	C3 fragment with His Tag															

&lt;400&gt; 85

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

	Cys	Thr	Ile	Phe	Lys	Gly	Asn	Leu	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg	Arg	Gly	Asn
			355					360					365			
5	Asn	Ile	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu	Asn	Phe	Met	Gly	Leu	Ile	Glu	Val	Val
		370					375					380				
	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys	Ile	Arg	His	Ser	His	Ala	Leu	Val	Ser	Leu	Ser
	385					390					395					400
10	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu	Gly
					405					410					415	
	Asn	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln	Leu	Trp
				420					425					430		
15	Asp	Trp	Asp	His	Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	Lys	Met	Tyr	Phe
			435					440					445			
	Ala	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr	Arg	Met	Glu	Glu
		450					455					460				
	Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg
	465					470					475					480
25	Asn	Asn	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	Asp	Val	Leu	Arg	Phe	Thr
					485					490					495	
	Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp	His	Arg	Tyr
				500					505					510		
30	Arg	Pro	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Phe	Thr	Val	Tyr	Tyr	Lys
			515					520					525			
	Glu	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Gly	Gln	Asp	Ala	Cys
		530					535					540				
35	Gly	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn	Met	Val	Asp	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn	Lys
	545					550					555					560
40	Asp	Val	Glu	Pro	Gly	Ile	Leu	Leu	His	Gly	Leu	Lys	Pro	Trp	Thr	Gln
					565					570					575	
	Tyr	Ala	Val	Tyr	Val	Lys	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Met	Val	Glu	Asn	Asp
				580					585					590		
45	His	Ile	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile	Arg	Thr	Asn	Ala
			595					600					605			
	Ser	Val	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu	Asp	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser	Ser
		610					615					620				
	Ser	Gln	Leu	Ile	Val	Lys	Trp	Asn	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Asn	Gly	Asn
	625					630					635					640
55	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Val	Arg	Trp	Gln	Arg	Gln	Pro	Gln	Asp	Gly	Tyr
					645					650					655	
	Leu	Tyr	Arg	His	Asn	Tyr	Cys	Ser	Lys	Asp	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Lys
				660					665					670		
60	Tyr	Ala	Asp	Gly	Thr	Ile	Asp	Ile	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Asn	Pro	Lys
			675					680					685			
	Thr	Glu	Val	Cys	Gly	Gly	Glu	Lys	Gly	Pro	Cys	Cys	Ala	Cys	Pro	Lys
		690					695					700				
	Thr	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Glu	Tyr	Arg	Lys
	705					710					715					720
70	Val	Phe	Glu	Asn	Phe	Leu	His	Asn	Ser	Ile	Phe	Val	Pro	Arg	Pro	Glu

[illegible]

	Gly	Asp	Leu	Phe 100	Pro	Asn	Leu	Thr	Val 105	Ile	Arg	Gly	Trp	Lys 110	Leu	Phe
5	Tyr	Asn	Tyr 115	Ala	Leu	Val	Ile	Phe 120	Glu	Met	Thr	Asn	Leu 125	Lys	Asp	Ile
	Gly	Leu 130	Tyr	Asn	Leu	Arg	Asn 135	Ile	Thr	Arg	Gly	Ala 140	Ile	Arg	Ile	Glu
10	Lys 145	Asn	Ala	Asp	Leu	Cys 150	Tyr	Leu	Ser	Thr	Val 155	Asp	Trp	Ser	Leu	Ile 160
15	Leu	Asp	Ala	Val 165	Ser	Asn	Asn	Tyr	Ile	Val 170	Gly	Asn	Lys	Pro	Pro 175	Lys
	Glu	Cys	Gly	Asp 180	Leu	Cys	Pro	Gly	Thr 185	Met	Glu	Glu	Lys	Pro	Met	Cys
20	Glu	Lys	Thr 195	Thr	Ile	Asn	Asn	Glu 200	Tyr	Asn	Tyr	Arg	Cys 205	Trp	Thr	Thr
	Asn	Arg 210	Cys	Gln	Lys	Met	Cys 215	Pro	Ser	Thr	Cys	Gly 220	Lys	Arg	Ala	Cys
25	Thr 225	Glu	Asn	Asn	Glu	Cys 230	Cys	His	Pro	Glu	Cys 235	Leu	Gly	Ser	Cys	Ser 240
30	Ala	Pro	Asp	Asn	Asp 245	Thr	Ala	Cys	Val	Ala 250	Cys	Arg	His	Tyr	Tyr 255	Tyr
	Ala	Gly	Val	Cys 260	Val	Pro	Ala	Cys	Pro 265	Pro	Asn	Thr	Tyr	Arg 270	Phe	Glu
35	Gly	Trp	Arg 275	Cys	Val	Asp	Arg	Asp 280	Phe	Cys	Ala	Asn	Ile 285	Leu	Ser	Ala
	Glu	Ser 290	Ser	Asp	Ser	Glu	Gly 295	Phe	Val	Ile	His	Asp 300	Gly	Glu	Cys	Met
40	Gln 305	Glu	Cys	Pro	Ser	Gly 310	Phe	Ile	Arg	Asn	Gly 315	Ser	Gln	Ser	Met	Tyr 320
45	Cys	Ile	Pro	Cys	Glu 325	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys 330	Val	Cys	Glu	Glu	Glu 335	Lys
	Lys	Thr	Lys	Thr 340	Ile	Asp	Ser	Val	Thr 345	Ser	Ala	Gln	Met	Leu 350	Gln	Gly
50	Cys	Thr	Ile 355	Phe	Lys	Gly	Asn	Leu 360	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg 365	Arg	Gly	Asn
	Asn	Ile 370	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu 375	Asn	Phe	Met	Gly	Leu 380	Ile	Glu	Val	Val
55	Thr 385	Gly	Tyr	Val	Lys	Ile 390	Arg	His	Ser	His	Ala 395	Leu	Val	Ser	Leu	Ser 400
60	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu 405	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly 410	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu 415	Gly
	Asn	Tyr	Ser	Phe 420	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn 425	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln 430	Leu	Trp
65	Asp	Trp	Asp 435	His	Arg	Asn	Leu	Thr 440	Ile	Lys	Ala	Gly	Lys 445	Met	Tyr	Phe
70	Ala	Phe 450	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys 455	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr 460	Arg	Met	Glu	Glu

	Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg
	465					470					475					480
5	Asn	Asn	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	Asp	Val	Leu	His	Phe	Thr
					485					490					495	
	Ser	Thr	Thr	Thr	Trp	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp	His	Arg	Tyr
				500					505					510		
10	Arg	Pro	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Phe	Thr	Val	Tyr	Tyr	Lys
			515					520					525			
15	Glu	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Gly	Gln	Asp	Ala	Cys
		530					535					540				
	Gly	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn	Met	Val	Asp	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn	Lys
	545					550					555					560
20	Asp	Val	Glu	Pro	Gly	Ile	Leu	Leu	His	Gly	Leu	Lys	Pro	Trp	Thr	Gln
					565					570					575	
	Tyr	Ala	Val	Tyr	Val	Lys	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Met	Val	Glu	Asn	Asp
				580					585					590		
25	His	Ile	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile	Arg	Thr	Asn	Ala
			595					600					605			
	Ser	Val	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu	Asp	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser	Ser
		610					615					620				
	Ser	Gln	Leu	Ile	Val	Lys	Trp	Asn	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Asn	Gly	Asn
	625					630					635					640
35	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Val	Arg	Trp	Gln	Arg	Gln	Pro	Gln	Asp	Gly	Tyr
					645					650					655	
	Leu	Tyr	Arg	His	Asn	Tyr	Cys	Ser	Lys	Asp	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Lys
				660					665					670		
40	Tyr	Ala	Asp	Gly	Thr	Ile	Asp	Ile	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Asn	Pro	Lys
			675					680					685			
	Thr	Glu	Val	Cys	Gly	Gly	Glu	Lys	Gly	Pro	Cys	Cys	Ala	Cys	Pro	Lys
	690						695					700				
	Thr	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Glu	Tyr	Arg	Lys
	705					710					715					720
50	Val	Phe	Glu	Asn	Phe	Leu	His	Asn	Ser	Ile	Phe	Val	Pro	Arg	Pro	Glu
					725					730					735	
	Arg	Lys	Arg	Arg	Asp	Val	Met	Gln	Val	Ala	Asn	Thr	Thr	Met	Ser	Ser
				740					745					750		
55	Arg	Ser	Arg	Asn	Thr	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Tyr	Asn	Ile	Thr	Asp	Pro
			755					760					765			
	Glu	Glu	Leu	Glu	Thr	Glu	Tyr	Pro	Phe	Phe	Glu	Ser	Arg	Val	Asp	Asn
		770					775					780				
60	Lys	Glu	Arg	Thr	Val	Ile	Ser	Asn	Leu	Arg	Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr	Arg
	785					790					795					800
65	Ile	Asp	Ile	His	Ser	Cys	Asn	His	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys	Ser
					805					810					815	
	Ala	Ser	Asn	Phe	Val	Phe	Ala	Arg	Thr	Met	Pro	Ala	Glu	Gly	Ala	Asp
				820					825					830		
70																

	Asp	Ile	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Trp	Glu	Pro	Arg	Pro	Glu	Asn	Ser	Ile
			835					840					845			
5	Phe	Leu	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Pro	Asn	Gly	Leu	Ile	Leu	Met
		850					855					860				
	Tyr	Glu	Ile	Lys	Tyr	Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Asp	Gln	Arg	Glu	Cys	Val
	865					870					875					880
10	Ser	Arg	Gln	Glu	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ala	Lys	Leu	Asn	Arg	Leu
					885					890					895	
	Asn	Pro	Gly	Asn	Tyr	Thr	Ala	Arg	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Ser	Gly
				900					905					910		
15	Asn	Gly	Ser	Trp	Thr	Asp	Pro	Val	Phe	Phe	Tyr	Val	Gln	Ala	Lys	Thr
			915					920					925			
20	Gly	Tyr	Glu	Asn	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His
	930						935									
	<210>	87														
	<211>	938														
25	<212>	PRT														
	<213>	Artificial														
	<220>															
	<223>	C6 fragment with His Tag														
30	<400>	87														
	Met	Lys	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly	Leu
	1				5					10					15	
35	Leu	Phe	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Ser	Leu	Trp	Pro	Thr	Ser	Gly	Glu	Ile
				20					25					30		
	Cys	Gly	Pro	Gly	Ile	Asp	Ile	Arg	Asn	Asp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Lys	Arg
40			35					40					45			
	Leu	Glu	Asn	Cys	Thr	Val	Ile	Glu	Gly	Tyr	Leu	His	Ile	Leu	Leu	Ile
	50						55					60				
45	Ser	Lys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Arg	Phe	Pro	Lys	Leu	Thr	Val
	65					70					75					80
	Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu	Leu	Leu	Phe	Arg	Val	Ala	Gly	Leu	Glu	Ser	Leu
					85					90					95	
50	Gly	Asp	Leu	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	Val	Ile	Arg	Gly	Trp	Lys	Leu	Phe
				100					105					110		
	Tyr	Asn	Tyr	Ala	Leu	Val	Ile	Phe	Glu	Met	Thr	Asn	Leu	Lys	Asp	Ile
55			115					120					125			
	Gly	Leu	Tyr	Asn	Leu	Arg	Asn	Ile	Thr	Arg	Gly	Ala	Ile	Arg	Ile	Glu
	130						135					140				
60	Lys	Asn	Ala	Asp	Leu	Cys	Tyr	Leu	Ser	Thr	Val	Asp	Trp	Ser	Leu	Ile
	145					150					155					160
	Leu	Asp	Ala	Val	Ser	Asn	Asn	Tyr	Ile	Val	Gly	Asn	Lys	Pro	Pro	Lys
					165					170					175	
65	Glu	Cys	Gly	Asp	Leu	Cys	Pro	Gly	Thr	Met	Glu	Glu	Lys	Pro	Met	Cys
				180					185					190		
	Glu	Lys	Thr	Thr	Ile	Asn	Asn	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Arg	Cys	Trp	Thr	Thr
70			195					200					205			

	Asn	Arg	Cys	Gln	Lys	Met	Cys	Pro	Ser	Thr	Cys	Gly	Lys	Arg	Ala	Cys
	210						215					220				
5	Thr	Glu	Asn	Asn	Glu	Cys	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Gly	Ser	Cys	Ser
	225					230					235					240
	Ala	Pro	Asp	Asn	Asp	Thr	Ala	Cys	Val	Ala	Cys	Arg	His	Tyr	Tyr	Tyr
					245					250					255	
10	Ala	Gly	Val	Cys	Val	Pro	Ala	Cys	Pro	Pro	Asn	Thr	Tyr	Arg	Phe	Glu
				260					265					270		
	Gly	Trp	Arg	Cys	Val	Asp	Arg	Asp	Phe	Cys	Ala	Asn	Ile	Leu	Ser	Ala
15			275					280					285			
	Glu	Ser	Ser	Asp	Ser	Glu	Gly	Phe	Val	Ile	His	Asp	Gly	Glu	Cys	Met
		290					295					300				
20	Gln	Glu	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Ile	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Ser	Met	Tyr
	305					310					315					320
	Cys	Ile	Pro	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys	Val	Cys	Glu	Glu	Glu	Lys
					325					330					335	
25	Lys	Thr	Lys	Thr	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Ala	Gln	Met	Leu	Gln	Gly
				340					345					350		
30	Cys	Thr	Ile	Phe	Lys	Gly	Asn	Leu	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg	Arg	Gly	Asn
			355					360					365			
	Asn	Ile	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu	Asn	Phe	Met	Gly	Leu	Ile	Glu	Val	Val
35		370					375					380				
	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys	Ile	Arg	His	Ser	His	Ala	Leu	Val	Ser	Leu	Ser
	385					390					395					400
40	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu	Gly
					405					410					415	
	Asn	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln	Leu	Trp
				420					425					430		
45	Asp	Trp	Asp	His	Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	Lys	Met	Tyr	Phe
			435					440					445			
	Ala	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr	Arg	Met	Glu	Glu
50		450					455					460				
	Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg
	465					470					475					480
55	Asn	Asn	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	Asp	Val	Leu	Arg	Phe	Thr
					485					490					495	
	Ser	Thr	Thr	Thr	Trp	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp	His	Arg	Tyr
				500					505					510		
60	Arg	Pro	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Phe	Thr	Val	Tyr	Tyr	Lys
			515					520					525			
	Glu	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Gly	Gln	Asp	Ala	Cys
65		530					535					540				
	Gly	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn	Met	Val	Asp	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn	Lys
	545					550					555					560
70	Asp	Val	Glu	Pro	Gly	Ile	Leu	Leu	His	Gly	Leu	Lys	Pro	Trp	Thr	Gln
					565					570					575	



	Tyr	Ala	Val	Tyr <sub>580</sub>	Val	Lys	Ala	Val	Thr <sub>585</sub>	Leu	Thr	Met	Val	Glu <sub>590</sub>	Asn	Asp
5	His	Ile	Arg <sub>595</sub>	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu <sub>600</sub>	Ile	Leu	Tyr	Ile	Arg <sub>605</sub>	Thr	Asn	Ala
	Ser	Val <sub>610</sub>	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu <sub>615</sub>	Asp	Val	Leu	Ser	Ala <sub>620</sub>	Ser	Asn	Ser	Ser
10	Ser <sub>625</sub>	Gln	Leu	Ile	Val	Lys <sub>630</sub>	Trp	Asn	Pro	Pro	Ser <sub>635</sub>	Leu	Pro	Asn	Gly	Asn <sub>640</sub>
15	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ile <sub>645</sub>	Val	Arg	Trp	Gln	Arg <sub>650</sub>	Gln	Pro	Gln	Asp	Gly <sub>655</sub>	Tyr
	Leu	Tyr	Arg	His <sub>660</sub>	Asn	Tyr	Cys	Ser	Lys <sub>665</sub>	Asp	Lys	Ile	Pro	Ile <sub>670</sub>	Arg	Lys
20	Tyr	Ala	Asp <sub>675</sub>	Gly	Thr	Ile	Asp	Ile <sub>680</sub>	Glu	Glu	Val	Thr	Glu <sub>685</sub>	Asn	Pro	Lys
25	Thr	Glu <sub>690</sub>	Val	Cys	Gly	Gly	Glu <sub>695</sub>	Lys	Gly	Pro	Cys	Cys <sub>700</sub>	Ala	Cys	Pro	Lys
	Thr <sub>705</sub>	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln <sub>710</sub>	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu <sub>715</sub>	Ala	Glu	Tyr	Arg	Lys <sub>720</sub>
30	Val	Phe	Glu	Asn	Phe <sub>725</sub>	Leu	His	Asn	Ser	Ile <sub>730</sub>	Phe	Val	Pro	Arg	Pro <sub>735</sub>	Glu
	Arg	Lys	Arg	Arg <sub>740</sub>	Asp	Val	Met	Gln	Val <sub>745</sub>	Ala	Asn	Thr	Thr	Met <sub>750</sub>	Ser	Ser
35	Arg	Ser	Arg <sub>755</sub>	Asn	Thr	Thr	Ala	Ala <sub>760</sub>	Asp	Thr	Tyr	Asn	Ile <sub>765</sub>	Thr	Asp	Pro
40	Glu	Glu <sub>770</sub>	Leu	Glu	Thr	Glu	Tyr <sub>775</sub>	Pro	Phe	Phe	Glu	Ser <sub>780</sub>	Arg	Val	Asp	Asn
	Lys <sub>785</sub>	Glu	Arg	Thr	Val	Ile <sub>790</sub>	Ser	Asn	Leu	Arg	Pro <sub>795</sub>	Phe	Thr	Leu	Tyr	Arg <sub>800</sub>
45	Ile	Asp	Ile	His	Ser <sub>805</sub>	Cys	Asn	His	Glu	Ala <sub>810</sub>	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys <sub>815</sub>	Ser
	Ala	Ser	Asn	Phe <sub>820</sub>	Val	Phe	Ala	Arg	Thr <sub>825</sub>	Met	Pro	Ala	Glu	Gly <sub>830</sub>	Ala	Asp
50	Asp	Ile	Pro <sub>835</sub>	Gly	Pro	Val	Thr	Trp <sub>840</sub>	Glu	Pro	Arg	Pro	Glu <sub>845</sub>	Asn	Ser	Ile
55	Phe	Leu <sub>850</sub>	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro <sub>855</sub>	Glu	Asn	Pro	Asn	Gly <sub>860</sub>	Leu	Ile	Leu	Met
	Tyr <sub>865</sub>	Glu	Ile	Lys	Tyr	Gly <sub>870</sub>	Ser	Gln	Val	Glu	Asp <sub>875</sub>	Gln	Arg	Glu	Cys	Val <sub>880</sub>
60	Ser	Arg	Gln	Glu	Tyr <sub>885</sub>	Arg	Lys	Tyr	Gly	Gly <sub>890</sub>	Ala	Lys	Leu	Asn	Arg <sub>895</sub>	Leu
	Asn	Pro	Gly	Asn <sub>900</sub>	Tyr	Thr	Ala	Arg	Ile <sub>905</sub>	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu <sub>910</sub>	Ser	Gly
65	Asn	Gly	Ser <sub>915</sub>	Trp	Thr	Asp	Pro	Val <sub>920</sub>	Phe	Phe	Tyr	Val	Gln <sub>925</sub>	Ala	Lys	Thr
70	Gly	Tyr <sub>930</sub>	Glu	Asn	His	His	His <sub>935</sub>	His	His	His	His					

5 <210> 88  
 <211> 939  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 10 <220>  
 <223> C7 fragment with His Tag  
 <400> 88  
  
 Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile  
 20 25 30  
 Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg  
 35 40 45  
 Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile  
 50 55 60  
 Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu  
 85 90 95  
 Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe  
 100 105 110  
 Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile  
 115 120 125  
 Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu  
 130 135 140  
 Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile  
 145 150 155 160  
 Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys  
 165 170 175  
 Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys  
 180 185 190  
 Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr  
 195 200 205  
 Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Val Cys Gly Lys Arg Ala Cys  
 210 215 220  
 Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys His  
 225 230 235 240  
 Thr Pro Asp Asp Asn Thr Thr Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr  
 245 250 255  
 Lys Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Arg Phe Glu  
 260 265 270  
 Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Pro Asn Ala  
 275 280 285  
 Glu Ser Ser Asp Ser Asp Gly Phe Val Ile His Asp Asp Glu Cys Met  
 290 295 300  
 70 Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Ser Thr Gln Ser Met Tyr

	305				310					315					320	
	Cys	Ile	Pro	Cys	Glu 325	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys 330	Val	Cys	Gly	Asp	Glu 335	Glu
5	Lys	Lys	Thr	Lys 340	Thr	Ile	Asp	Ser	Val 345	Thr	Ser	Ala	Gln	Met 350	Leu	Gln
10	Gly	Cys	Thr 355	Ile	Leu	Lys	Gly	Asn 360	Leu	Leu	Ile	Asn	Ile 365	Arg	Arg	Gly
	Asn	Asn 370	Ile	Ala	Ser	Glu	Leu 375	Glu	Asn	Phe	Met	Gly 380	Leu	Ile	Glu	Val
15	Val 385	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys 390	Ile	Arg	His	Ser	His 395	Ala	Leu	Val	Ser	Leu 400
	Ser	Phe	Leu	Lys	Asn 405	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu 410	Gly	Glu	Glu	Gln	Leu 415	Glu
20	Gly	Asn	Tyr	Ser 420	Phe	Tyr	Val	Leu	Asp 425	Asn	Gln	Asn	Leu	Gln 430	Gln	Leu
25	Trp	Asp	Trp 435	Asp	His	Arg	Asn	Leu 440	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly 445	Lys	Met	Tyr
	Phe	Ala 450	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu 455	Cys	Val	Ser	Glu	Ile 460	Tyr	Arg	Met	Glu
30	Glu 465	Val	Thr	Gly	Thr	Lys 470	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys 475	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr 480
35	Arg	Asn	Asn	Gly	Glu 485	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu 490	Ser	Asp	Val	Leu	His 495	Phe
	Thr	Ser	Thr	Thr 500	Thr	Ser	Lys	Asn	Arg 505	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp 510	His	Arg
40	Tyr	Arg	Pro 515	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp 520	Leu	Ile	Ser	Phe	Thr 525	Val	Tyr	Tyr
	Lys	Glu 530	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn 535	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp 540	Gly	Gln	Asp	Ala
45	Cys 545	Gly	Ser	Asn	Ser	Trp 550	Asn	Met	Val	Asp	Val 555	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn 560
50	Lys	Asp	Val	Glu	Pro 565	Gly	Ile	Leu	Leu	His 570	Gly	Leu	Lys	Pro	Trp 575	Thr
	Gln	Tyr	Ala	Val 580	Tyr	Val	Lys	Ala	Val 585	Thr	Leu	Thr	Met	Val 590	Glu	Asn
55	Asp	His	Ile 595	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser 600	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile 605	Arg	Thr	Asn
	Ala	Ser 610	Val	Pro	Ser	Ile	Pro 615	Leu	Asp	Val	Leu	Ser 620	Ala	Ser	Asn	Ser
60	Ser 625	Ser	Gln	Leu	Ile	Val 630	Lys	Trp	Asn	Pro	Pro 635	Ser	Leu	Pro	Asn	Gly 640
65	Asn	Leu	Ser	Tyr	Tyr 645	Ile	Val	Arg	Trp	Gln 650	Arg	Gln	Pro	Gln	Asp 655	Gly
	Tyr	Leu	Tyr	Arg 660	His	Asn	Tyr	Cys	Ser 665	Lys	Asp	Lys	Ile	Pro 670	Ile	Arg
70	Lys	Tyr	Ala	Asp	Gly	Thr	Ile	Asp	Ile	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Asn	Pro

	675		680		685												
	Lys	Thr	Glu	Val	Cys	Gly	Gly	Glu	Lys	Gly	Pro	Cys	Cys	Ala	Cys	Pro	
5		690					695					700					
	Lys	Thr	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Glu	Tyr	Arg	
	705					710					715					720	
10	Lys	Val	Phe	Glu	Asn	Phe	Leu	His	Asn	Ser	Ile	Phe	Val	Pro	Arg	Pro	
					725					730					735		
	Glu	Arg	Lys	Arg	Arg	Asp	Val	Met	Gln	Val	Ala	Asn	Thr	Thr	Met	Ser	
				740					745					750			
15	Ser	Arg	Ser	Arg	Asn	Thr	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Tyr	Asn	Ile	Thr	Asp	
			755					760					765				
	Pro	Glu	Glu	Leu	Glu	Thr	Glu	Tyr	Pro	Phe	Phe	Glu	Ser	Arg	Val	Asp	
20		770					775					780					
	Asn	Lys	Glu	Arg	Thr	Val	Ile	Ser	Asn	Leu	Arg	Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr	
	785					790					795					800	
25	Arg	Ile	Asp	Ile	His	Ser	Cys	Asn	His	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys	
					805					810					815		
	Ser	Ala	Ser	Asn	Phe	Val	Phe	Ala	Arg	Thr	Met	Pro	Ala	Glu	Gly	Ala	
				820					825					830			
30	Asp	Asp	Ile	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Trp	Glu	Pro	Arg	Pro	Glu	Asn	Ser	
			835					840					845				
	Ile	Phe	Leu	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Pro	Asn	Gly	Leu	Ile	Leu	
35		850					855					860					
	Met	Tyr	Glu	Ile	Lys	Tyr	Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Asp	Gln	Arg	Glu	Cys	
	865					870					875					880	
40	Val	Ser	Arg	Gln	Glu	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ala	Lys	Leu	Asn	Arg	
				885						890					895		
	Leu	Asn	Pro	Gly	Asn	Tyr	Thr	Ala	Arg	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Ser	
				900					905					910			
45	Gly	Asn	Gly	Ser	Trp	Thr	Asp	Pro	Val	Phe	Phe	Tyr	Val	Gln	Ala	Lys	
			915					920					925				
50	Thr	Gly	Tyr	Glu	Asn	His	His	His	His	His	His						
	930					935											
	<210>	89															
	<211>	938															
	<212>	PRT															
55	<213>	Artificial															
	<220>																
	<223>	C8 fragment with His Tag															
60	<400>	89															
	Met	Lys	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly	Leu	
	1				5					10					15		
65	Leu	Phe	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Ser	Leu	Trp	Pro	Thr	Ser	Gly	Glu	Ile	
				20					25					30			
	Cys	Gly	Pro	Gly	Ile	Asp	Ile	Arg	Asn	Asp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Lys	Arg	
70			35					40					45				

	Leu	Glu	Asn	Cys	Thr	Val	Ile	Glu	Gly	Tyr	Leu	His	Ile	Leu	Leu	Ile
	50						55					60				
5	Ser	Lys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Arg	Phe	Pro	Lys	Leu	Thr	Val
	65					70					75					80
	Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu	Leu	Leu	Phe	Arg	Val	Ala	Gly	Leu	Glu	Ser	Leu
					85					90					95	
10	Gly	Asp	Leu	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	Val	Ile	Arg	Gly	Trp	Lys	Leu	Phe
				100					105					110		
	Tyr	Asn	Tyr	Ala	Leu	Val	Ile	Phe	Glu	Met	Thr	Asn	Leu	Lys	Asp	Ile
			115					120					125			
15	Gly	Leu	Tyr	Asn	Leu	Arg	Asn	Ile	Thr	Arg	Gly	Ala	Ile	Arg	Ile	Glu
		130					135					140				
20	Lys	Asn	Ala	Asp	Leu	Cys	Tyr	Leu	Ser	Thr	Val	Asp	Trp	Ser	Leu	Ile
	145					150					155					160
	Leu	Asp	Ala	Val	Ser	Asn	Asn	Tyr	Ile	Val	Gly	Asn	Lys	Pro	Pro	Lys
					165					170					175	
25	Glu	Cys	Gly	Asp	Leu	Cys	Pro	Gly	Thr	Met	Glu	Glu	Lys	Pro	Met	Cys
				180					185					190		
	Glu	Lys	Thr	Thr	Ile	Asn	Asn	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Arg	Cys	Trp	Thr	Thr
			195					200					205			
30	Asn	Arg	Cys	Gln	Lys	Met	Cys	Pro	Ser	Thr	Cys	Gly	Lys	Arg	Ala	Cys
		210					215					220				
35	Thr	Glu	Asn	Asn	Glu	Cys	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Gly	Ser	Cys	Ser
	225					230					235					240
	Ala	Pro	Asp	Asn	Asp	Thr	Ala	Cys	Val	Ala	Cys	Arg	His	Tyr	Tyr	Tyr
					245					250					255	
40	Ala	Gly	Val	Cys	Val	Pro	Ala	Cys	Pro	Pro	Asn	Thr	Tyr	Arg	Phe	Glu
				260					265					270		
	Gly	Trp	Arg	Cys	Val	Asp	Arg	Asp	Phe	Cys	Ala	Asn	Ile	Leu	Ser	Ala
			275					280					285			
45	Glu	Ser	Ser	Asp	Ser	Glu	Gly	Phe	Val	Ile	His	Asp	Gly	Glu	Cys	Met
		290					295					300				
50	Gln	Glu	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Ile	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Ser	Met	Tyr
	305					310					315					320
	Cys	Ile	Pro	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys	Val	Cys	Glu	Glu	Glu	Lys
					325					330					335	
55	Lys	Thr	Lys	Thr	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Ala	Gln	Met	Leu	Gln	Gly
				340					345					350		
	Cys	Thr	Ile	Phe	Lys	Gly	Asn	Leu	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg	Arg	Gly	Asn
			355					360					365			
60	Asn	Ile	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu	Asn	Phe	Met	Gly	Leu	Ile	Glu	Val	Val
		370					375					380				
65	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys	Ile	Arg	His	Ser	His	Ala	Leu	Val	Ser	Leu	Ser
	385					390					395					400
	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu	Gly
				405						410				415		
70	Asn	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln	Leu	Trp

	420							425							430						
5	Asp	Trp	Asn	His	Arg	Asn	Leu	Thr	Val	Arg	Ser	Gly	Lys	Met	Tyr	Phe					
			435					440					445								
	Ala	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr	Arg	Met	Glu	Glu					
		450					455					460									
10	Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg					
	465					470					475					480					
	Asn	Asn	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	Asp	Val	Leu	His	Phe	Thr					
					485					490					495						
15	Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp	His	Arg	Tyr					
				500					505					510							
	Arg	Pro	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Phe	Thr	Val	Tyr	Tyr	Lys					
20			515					520					525								
	Glu	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Gly	Gln	Asp	Ala	Cys					
		530					535					540									
25	Gly	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn	Met	Val	Asp	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn	Lys					
	545					550					555					560					
	Asp	Val	Glu	Pro	Gly	Ile	Leu	Leu	His	Gly	Leu	Lys	Pro	Trp	Thr	Gln					
					565					570					575						
30	Tyr	Ala	Val	Tyr	Val	Lys	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Met	Val	Glu	Asn	Asp					
				580					585					590							
	His	Ile	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile	Arg	Thr	Asn	Ala					
35			595					600					605								
	Ser	Val	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu	Asp	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser	Ser					
		610					615					620									
40	Ser	Gln	Leu	Ile	Val	Lys	Trp	Asn	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Asn	Gly	Asn					
	625					630					635					640					
	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Val	Arg	Trp	Gln	Arg	Gln	Pro	Gln	Asp	Gly	Tyr					
					645					650					655						
45	Leu	Tyr	Arg	His	Asn	Tyr	Cys	Ser	Lys	Asp	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Lys					
				660					665					670							
	Tyr	Ala	Asp	Gly	Thr	Ile	Asp	Ile	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Asn	Pro	Lys					
50			675					680					685								
	Thr	Glu	Val	Cys	Gly	Gly	Glu	Lys	Gly	Pro	Cys	Cys	Ala	Cys	Pro	Lys					
		690					695					700									
55	Thr	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Glu	Tyr	Arg	Lys					
	705					710					715					720					
	Val	Phe	Glu	Asn	Phe	Leu	His	Asn	Ser	Ile	Phe	Val	Pro	Arg	Pro	Glu					
					725					730					735						
60	Arg	Lys	Arg	Arg	Asp	Val	Met	Gln	Val	Ala	Asn	Thr	Thr	Met	Ser	Ser					
				740					745					750							
	Arg	Ser	Arg	Asn	Thr	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Tyr	Asn	Ile	Thr	Asp	Pro					
65			755					760					765								
	Glu	Glu	Leu	Glu	Thr	Glu	Tyr	Pro	Phe	Phe	Glu	Ser	Arg	Val	Asp	Asn					
		770					775					780									
70	Lys	Glu	Arg	Thr	Val	Ile	Ser	Asn	Leu	Arg	Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr	Arg					
	785					790					795					800					

5	Ile	Asp	Ile	His	Ser 805	Cys	Asn	His	Glu	Ala 810	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys 815	Ser
	Ala	Ser	Asn	Phe 820	Val	Phe	Ala	Arg	Thr 825	Met	Pro	Ala	Glu	Gly 830	Ala	Asp
10	Asp	Ile	Pro 835	Gly	Pro	Val	Thr	Trp 840	Glu	Pro	Arg	Pro	Glu 845	Asn	Ser	Ile
	Phe	Leu 850	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro 855	Glu	Asn	Pro	Asn	Gly 860	Leu	Ile	Leu	Met
15	Tyr 865	Glu	Ile	Lys	Tyr	Gly 870	Ser	Gln	Val	Glu	Asp 875	Gln	Arg	Glu	Cys	Val 880
	Ser	Arg	Gln	Glu	Tyr 885	Arg	Lys	Tyr	Gly	Gly 890	Ala	Lys	Leu	Asn	Arg 895	Leu
20	Asn	Pro	Gly	Asn 900	Tyr	Thr	Ala	Arg	Ile 905	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu 910	Ser	Gly
	Asn	Gly	Ser 915	Trp	Thr	Asp	Pro	Val 920	Phe	Phe	Tyr	Val	Gln 925	Ala	Lys	Thr
25	Gly	Tyr 930	Glu	Asn	His	His	His 935	His	His	His						
30	<210>		90													
	<211>		942													
35	<212>		PRT													
	<213>		Artificial													
40	<220>															
	<223>		C9 fragment with His Tag													
45	<400>		90													
	Met 1	Lys	Ser	Gly	Ser 5	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro 10	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly 15	Leu
50	Val	Phe	Leu	Ser 20	Ala	Ala	Leu	Ser	Leu 25	Trp	Pro	Thr	Ser	Gly 30	Glu	Ile
	Cys	Gly	Pro 35	Gly	Ile	Asp	Ile	Arg	Asn	Asp	Tyr	Gln	Gln 45	Leu	Lys	Arg
55	Leu	Glu 50	Asn	Cys	Thr	Val	Ile 55	Glu	Gly	Phe	Leu	His 60	Ile	Leu	Leu	Ile
	Ser 65	Lys	Ala	Glu	Asp	Tyr 70	Arg	Ser	Tyr	Arg	Phe 75	Pro	Lys	Leu	Thr	Val 80
60	Ile	Thr	Glu	Tyr	Leu 85	Leu	Leu	Phe	Arg	Val 90	Ala	Gly	Leu	Glu	Ser 95	Leu
	Gly	Asp	Leu	Phe 100	Pro	Asn	Leu	Thr	Val 105	Ile	Arg	Gly	Trp	Lys 110	Leu	Phe
65	Tyr	Asn	Tyr 115	Ala	Leu	Val	Ile	Phe 120	Glu	Met	Thr	Asn	Leu 125	Lys	Asp	Ile
	Gly	Leu 130	Tyr	Asn	Leu	Arg	Asn 135	Ile	Thr	Arg	Gly	Ala 140	Ile	Arg	Ile	Glu
70	Lys 145	Asn	Ala	Asp	Leu	Cys 150	Tyr	Leu	Ser	Thr	Ile 155	Asp	Trp	Ser	Leu	Ile 160

	Leu	Asp	Ala	Val	Ser 165	Asn	Asn	Tyr	Ile	Val 170	Gly	Asn	Lys	Pro	Pro 175	Lys
5	Glu	Cys	Gly	Asp 180	Leu	Cys	Pro	Gly	Thr 185	Leu	Glu	Glu	Lys	Pro 190	Met	Cys
	Glu	Lys	Thr 195	Thr	Ile	Asn	Asn	Glu 200	Tyr	Asn	Tyr	Arg	Cys 205	Trp	Thr	Thr
10	Asn	Arg 210	Cys	Gln	Lys	Met	Cys 215	Pro	Ser	Val	Cys	Gly 220	Lys	Arg	Ala	Cys
	Thr 225	Glu	Asn	Asn	Glu	Cys 230	Cys	His	Pro	Glu	Cys 235	Leu	Gly	Ser	Cys	His 240
	Thr	Pro	Asp	Asp	Asn 245	Thr	Thr	Cys	Val	Ala 250	Cys	Arg	His	Tyr	Tyr 255	Tyr
20	Lys	Gly	Val	Cys 260	Val	Pro	Ala	Cys	Pro 265	Pro	Gly	Thr	Tyr	Arg 270	Phe	Glu
	Gly	Trp	Arg 275	Cys	Val	Asp	Arg	Asp 280	Phe	Cys	Ala	Asn	Ile 285	Pro	Asn	Ala
25	Glu	Ser 290	Ser	Asp	Ser	Asp	Gly 295	Phe	Val	Ile	His	Asp 300	Asp	Glu	Cys	Met
	Gln 305	Glu	Cys	Pro	Ser	Gly 310	Phe	Ile	Arg	Asn	Ser 315	Thr	Gln	Ser	Met	Tyr 320
30	Cys	Ile	Pro	Cys	Glu 325	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys 330	Val	Cys	Gly	Asp	Glu 335	Glu
	Lys	Lys	Thr	Lys 340	Thr	Ile	Asp	Ser	Val 345	Thr	Ser	Ala	Gln	Met 350	Leu	Gln
	Gly	Cys	Thr 355	Ile	Leu	Lys	Gly	Asn 360	Leu	Leu	Ile	Asn	Ile 365	Arg	Arg	Gly
40	Asn	Asn 370	Ile	Ala	Ser	Glu	Leu 375	Glu	Asn	Phe	Met	Gly 380	Leu	Ile	Glu	Val
	Val 385	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys 390	Ile	Arg	His	Ser	His 395	Ala	Leu	Val	Ser	Leu 400
45	Ser	Phe	Leu	Lys	Asn 405	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu 410	Gly	Glu	Glu	Gln	Leu 415	Glu
50	Gly	Asn	Tyr	Ser 420	Phe	Tyr	Val	Leu	Asp 425	Asn	Gln	Asn	Leu	Gln 430	Gln	Leu
	Trp	Asp	Trp 435	Asn	His	Arg	Asn	Leu 440	Thr	Val	Arg	Ser	Gly 445	Lys	Met	Tyr
55	Phe	Ala 450	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu 455	Cys	Val	Ser	Glu	Ile 460	Tyr	Arg	Met	Glu
	Glu 465	Val	Thr	Gly	Thr	Lys 470	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys 475	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr 480
60	Arg	Asn	Asn	Gly	Glu 485	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu 490	Ser	Asp	Val	Leu	His 495	Phe
65	Thr	Ser	Thr	Thr 500	Thr	Trp	Lys	Asn	Arg 505	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp 510	His	Arg
	Tyr	Arg	Pro 515	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp 520	Leu	Ile	Ser	Phe	Thr 525	Val	Tyr	Tyr
70																



	Lys	Glu	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Gly	Gln	Asp	Ala
	530					535						540				
5	Cys	Gly	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn	Met	Val	Asp	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn
	545					550					555					560
	Lys	Glu	Gly	Glu	Pro	Gly	Ile	Leu	Leu	His	Gly	Leu	Lys	Pro	Trp	Thr
					565					570					575	
10	Gln	Tyr	Ala	Val	Tyr	Val	Lys	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Met	Val	Glu	Asn
				580					585					590		
15	Asp	His	Ile	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile	Arg	Thr	Asn
			595					600					605			
	Ala	Ser	Val	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu	Asp	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser
		610					615					620				
20	Ser	Ser	Gln	Leu	Ile	Val	Lys	Trp	Asn	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Asn	Gly
	625					630					635					640
	Asn	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Val	Arg	Trp	Gln	Arg	Gln	Pro	Gln	Asp	Gly
					645					650					655	
25	Tyr	Leu	Tyr	Arg	His	Asn	Tyr	Cys	Ser	Lys	Asp	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg
				660					665					670		
30	Lys	Tyr	Ala	Asp	Gly	Thr	Ile	Asp	Val	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Asn	Pro
			675					680					685			
	Lys	Thr	Glu	Val	Cys	Gly	Gly	Asp	Lys	Gly	Pro	Cys	Cys	Ala	Cys	Pro
		690					695					700				
35	Lys	Thr	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Glu	Tyr	Arg
	705					710					715					720
	Lys	Val	Phe	Glu	Asn	Phe	Leu	His	Asn	Ser	Ile	Phe	Val	Pro	Arg	Pro
40					725					730					735	
	Glu	Arg	Arg	Arg	Arg	Asp	Val	Met	Gln	Val	Ala	Asn	Thr	Thr	Met	Ser
				740					745					750		
45	Ser	Arg	Ser	Arg	Asn	Thr	Thr	Val	Ala	Asp	Thr	Tyr	Asn	Ile	Thr	Asp
			755					760					765			
	Pro	Glu	Glu	Phe	Glu	Thr	Glu	Tyr	Pro	Phe	Phe	Glu	Ser	Arg	Val	Asp
		770					775					780				
50	Asn	Lys	Glu	Arg	Thr	Val	Ile	Ser	Asn	Leu	Arg	Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr
	785					790					795					800
	Arg	Ile	Asp	Ile	His	Ser	Cys	Asn	His	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys
55					805					810					815	
	Ser	Ala	Ser	Asn	Phe	Val	Phe	Ala	Arg	Thr	Met	Pro	Ala	Glu	Gly	Ala
				820					825					830		
60	Asp	Asp	Ile	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Trp	Glu	Pro	Arg	Pro	Glu	Asn	Ser
			835					840					845			
	Ile	Phe	Leu	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Pro	Asn	Gly	Leu	Ile	Leu
		850					855					860				
65	Met	Tyr	Glu	Ile	Lys	Tyr	Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Asp	Gln	Arg	Glu	Cys
	865					870					875					880
	Val	Ser	Arg	Gln	Glu	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ala	Lys	Leu	Asn	Arg
70					885					890					895	

Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser  
 900 905 910  
 5 Gly Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Pro Ala Lys  
 915 920 925  
 Thr Thr Tyr Glu Asn Phe Met His His His His His His His  
 930 935 940  
 10  
 <210> 91  
 <211> 942  
 <212> PRT  
 15 <213> artificial  
 <220>  
 <223> IGF-1R (murine), extracellular domain with His Tag  
 20 <400> 91  
 Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu  
 1 5 10 15  
 25 Val Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile  
 20 25 30  
 30 Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg  
 35 35 40 45  
 Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Phe Leu His Ile Leu Leu Ile  
 50 55 60  
 35 Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu  
 85 90 95  
 40 Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe  
 100 105 110  
 45 Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile  
 115 120 125  
 Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu  
 130 135 140  
 50 Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Ile Asp Trp Ser Leu Ile  
 145 150 155 160  
 Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys  
 165 170 175  
 55 Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Leu Glu Glu Lys Pro Met Cys  
 180 185 190  
 60 Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr  
 195 200 205  
 Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Val Cys Gly Lys Arg Ala Cys  
 210 215 220  
 65 Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys His  
 225 230 235 240  
 Thr Pro Asp Asp Asn Thr Thr Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr  
 245 250 255  
 70

	Lys	Gly	Val	Cys 260	Val	Pro	Ala	Cys	Pro 265	Pro	Gly	Thr	Tyr	Arg 270	Phe	Glu
5	Gly	Trp	Arg 275	Cys	Val	Asp	Arg	Asp 280	Phe	Cys	Ala	Asn	Ile 285	Pro	Asn	Ala
	Glu	Ser 290	Ser	Asp	Ser	Asp	Gly 295	Phe	Val	Ile	His	Asp 300	Asp	Glu	Cys	Met
10	Gln 305	Glu	Cys	Pro	Ser	Gly 310	Phe	Ile	Arg	Asn	Ser 315	Thr	Gln	Ser	Met	Tyr 320
	Cys	Ile	Pro	Cys	Glu 325	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys 330	Val	Cys	Gly	Asp	Glu 335	Glu
15																
	Lys	Lys	Thr	Lys 340	Thr	Ile	Asp	Ser	Val 345	Thr	Ser	Ala	Gln	Met 350	Leu	Gln
20	Gly	Cys	Thr 355	Ile	Leu	Lys	Gly	Asn 360	Leu	Leu	Ile	Asn	Ile 365	Arg	Arg	Gly
	Asn	Asn 370	Ile	Ala	Ser	Glu	Leu 375	Glu	Asn	Phe	Met	Gly 380	Leu	Ile	Glu	Val
25	Val 385	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys 390	Ile	Arg	His	Ser	His 395	Ala	Leu	Val	Ser	Leu 400
	Ser	Phe	Leu	Lys	Asn 405	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu 410	Gly	Glu	Glu	Gln	Leu 415	Glu
30	Gly	Asn	Tyr	Ser 420	Phe	Tyr	Val	Leu	Asp 425	Asn	Gln	Asn	Leu	Gln 430	Gln	Leu
	Trp	Asp	Trp 435	Asn	His	Arg	Asn	Leu 440	Thr	Val	Arg	Ser	Gly 445	Lys	Met	Tyr
35																
	Phe	Ala 450	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu 455	Cys	Val	Ser	Glu	Ile 460	Tyr	Arg	Met	Glu
40	Glu 465	Val	Thr	Gly	Thr	Lys 470	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys 475	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr 480
	Arg	Asn	Asn	Gly	Glu 485	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu 490	Ser	Asp	Val	Leu	Arg 495	Phe
45																
	Thr	Ser	Thr	Thr 500	Thr	Trp	Lys	Asn	Arg 505	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp 510	His	Arg
50	Tyr	Arg	Pro 515	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp 520	Leu	Ile	Ser	Phe	Thr 525	Val	Tyr	Tyr
	Lys	Glu 530	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn 535	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp 540	Gly	Gln	Asp	Ala
55																
	Cys 545	Gly	Ser	Asn	Ser	Trp 550	Asn	Met	Val	Asp	Val 555	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn 560
60	Lys	Glu	Gly	Glu	Pro 565	Gly	Ile	Leu	Leu	His 570	Gly	Leu	Lys	Pro	Trp 575	Thr
	Gln	Tyr	Ala	Val 580	Tyr	Val	Lys	Ala	Val 585	Thr	Leu	Thr	Met	Val 590	Glu	Asn
65	Asp	His	Ile 595	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser 600	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile 605	Arg	Thr	Asn
	Ala	Ser 610	Val	Pro	Ser	Ile	Pro 615	Leu	Asp	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser
70																

	Ser	Ser	Gln	Leu	Ile	Val	Lys	Trp	Asn	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Asn	Gly
	625					630					635					640
5	Asn	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Val	Arg	Trp	Gln	Arg	Gln	Pro	Gln	Asp	Gly
					645					650					655	
	Tyr	Leu	Tyr	Arg	His	Asn	Tyr	Cys	Ser	Lys	Asp	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg
				660					665					670		
10	Lys	Tyr	Ala	Asp	Gly	Thr	Ile	Asp	Val	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Asn	Pro
			675					680					685			
	Lys	Thr	Glu	Val	Cys	Gly	Gly	Asp	Lys	Gly	Pro	Cys	Cys	Ala	Cys	Pro
		690					695					700				
15	Lys	Thr	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Glu	Tyr	Arg
	705					710					715					720
	Lys	Val	Phe	Glu	Asn	Phe	Leu	His	Asn	Ser	Ile	Phe	Val	Pro	Arg	Pro
20					725					730					735	
	Glu	Arg	Arg	Arg	Arg	Asp	Val	Met	Gln	Val	Ala	Asn	Thr	Thr	Met	Ser
				740					745					750		
25	Ser	Arg	Ser	Arg	Asn	Thr	Thr	Val	Ala	Asp	Thr	Tyr	Asn	Ile	Thr	Asp
			755					760					765			
	Pro	Glu	Glu	Phe	Glu	Thr	Glu	Tyr	Pro	Phe	Phe	Glu	Ser	Arg	Val	Asp
		770					775					780				
30	Asn	Lys	Glu	Arg	Thr	Val	Ile	Ser	Asn	Leu	Arg	Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr
	785					790					795					800
	Arg	Ile	Asp	Ile	His	Ser	Cys	Asn	His	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys
35					805					810					815	
	Ser	Ala	Ser	Asn	Phe	Val	Phe	Ala	Arg	Thr	Met	Pro	Ala	Glu	Gly	Ala
				820					825					830		
40	Asp	Asp	Ile	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Trp	Glu	Pro	Arg	Pro	Glu	Asn	Ser
			835					840					845			
	Ile	Phe	Leu	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Pro	Asn	Gly	Leu	Ile	Leu
		850					855					860				
45	Met	Tyr	Glu	Ile	Lys	Tyr	Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Asp	Gln	Arg	Glu	Cys
	865					870					875					880
	Val	Ser	Arg	Gln	Glu	Tyr	Arg	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ala	Lys	Leu	Asn	Arg
50					885					890					895	
	Leu	Asn	Pro	Gly	Asn	Tyr	Thr	Ala	Arg	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Ser
				900					905					910		
55	Gly	Asn	Gly	Ser	Trp	Thr	Asp	Pro	Val	Phe	Phe	Tyr	Val	Pro	Ala	Lys
			915					920					925			
	Thr	Thr	Tyr	Glu	Asn	Phe	Met	His	His	His	His	His	His	His	His	
		930					935					940				
60																
	<210>	92														
	<211>	512														
	<212>	PRT														
65	<213>	Artificial														
	<220>															
	<223>	Mutated IGF-1R ECD Nterminal with Alanine at position 491														
70	<400>	92														

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

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val  
 370 375 380  
 5 Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser  
 385 390 395 400  
 Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly  
 405 410 415  
 10 Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp  
 420 425 430  
 Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe  
 435 440 445  
 15 Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu  
 450 455 460  
 20 Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg  
 465 470 475 480  
 Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Ala Val Leu His Phe Thr  
 485 490 495  
 25 Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr  
 500 505 510

# ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 30 1. Інтерналізоване моноклональне антитіло або його інтерналізований IGF-1R-зв'язуючий фрагмент, що зв'язується з людським рецептором інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF-1R) послідовності SEQ ID NO:52 та інтерналізується після зв'язування з IGF-1R, і яке не зв'язується з IGF-1R послідовності SEQ ID NO:82 і/або SEQ ID NO:92, де зазначене антитіло містить:
- 35 - три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3, і  
 - три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11,  
 де зазначені CDR визначені відповідно IMGT.
- 40 2. Інтерналізоване моноклональне антитіло за п. 1 або його інтерналізований IGF-1R-зв'язуючий фрагмент, де епітоп зазначеного інтерналізованого моноклонального антитіла містить амінокислоту гістидин у позиції 494 послідовності SEQ ID NO:52 і/або амінокислоту, аспарагінову кислоту у позиції 491 послідовності SEQ ID NO:52.
- 45 3. Інтерналізоване моноклональне антитіло за п. 2 або його інтерналізований IGF-1R-зв'язуючий фрагмент, в якому зазначений епітоп містить амінокислотну послідовність, що складається щонайменше з 8 амінокислот.
- 50 4. Інтерналізоване моноклональне антитіло за п. 1 або його інтерналізований IGF-1R-зв'язуючий фрагмент, відсоток інтерналізації якого після його зв'язування з IGF-1R складає щонайменше 40 %.
5. Інтерналізоване моноклональне антитіло за п. 1 або його інтерналізований IGF-1R-зв'язуючий фрагмент, в якому зазначена амінокислота у позиції 494 послідовності SEQ ID NO:52, що відрізняється від гістидину, являє собою аргінін, і/або зазначена амінокислота у позиції 491 послідовності SEQ ID NO:52, що відрізняється від аспарагінової кислоти, являє собою аланін.
6. Інтерналізоване моноклональне антитіло за п. 1, де зазначене антитіло є химерним антитілом.
7. Інтерналізоване антитіло за п. 6, де зазначене антитіло вибране з наступних:
- 55 а) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:13 або будь-якої послідовності, яка демонструє щонайменше 80 % ідентичність з SEQ ID NO:13, і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11; і  
 б) антитіло, що містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:18 або будь-якої послідовності, яка демонструє щонайменше 80 % ідентичність з SEQ ID NO:18, і три CDR важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3.
- 60 8. Інтерналізоване антитіло за п. 6 або п. 7, де зазначене антитіло містить або складається з важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:23 і легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:28.
9. Інтерналізоване антитіло за п. 1, де зазначене антитіло являє собою гуманізоване антитіло.
10. Інтерналізоване антитіло за п. 9, де зазначене антитіло містить:

а) важкий ланцюг, що має CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3, відповідно, і FR1, FR2 і FR3, отримані з IGHV1-46\*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO:44), і FR4, отриманий з IGJH4\*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO:46); і

5 б) легкий ланцюг, що має CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11, відповідно, і FR1, FR2 і FR3, отримані з IGKV1-39\*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO:45), і FR4, отриманий з IGKJ4\*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO:47).

11. Інтерналізоване антитіло за п. 10, де зазначене антитіло вибране з наступних:

а) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:33 або будь-якої послідовності, яка демонструє щонайменше 80 % ідентичність з SEQ ID NO:33, і три CDR-ділянки легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11;

10 б) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:34 або будь-якої послідовності, яка демонструє щонайменше 80 % ідентичність з SEQ ID NO:34, і три CDR-ділянки легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11; і

15 с) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності, вибраної з SEQ ID NO:56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80 або будь-якої послідовності, яка демонструє щонайменше 80 % ідентичність з SEQ ID NO:56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80, і три CDR легкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:9, 5 і 11.

12. Інтерналізоване антитіло за п. 10, де зазначене антитіло вибране з наступних:

а) антитіло, що містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:35 або будь-якої послідовності, яка демонструє щонайменше 80 % ідентичність з SEQ ID NO:35, і три CDR-ділянки важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3;

20 б) антитіло, що містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:36 або будь-якої послідовності, яка демонструє щонайменше 80 % ідентичність з SEQ ID NO:36, і три CDR-ділянки важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3; і

25 с) антитіло, що містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності, вибраної з SEQ ID NO:57 і 60 або будь-якої послідовності, яка демонструє щонайменше 80 % ідентичність з SEQ ID NO:57 або 60, і три CDR-ділянки важкого ланцюга послідовностей SEQ ID NO:7, 2 і 3.

13. Інтерналізоване антитіло за п. 10, де зазначене антитіло вибране з наступних:

а) антитіло, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:37 або будь-якої послідовності, яка демонструє щонайменше 80 % ідентичність з SEQ ID NO:37, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:39 або будь-якої послідовності, яка демонструє щонайменше 80 % ідентичність з SEQ ID NO:39;

30 б) антитіло, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:38 або будь-якої послідовності, яка демонструє щонайменше 80 % ідентичність з SEQ ID NO:38, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO:40 або будь-якої послідовності, яка демонструє щонайменше 80 % ідентичність з SEQ ID NO:40; і

40 с) антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності, вибраної з SEQ ID NO:56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80 або будь-якої послідовності, яка демонструє щонайменше 80 % ідентичність з SEQ ID NO:56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 або 80, і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності, вибраної з SEQ ID NO:57 і 60 або будь-якої послідовності, яка демонструє щонайменше 80 % ідентичність з SEQ ID NO:57 або 60.

14. Інтерналізоване антитіло за п. 10, де зазначене антитіло містить:

а) варіабельний домен важкого ланцюга (VH) послідовності SEQ ID NO:33, де зазначена послідовність SEQ ID NO:33 містить щонайменше 1 зворотну мутацію, вибрану з залишків 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 і 95; а також

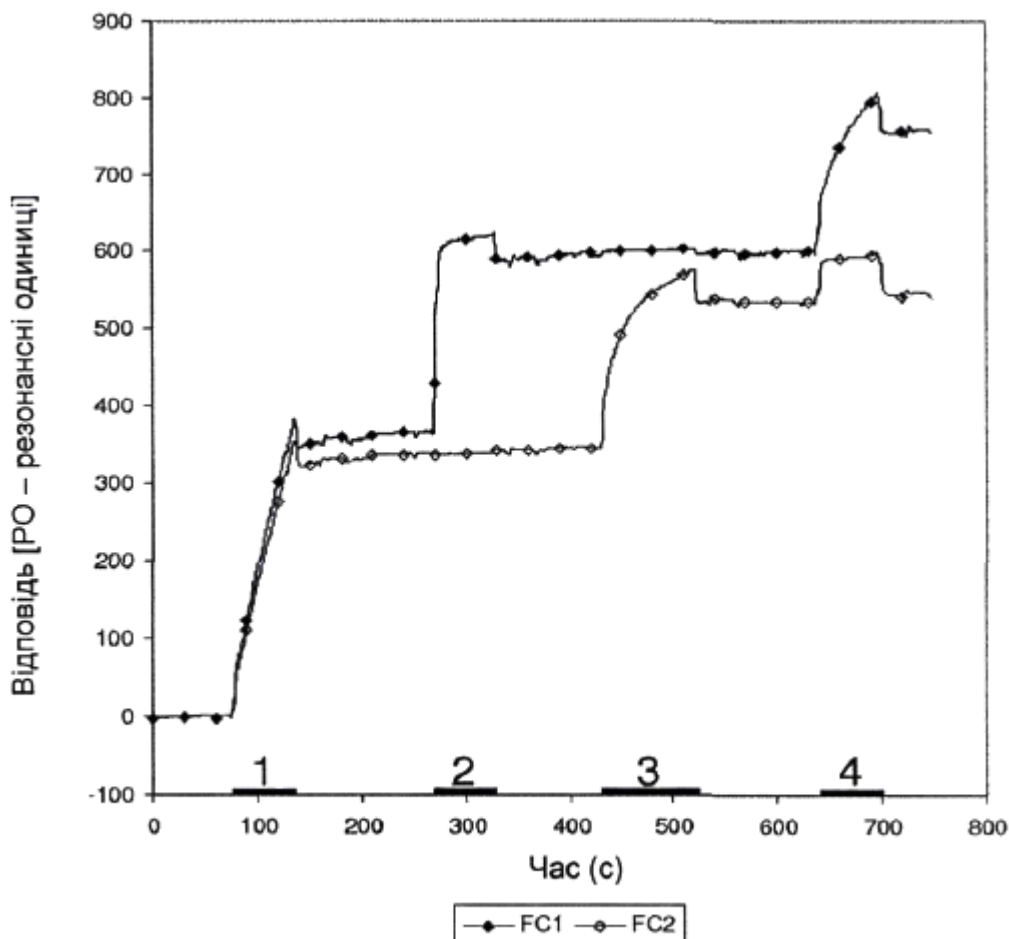
45 б) варіабельний домен легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID NO:35, де зазначена послідовність SEQ ID NO:35 містить щонайменше 1 зворотну мутацію, вибрану з залишків 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 і 87.

15. Інтерналізоване антитіло за п. 1, де зазначене антитіло продукується гібридомою I-4757, депонованою в CNCM, Інститут Пастера, Франція, 30 травня 2013 року.

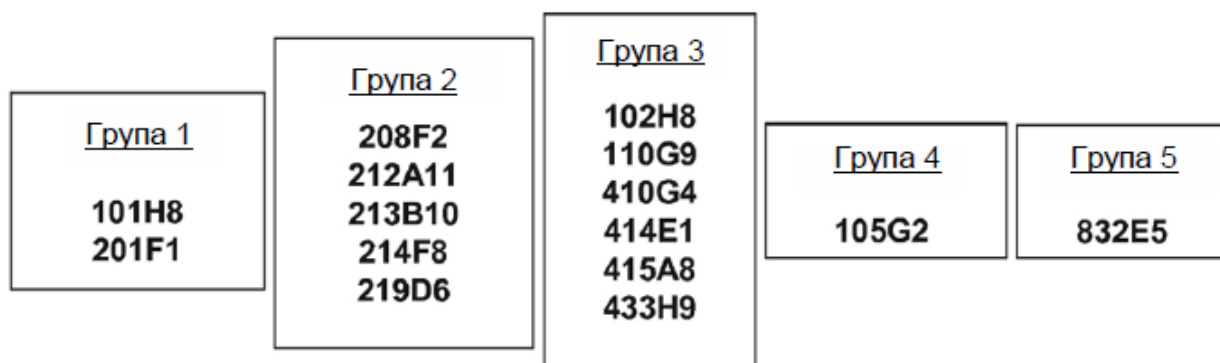
16. Мишача гібридома I-4757, депонована в CNCM, Інститут Пастера, Франція, 30 травня 2013 року для одержання антитіла за п. 1.

17. Інтерналізоване моноклональне антитіло за п. 1 або його інтерналізований антигензв'язуючий фрагмент для застосування як адресуючого переносника для доставки цитотоксичного агента в місце-мішень хазяїна, при цьому зазначене місце-мішень хазяїна складається з епітопа, локалізованого у позаклітинному домені білка IGF-1R, переважно у позаклітинному домені людського білка IGF-1R (SEQ ID NO:51), переважніше на N-кінці позаклітинного домену людського IGF-1R (SEQ ID NO:52), або у послідовності будь-якого їх природного варіанта.

18. Кон'югат "антитіло-лікарський засіб" для лікування раку, експресуючого IGF-1R, що містить інтерналізоване моноклональне антитіло за п. 1 або його інтерналізований антигензв'язуючий фрагмент, кон'югований з цитотоксичним агентом.
19. Фармацевтична композиція для лікування раку, експресуючого IGF-1R, що містить інтерналізоване моноклональне антитіло за п. 1 або кон'югат "антитіло-лікарський засіб" за п. 18 і щонайменше ексципієнт і/або фармацевтично прийнятний носій.
20. Кон'югат "антитіло-лікарський засіб" за п. 18 або фармацевтична композиція за п. 19 для застосування для доставки лікарського засобу або медикаменту до ракової клітини, експресуючої IGF-1R, у суб'єкта.

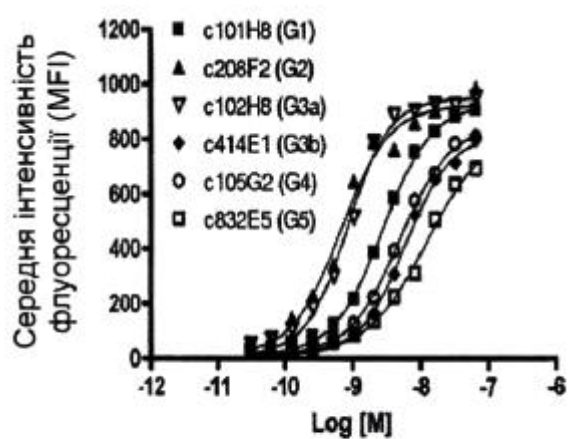


ФІГ. 1

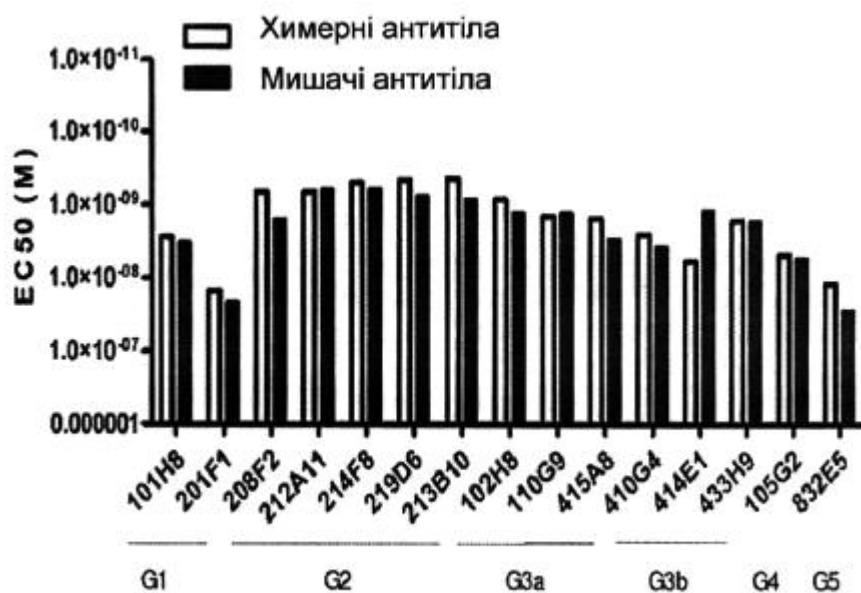


ФІГ. 2

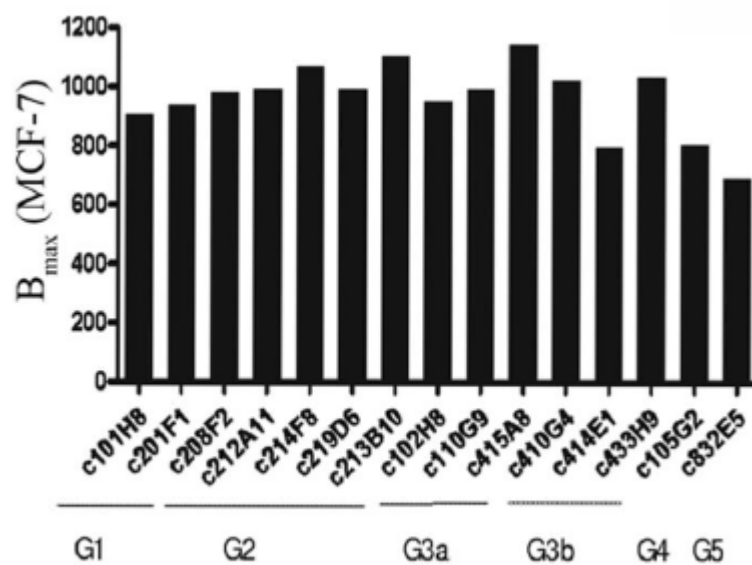




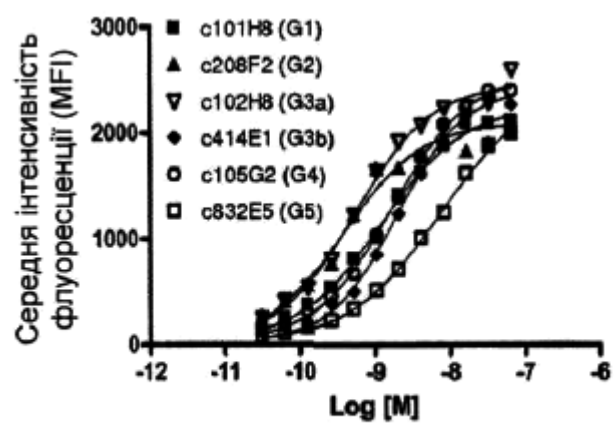
ФІГ. 3А



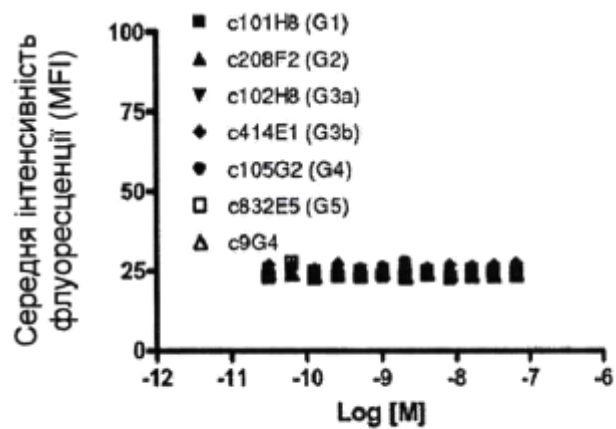
ФІГ. 3В



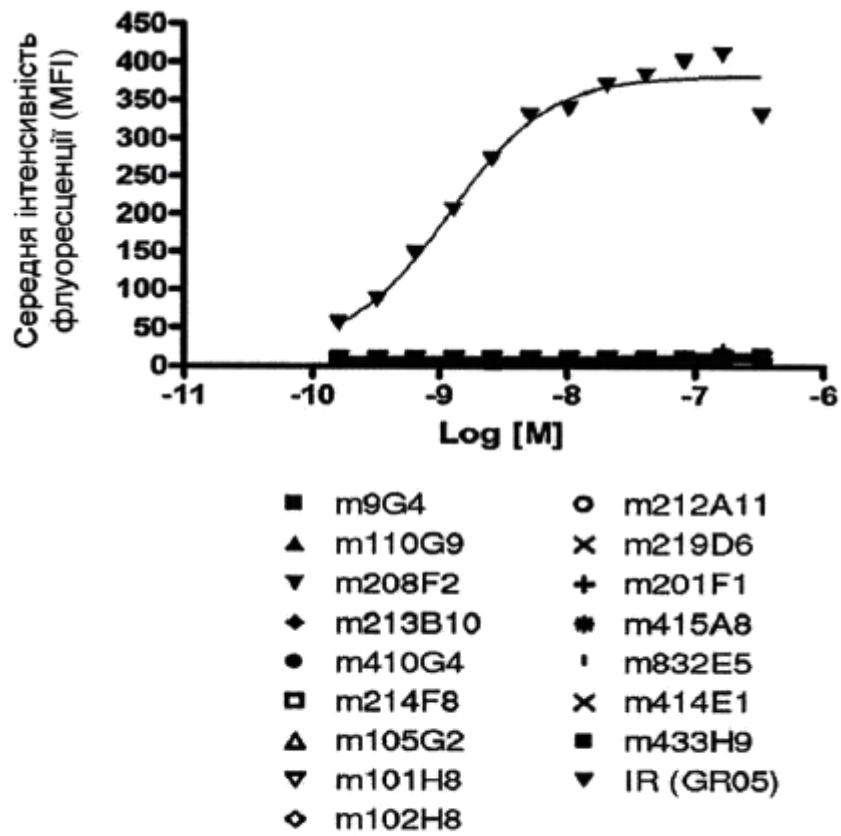
ФІГ. 3С



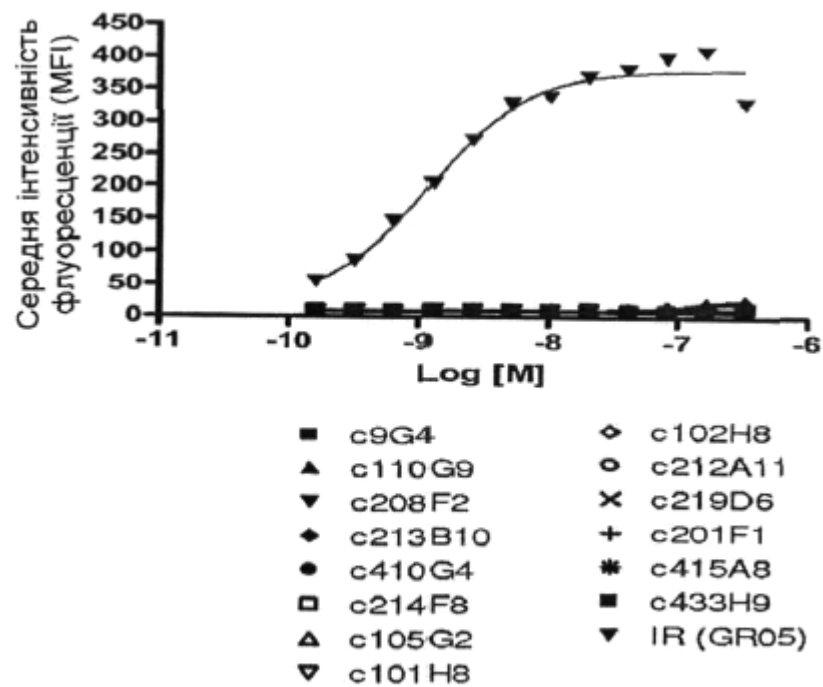
ФІГ. 4А



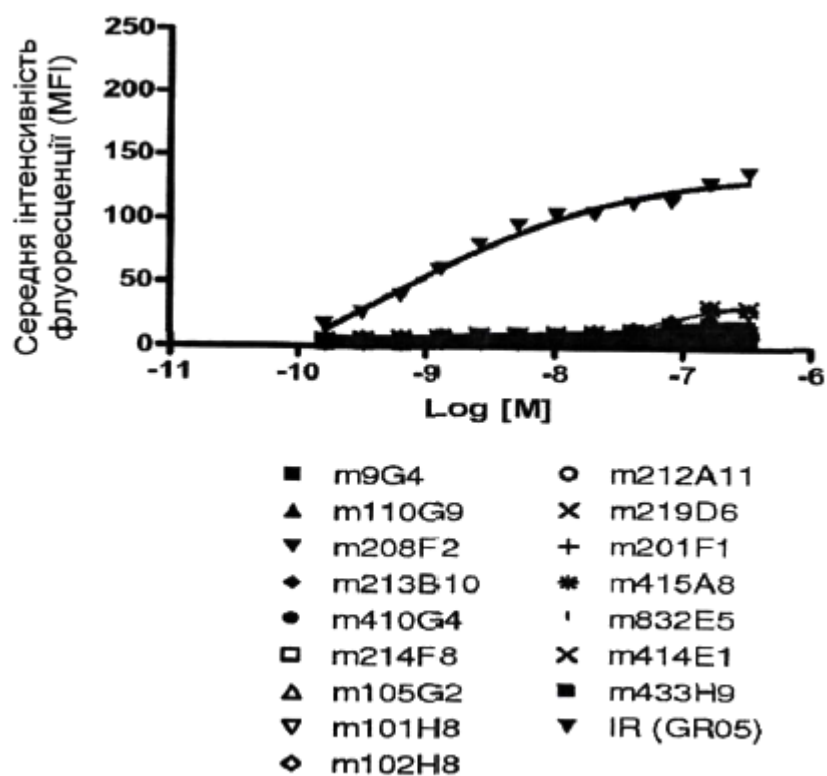
ФІГ. 4В



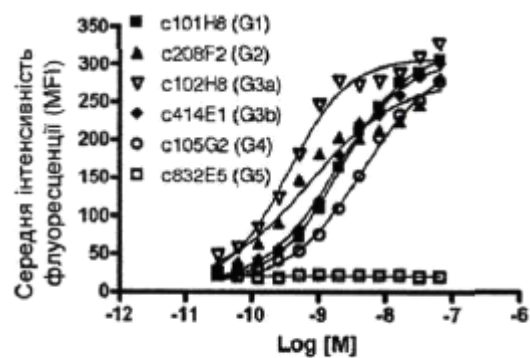
ФІГ. 5А



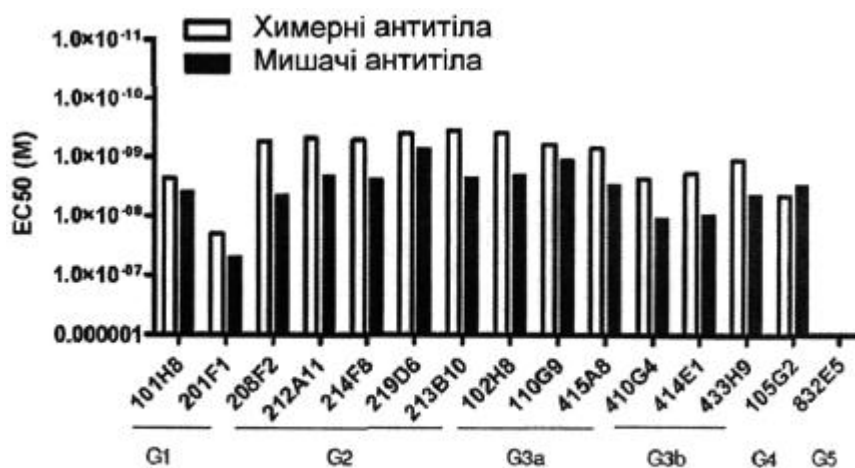
ФІГ. 5В



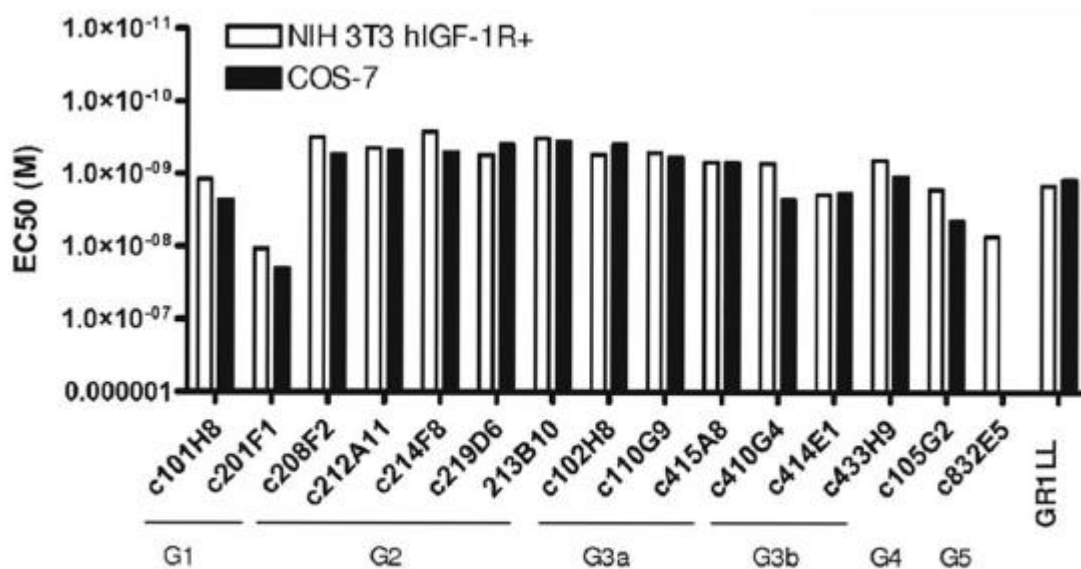
ФІГ. 6



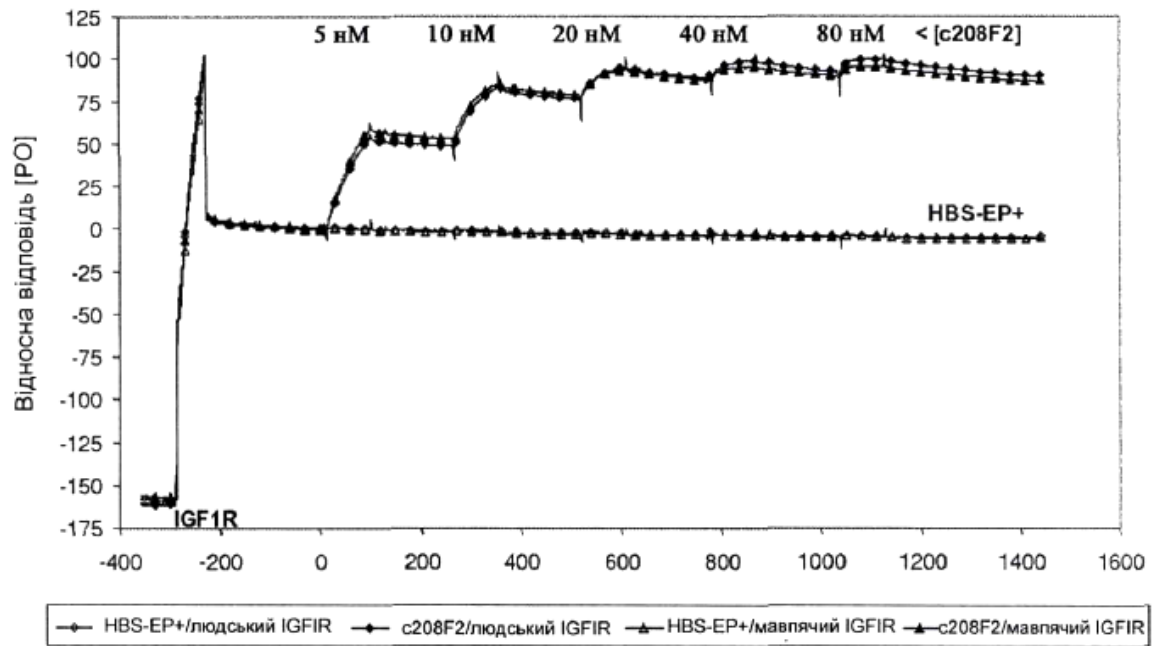
ФІГ. 7A



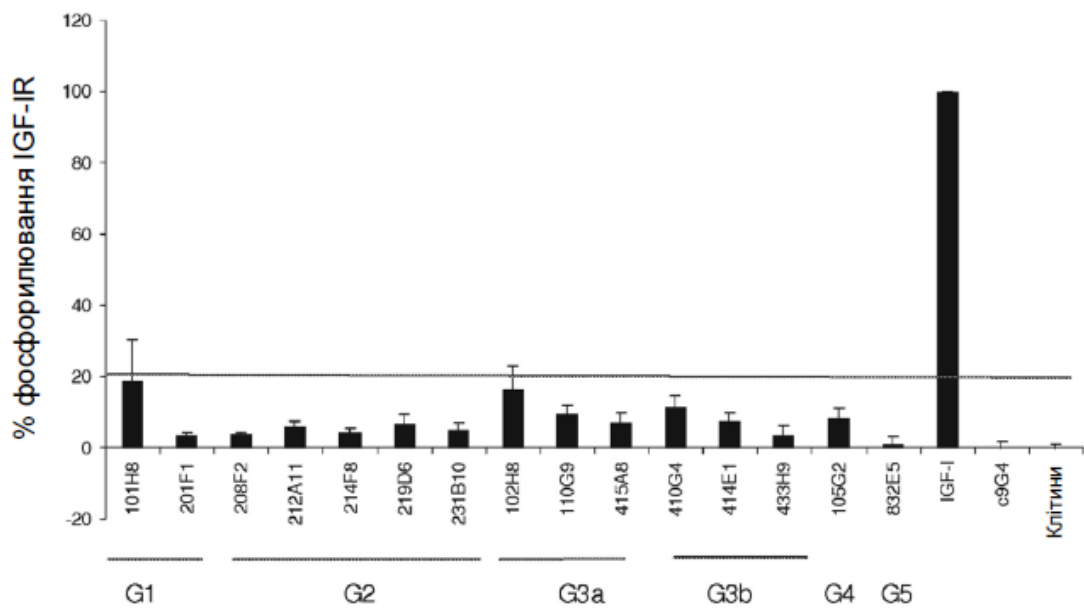
ФІГ. 7В



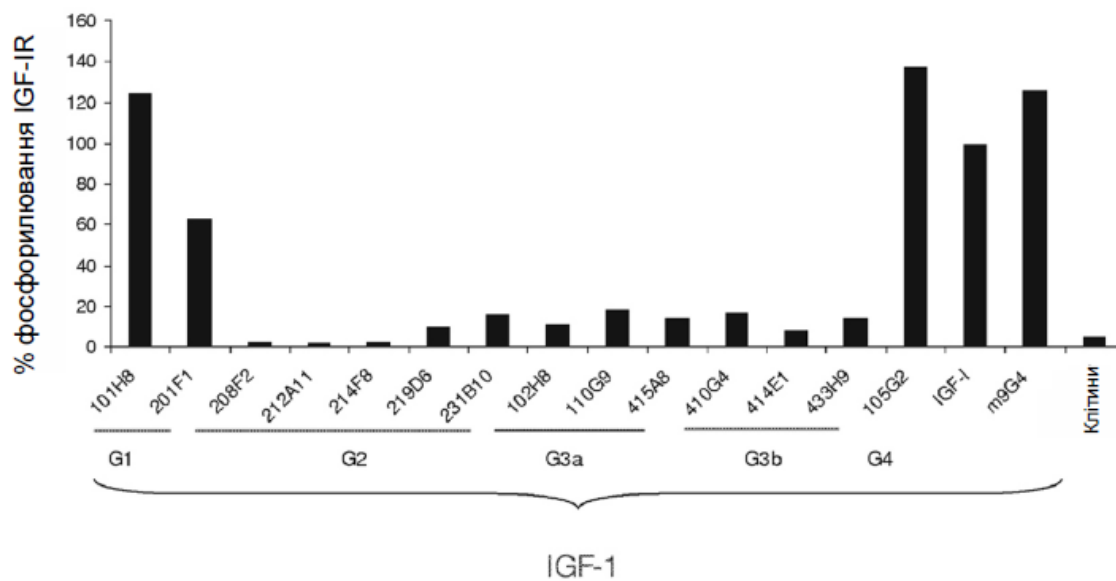
ФІГ. 7С



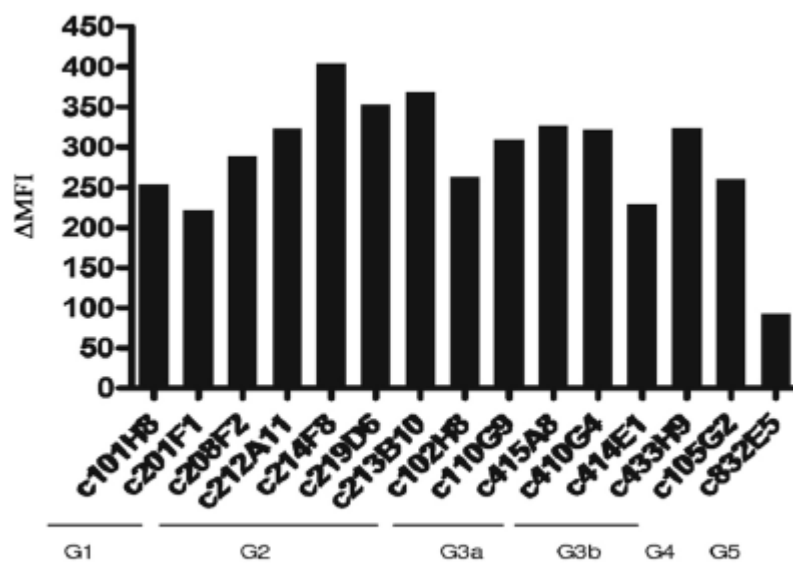
ФІГ. 8



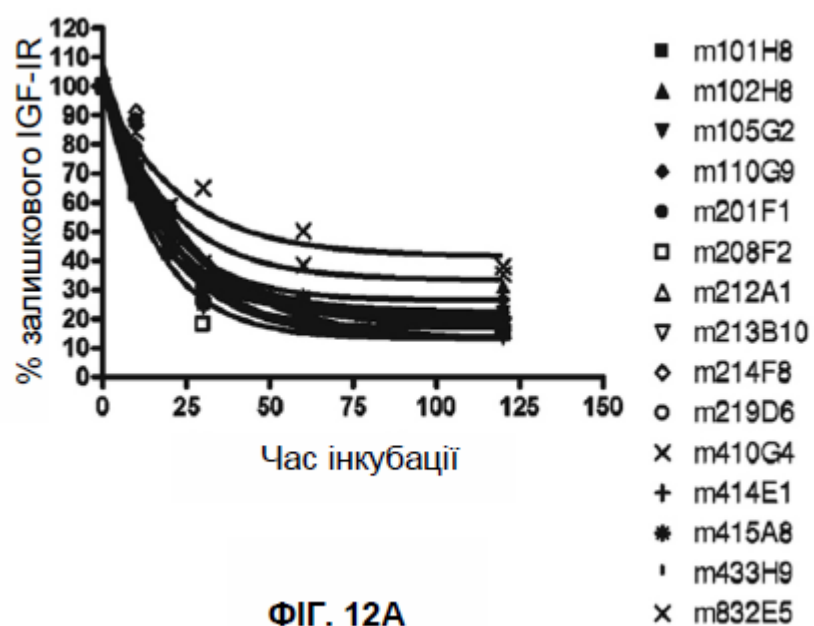
ФІГ. 9



ФІГ. 10



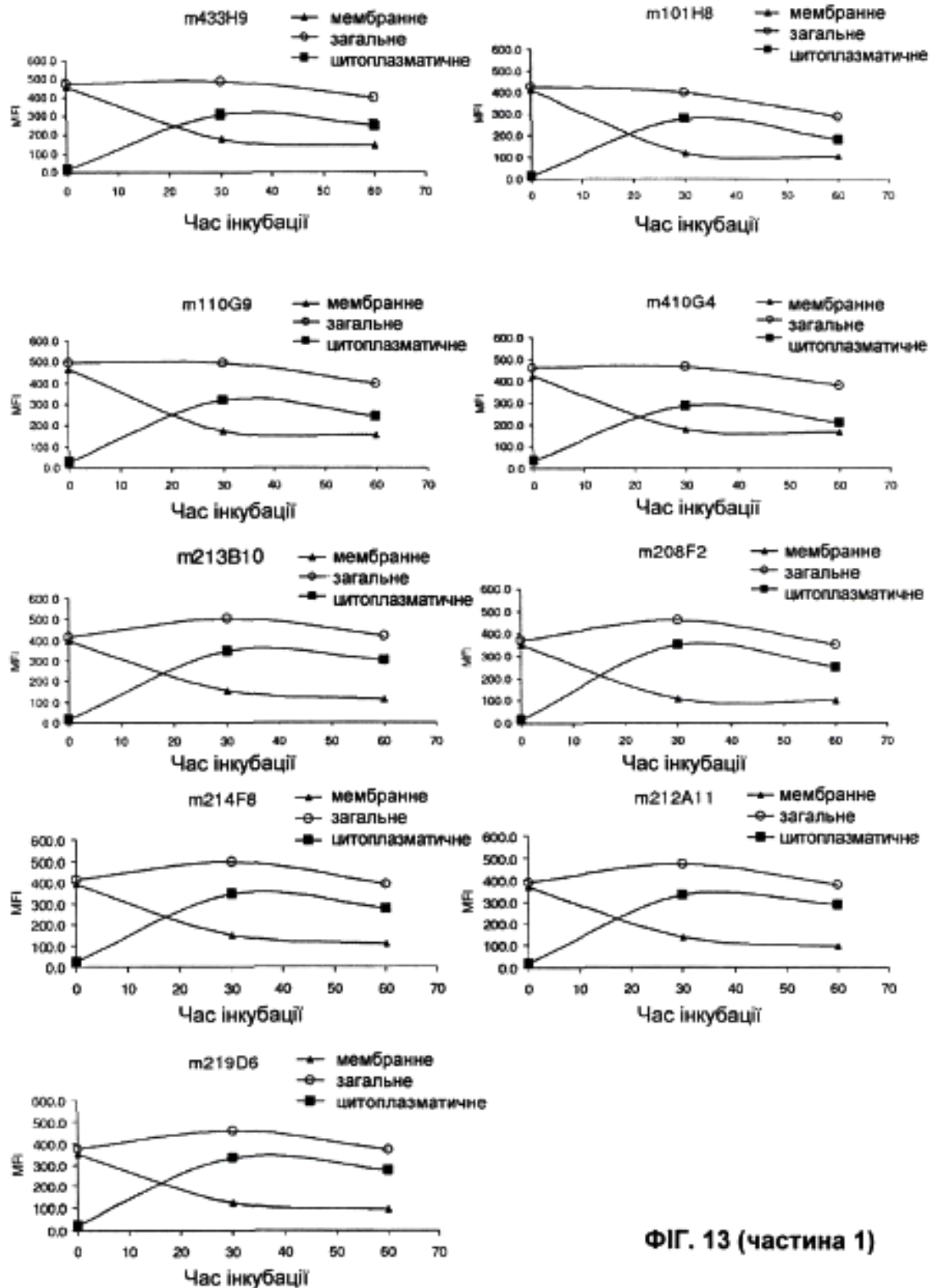
ФІГ. 11



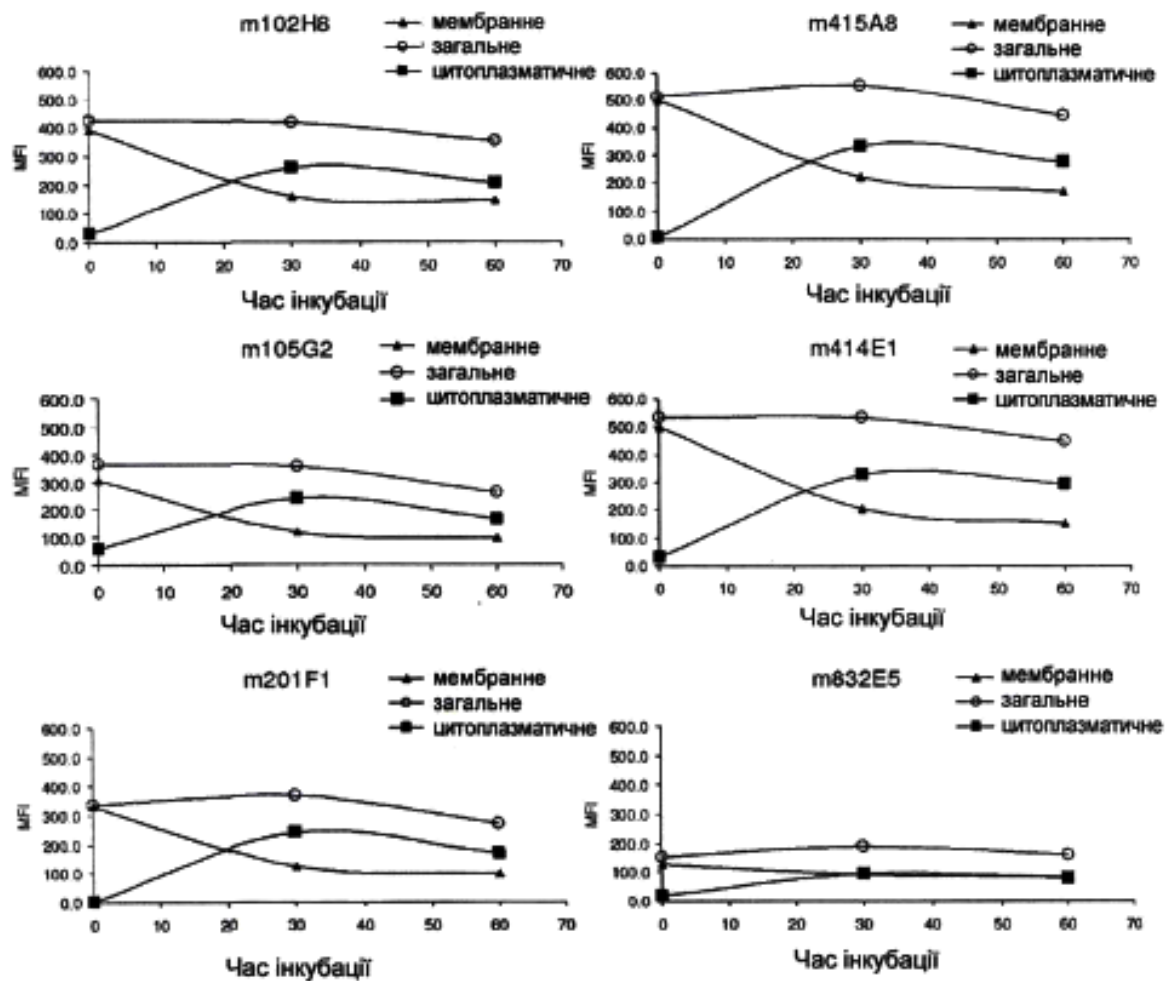
	Антитіла	Період напівжиття
G1	m101H8	11.89
G1	m201F1	14.83
G2	m208F2	11.11
G2	m212A11	14.3
G2	m214F8	16.81
G2	m219D6	17.85
G2	m213B10	12.83
G3a	m102H8	12.16
G3a	m110G9	13.56
G3a	m415A8	12.92
G3b	m410G4	13.57
G3b	m414E1	13.01
G3b	m433H9	14.88
G4	m105G2	10.75
G5	m832E5	15.87

ФІГ. 12В

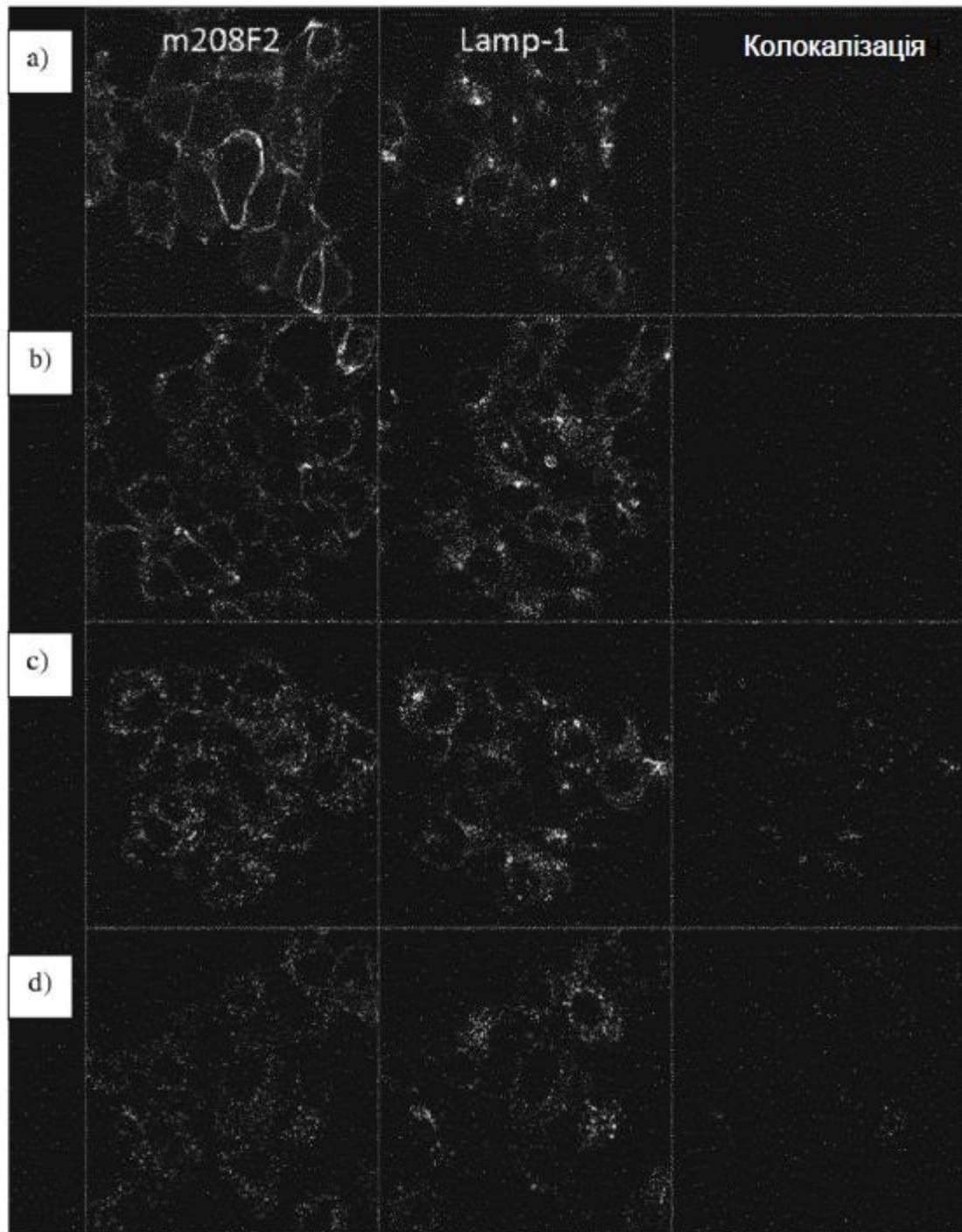




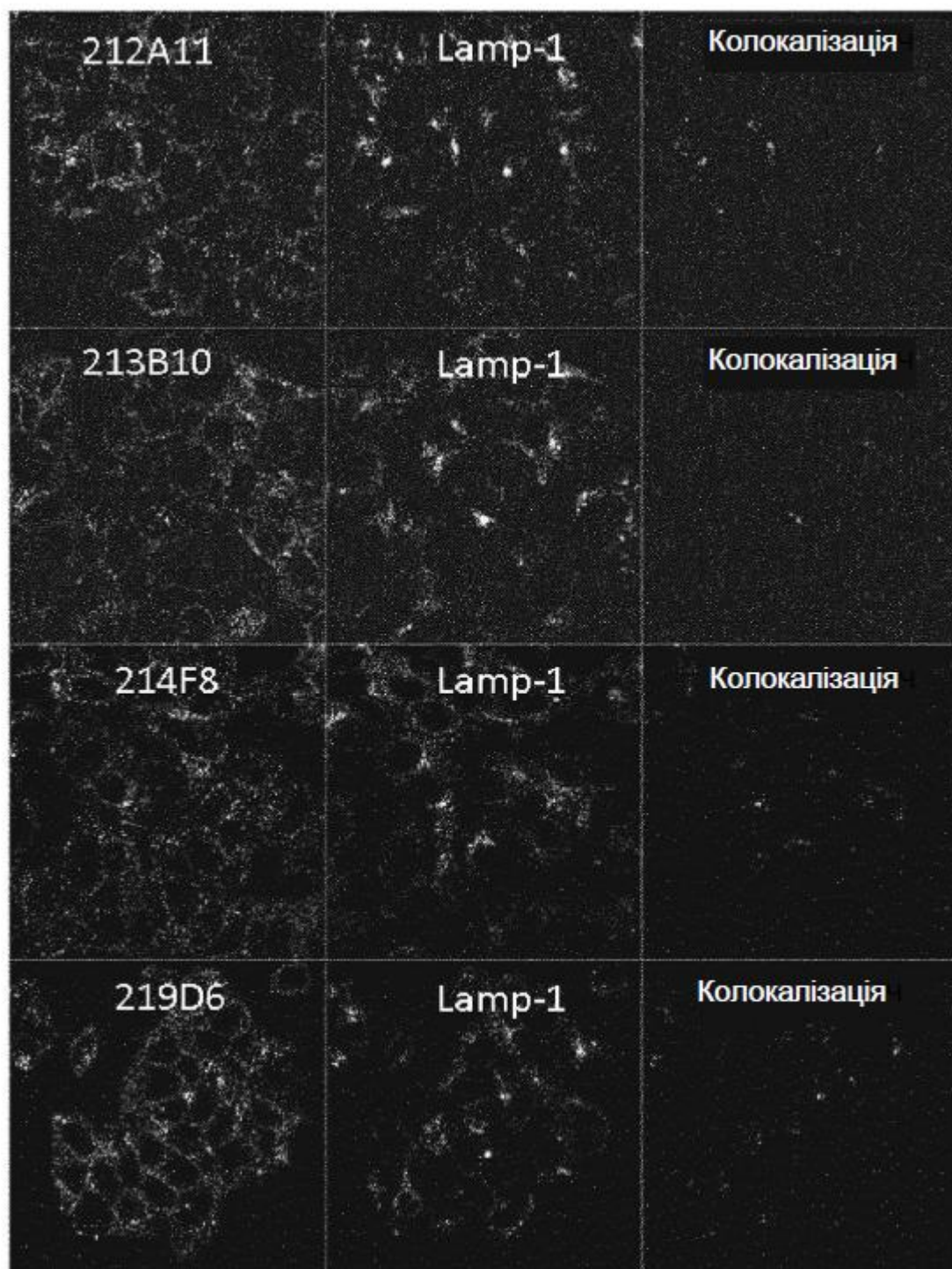
ФІГ. 13 (частина 1)



ФІГ. 13 (частина 2)

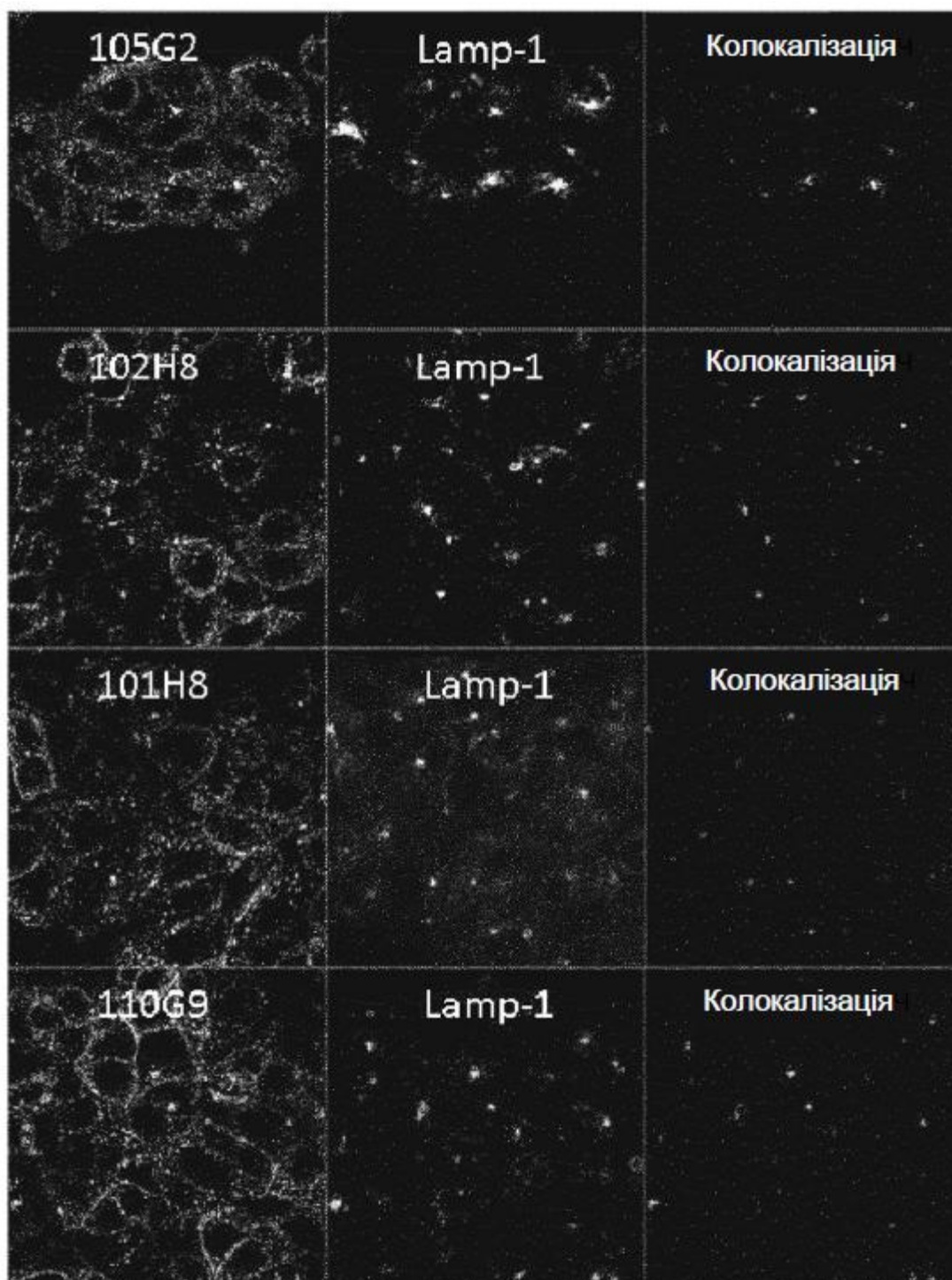


ФІГ. 14А

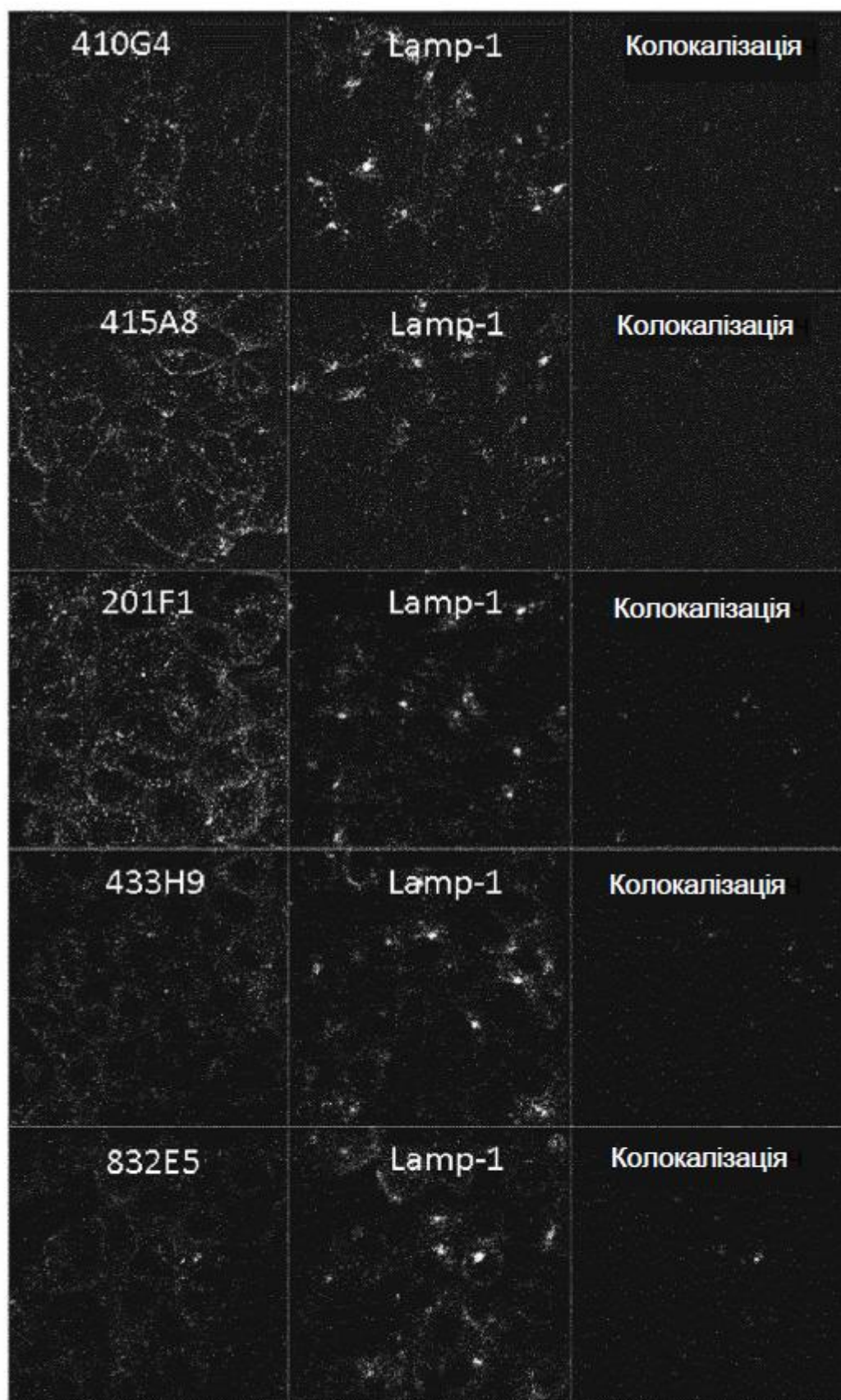


**ФІГ. 14В (частина 1)**

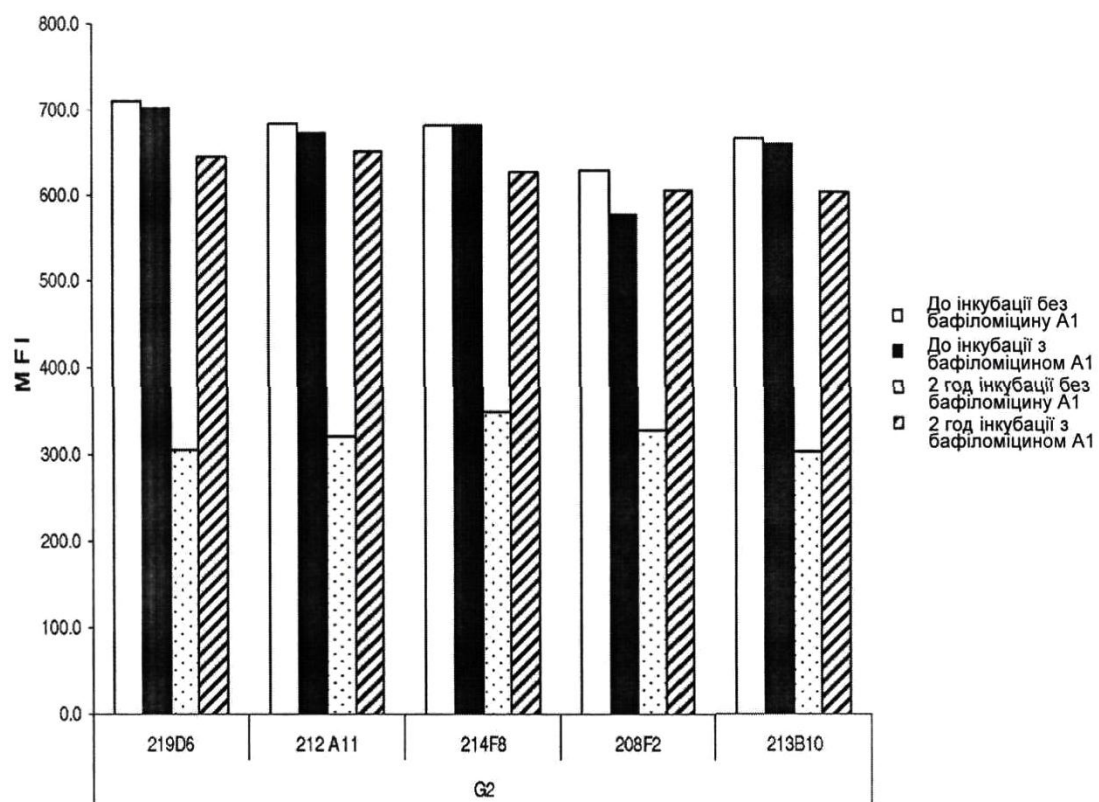




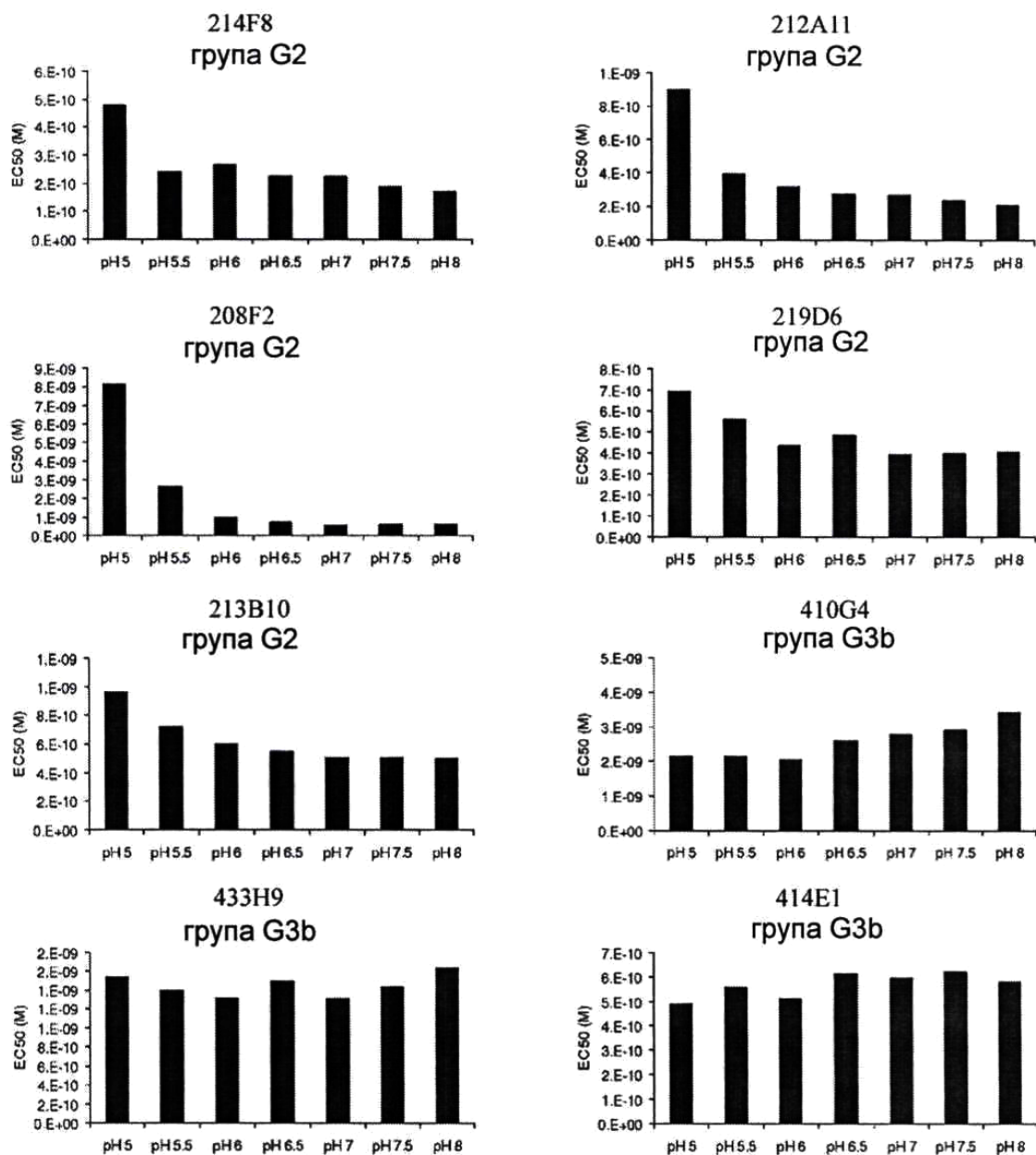
ФІГ. 14В (частина 2)



ФІГ. 14В (частина 3)

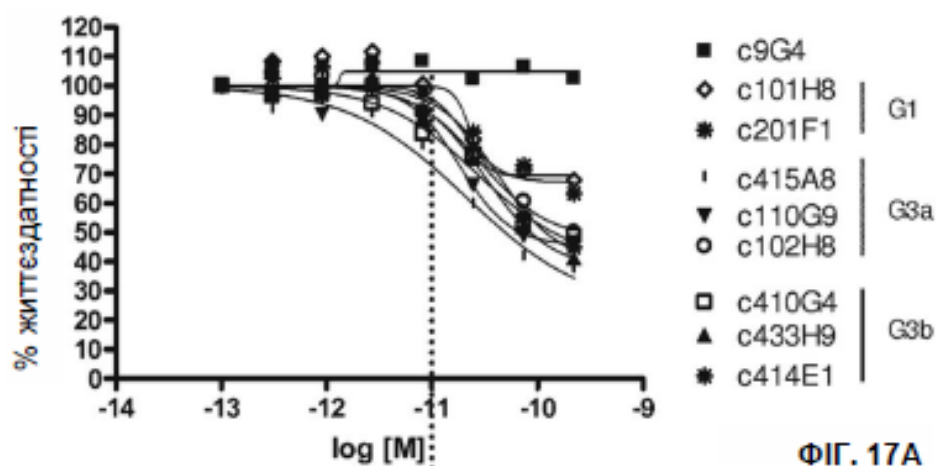


ФІГ. 15

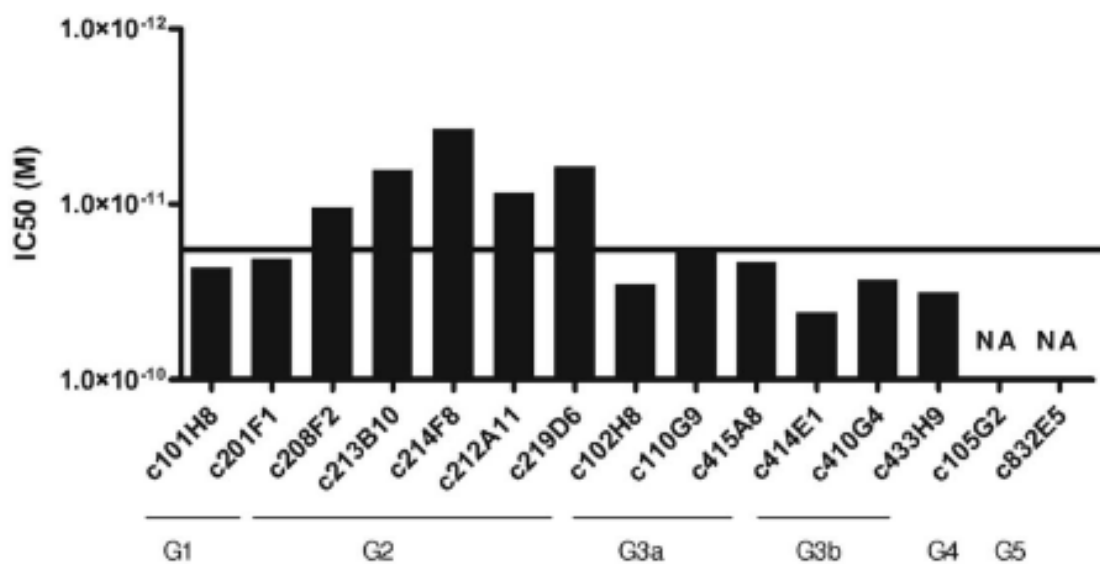
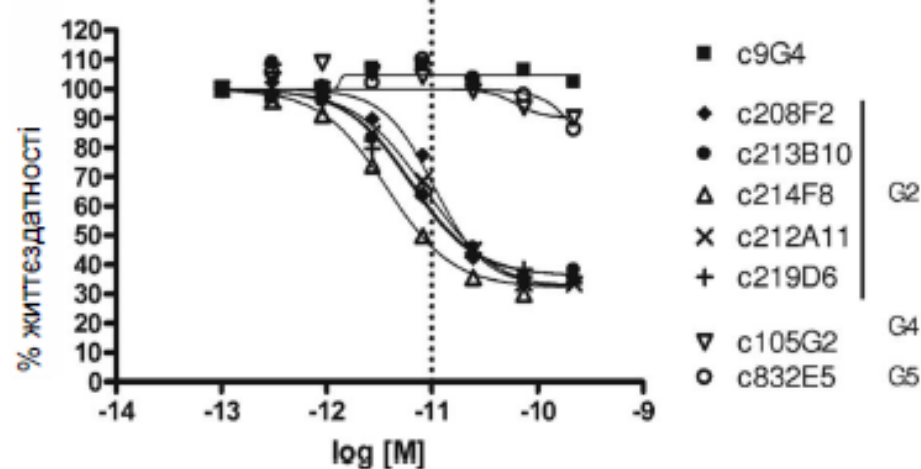


ФІГ. 16 (частина 2)





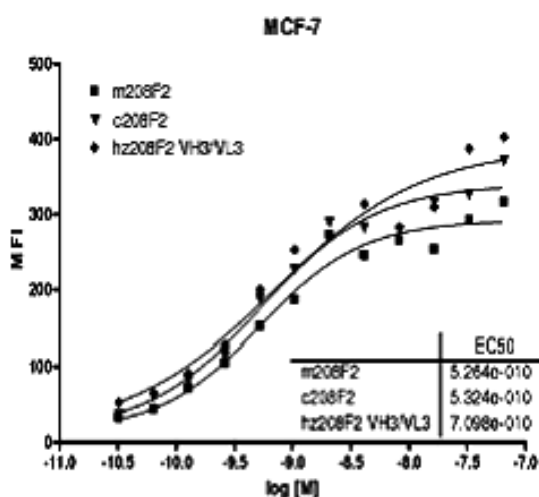
ФІГ. 17А



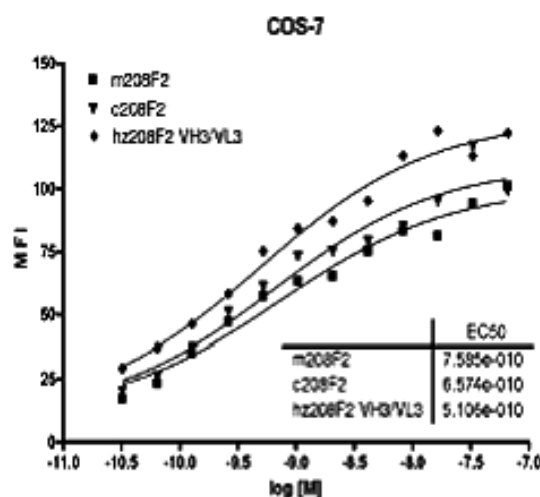
ФІГ. 17В



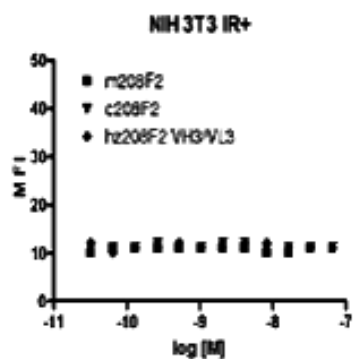
ФІГ. 18



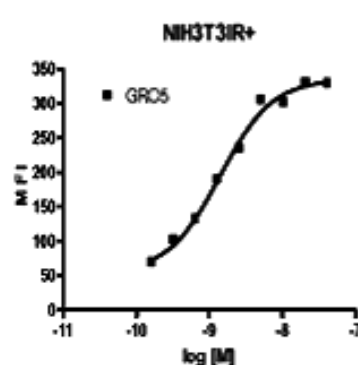
ФІГ. 19A



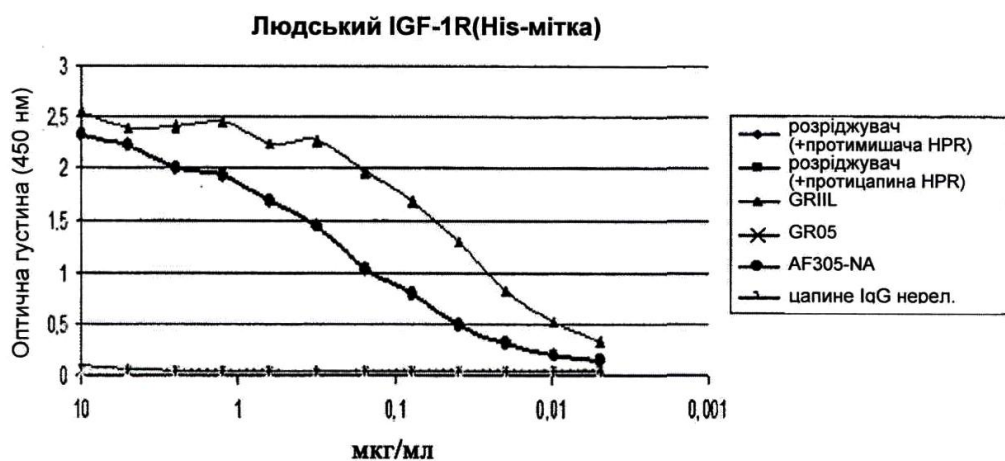
ФІГ. 19B



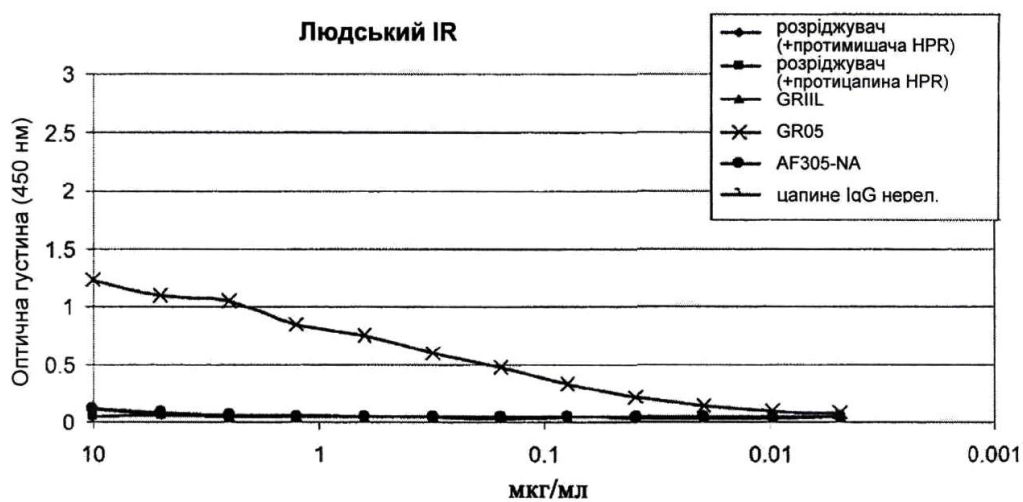
ФІГ. 19C



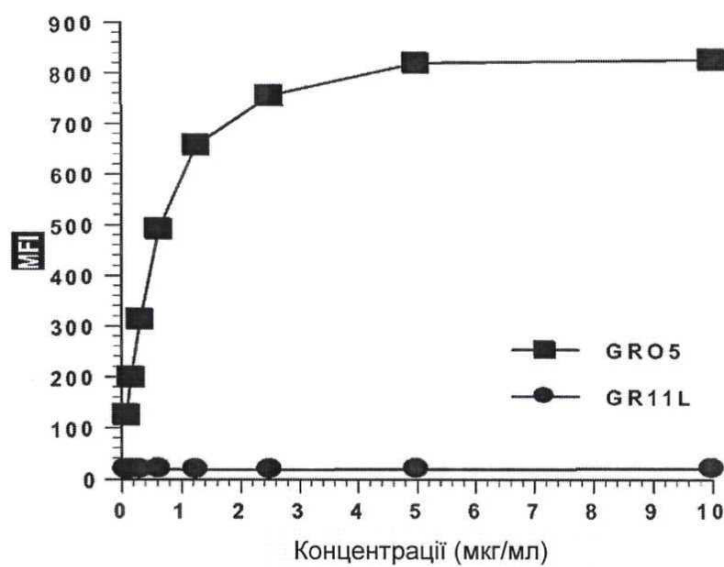
ФІГ. 19D



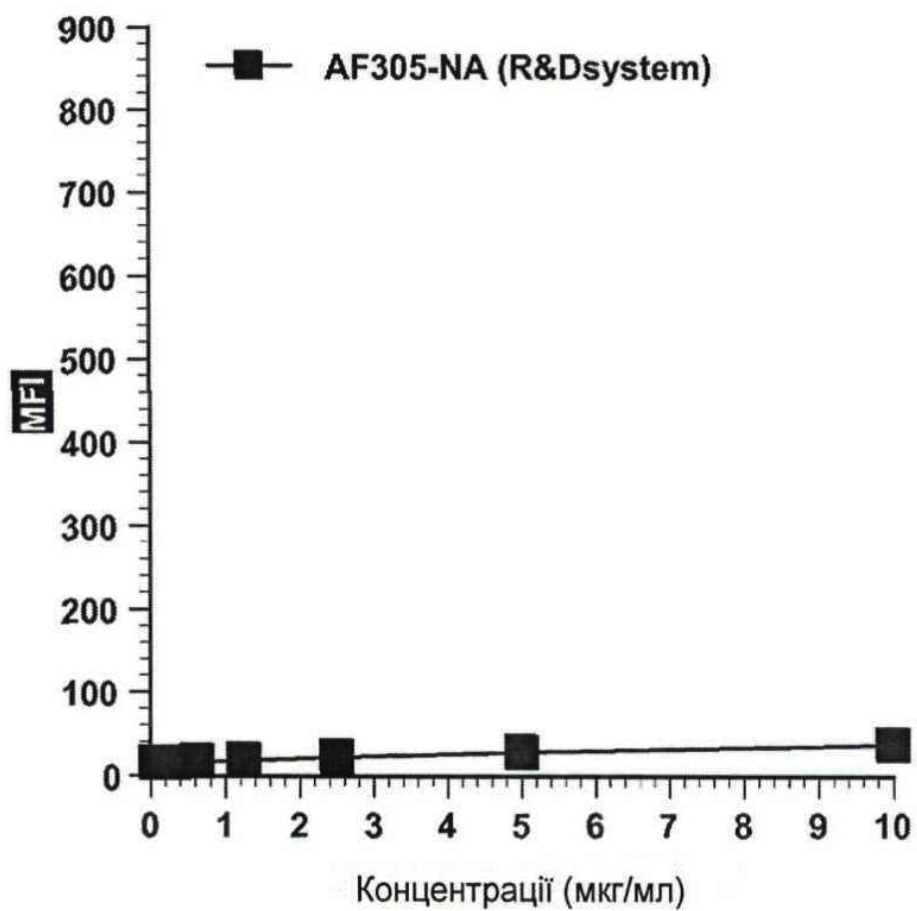
ФІГ. 20А



ФІГ. 20В

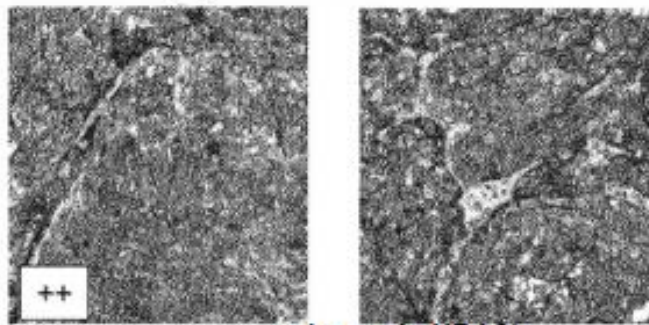


ФІГ. 20С

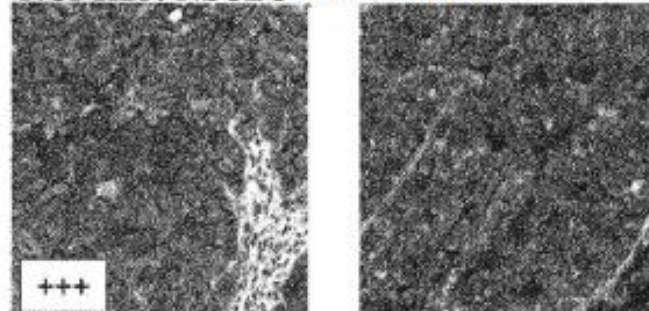


ФІГ. 20D

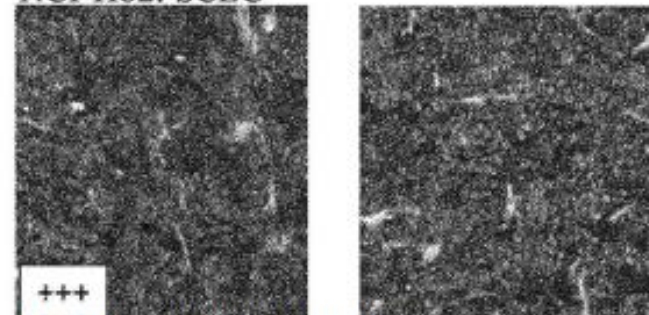
MCF-7: карцинома молочної залози



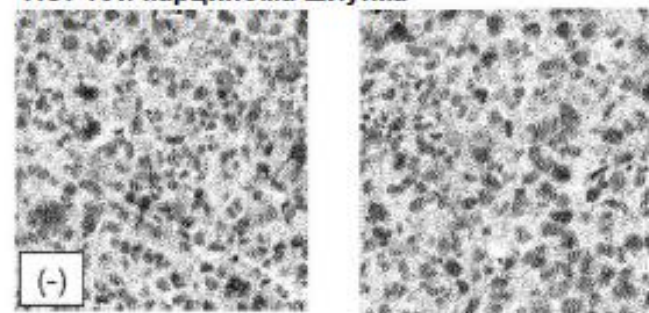
NCI-H23: NSCLC (мутація KRAS)



NCI-H82: SCLC

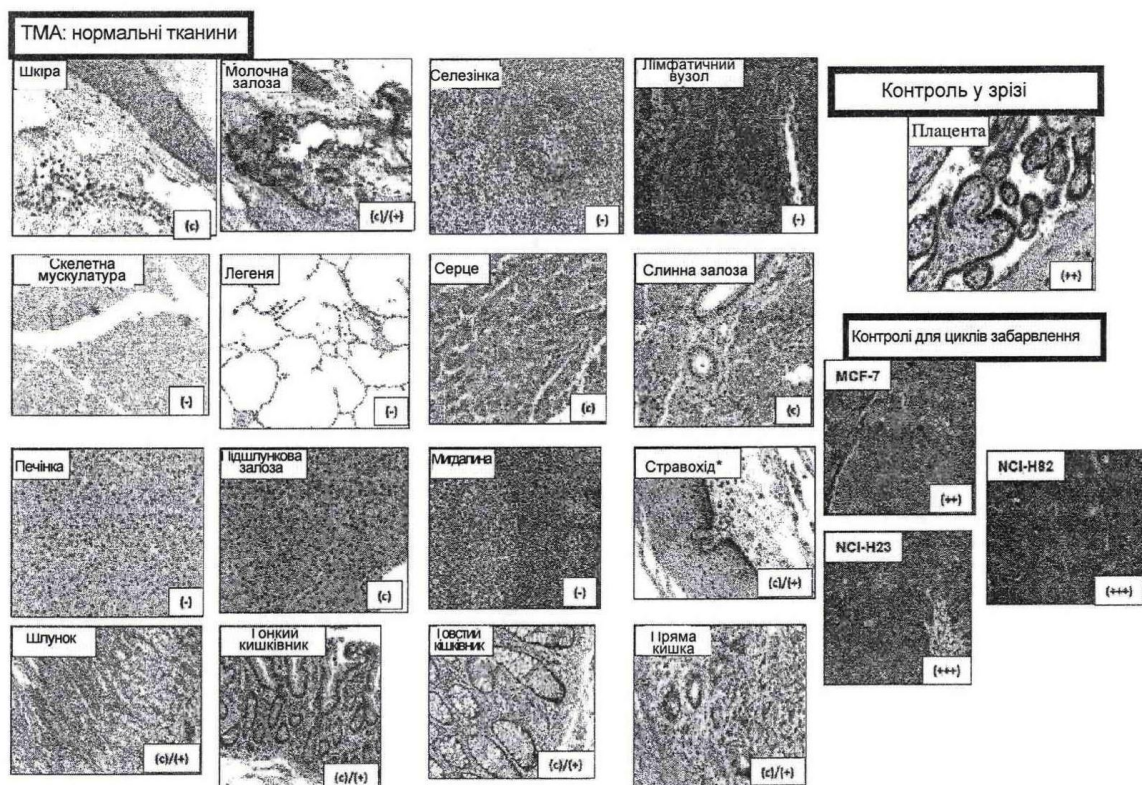


Hs746t: карцинома шлунка

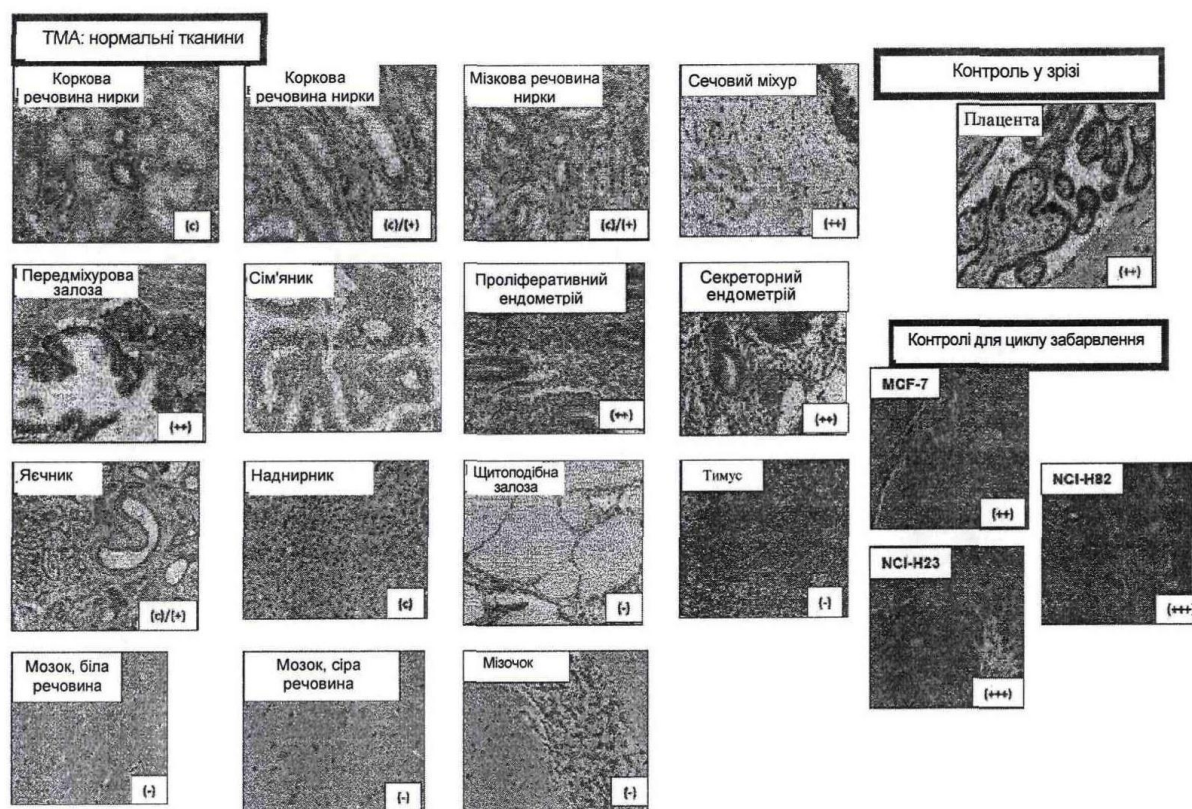


ФІГ. 21



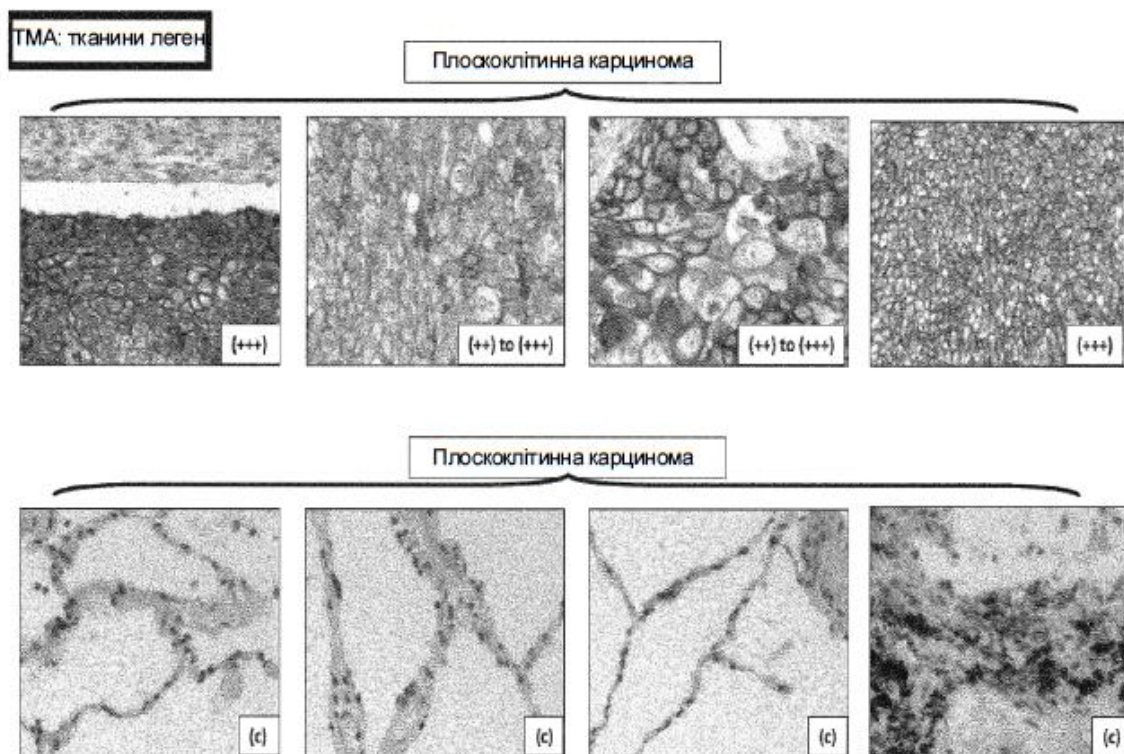


ФІГ. 22А

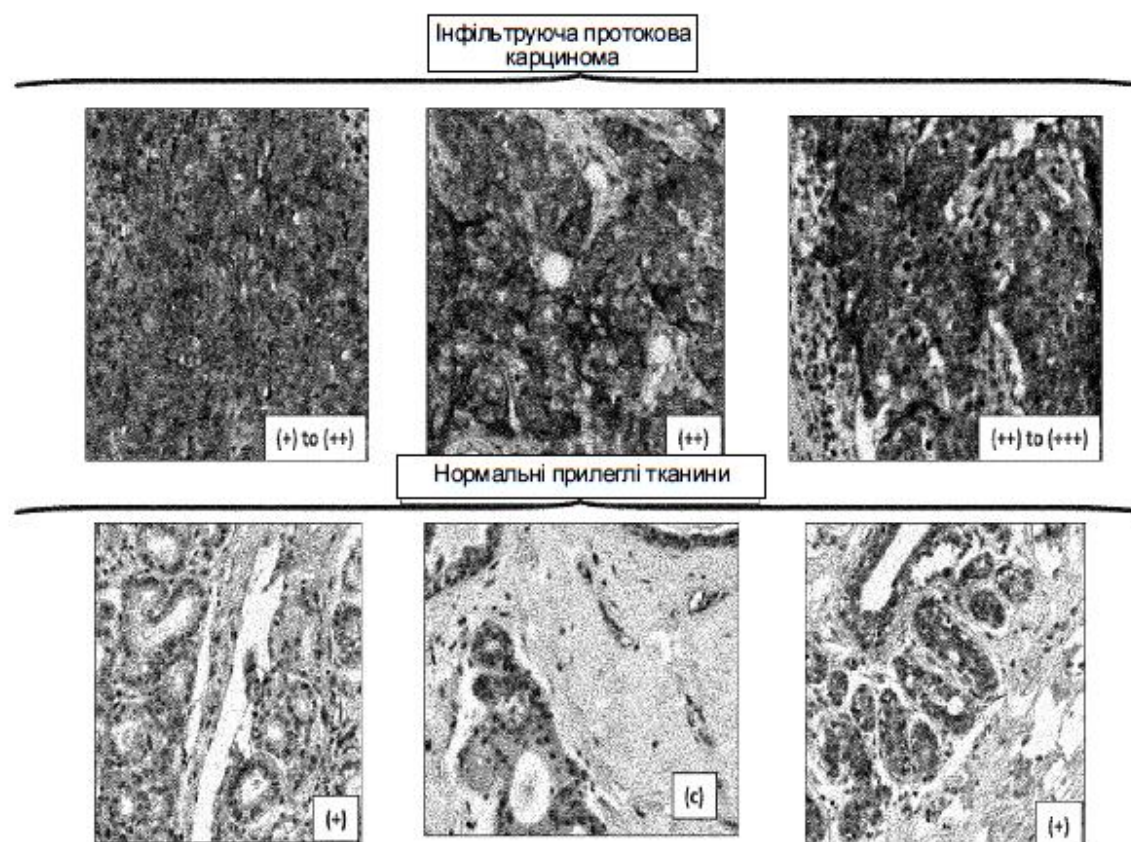


ФІГ. 22В

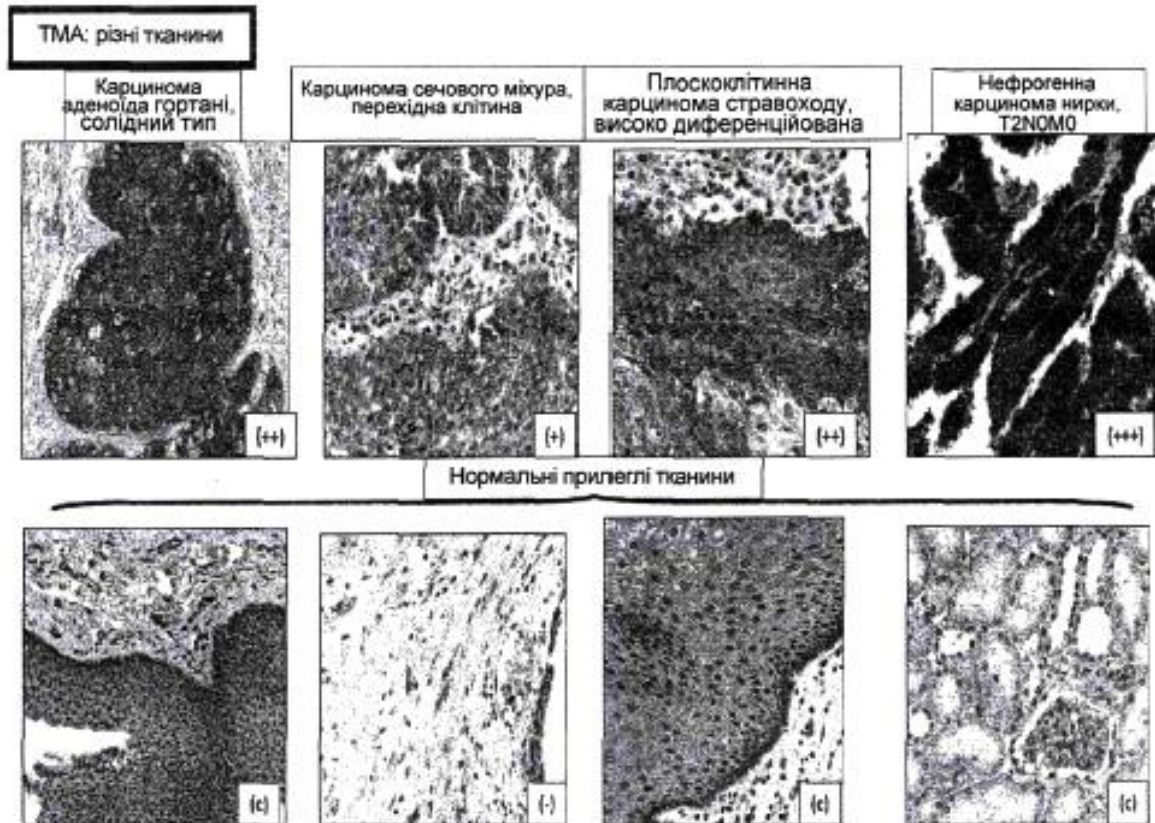




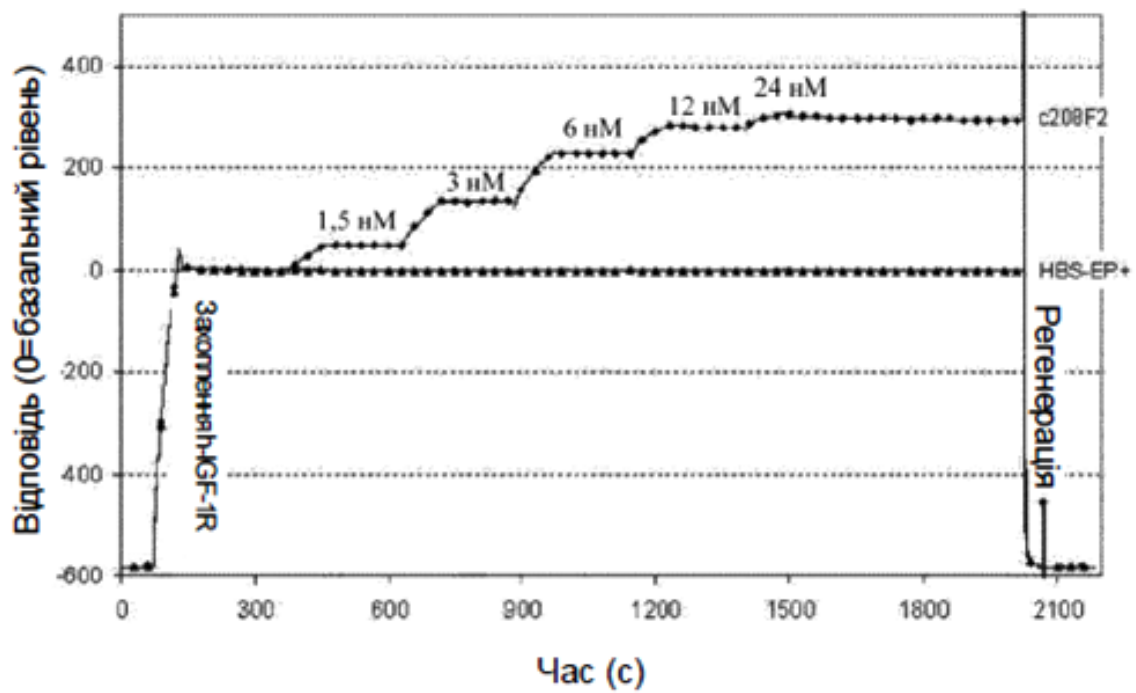
ФІГ. 23



ФІГ. 24

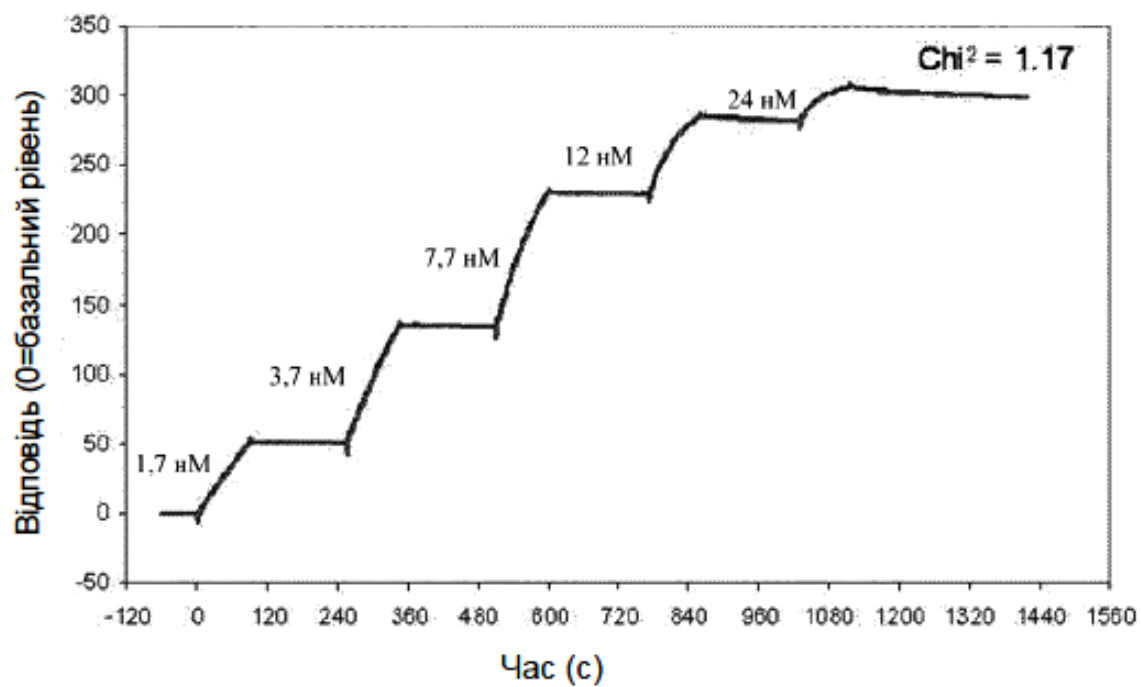


ФІГ. 25

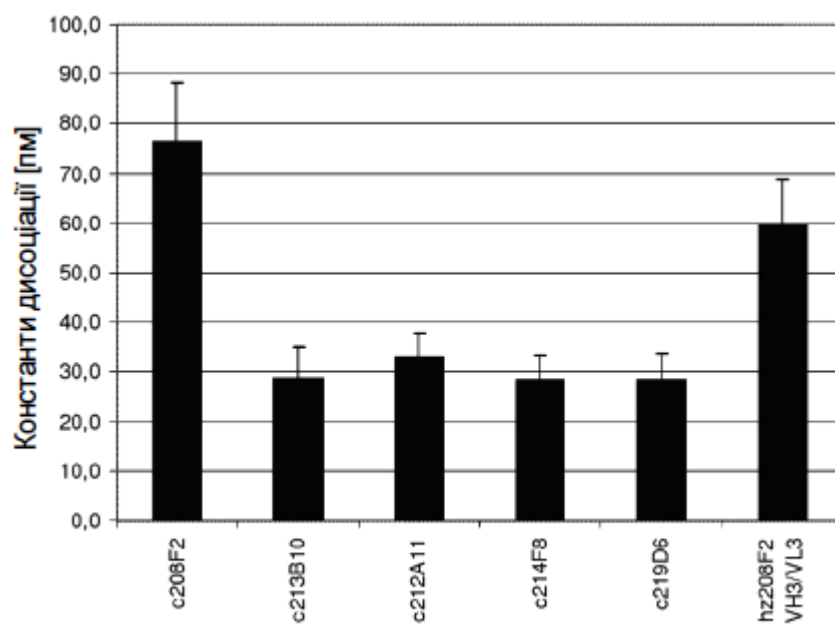


ФІГ. 26

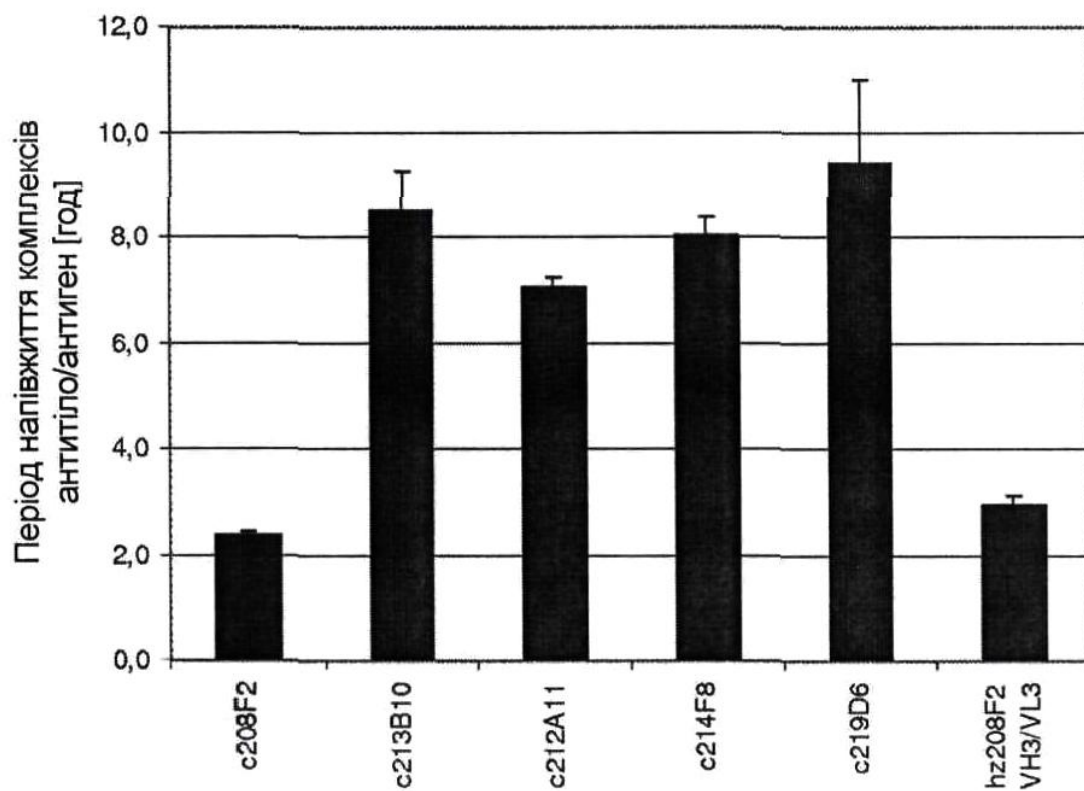




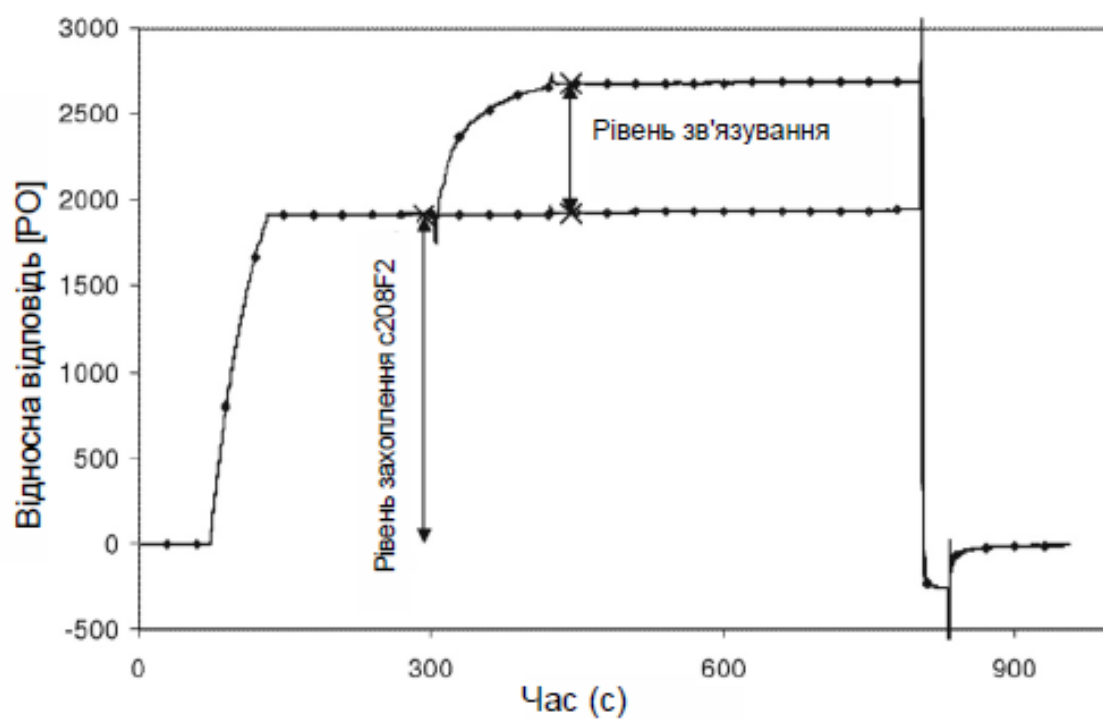
ФІГ. 27



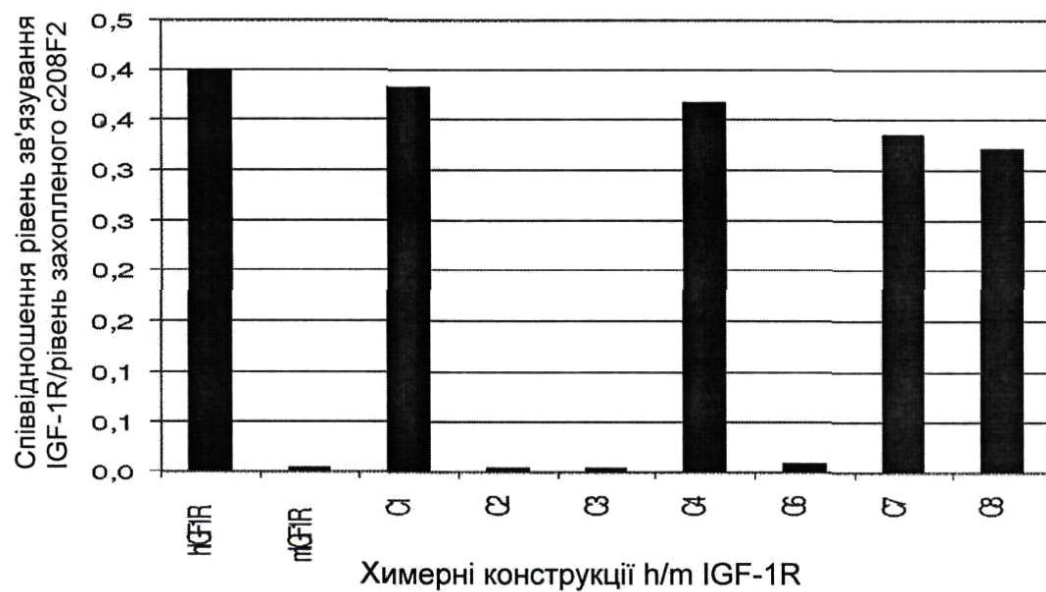
ФІГ. 28



ФІГ. 29

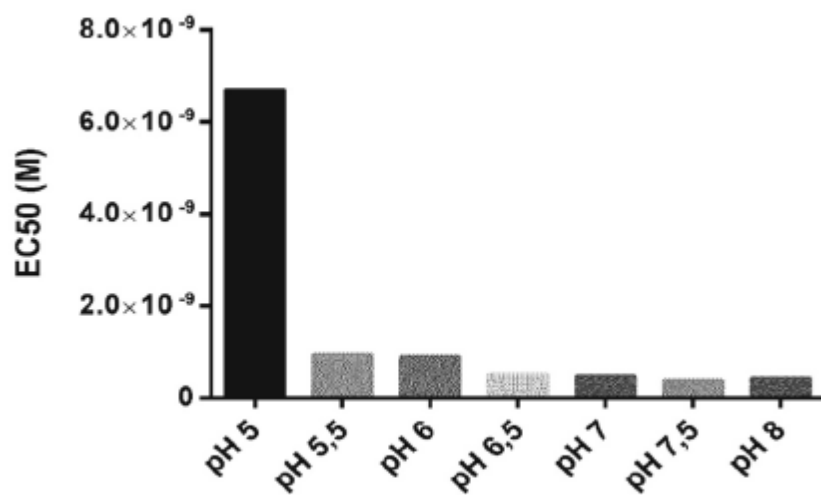


ФІГ. 30

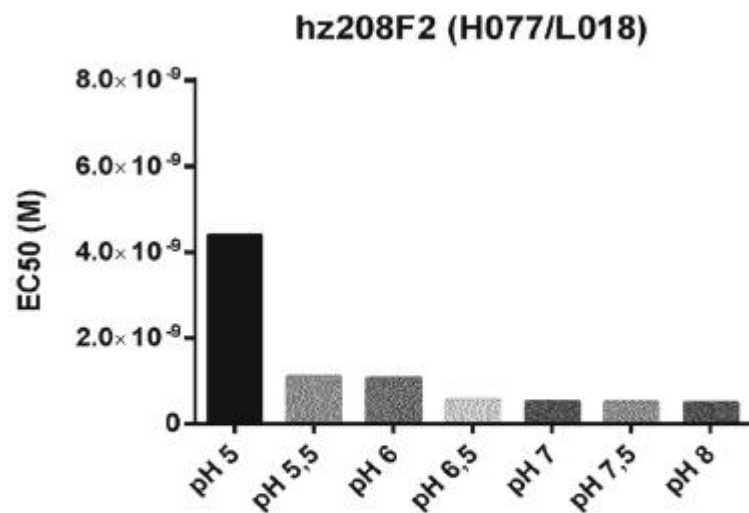


ФІГ. 31

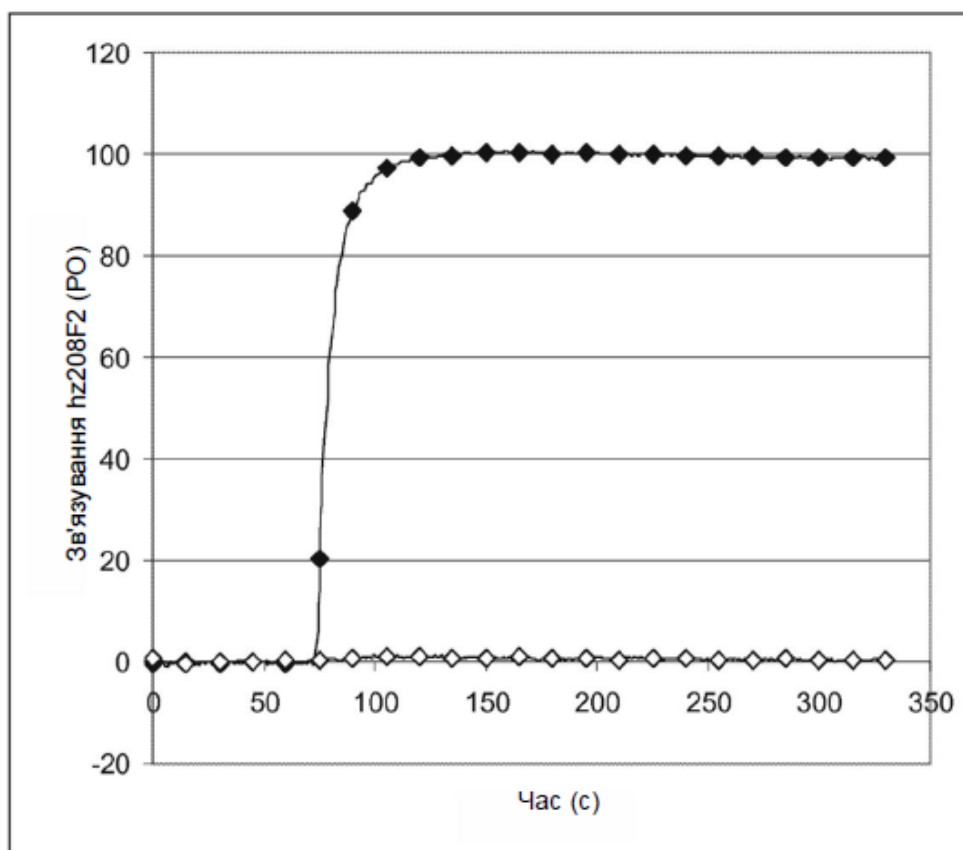
**hz208F2 (H076/L024)**



ФІГ. 32А



ФІГ. 32В



ФІГ. 33