



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122142** (13) **C2**  
(51) МПК (2020.01)

**C07K 16/18** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)  
A61P 9/00  
A61P 25/24 (2006.01)  
A61P 25/28 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2017 08667**  
(22) Дата подання заявки: **28.01.2016**  
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **26.09.2020**  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **62/109,002, 62/266,556**  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **28.01.2015, 11.12.2015**  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **26.12.2017, Бюл.№ 24**  
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **25.09.2020, Бюл.№ 18**  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/ІВ2016/050415, 28.01.2016**

(72) Винахідник(и):  
**Лю Юе (US),**  
**Ніджджар Тарлохан С. (US),**  
**Чакрабартті Авіджіт (CA),**  
**Хіракі Джеффри Н. (US)**  
(73) Володілець (володільці):  
**ПРОТЕНА БІОСАЙЕНСІС ЛІМІТЕД,**  
Adelphi Plaza, Upper George's Street, Dun  
Laoghaire Co. Dublin A96 T927, Ireland (IE),  
**ЮНІВЕРСІТІ ХЕЛС НЕТУОРК,**  
190 Elizabeth Street, R. Fraser Elliott Building,  
Room 1S-417, Toronto, Ontario M5G 2C4,  
Canada (CA)  
(74) Представник:  
**Кислиця Тетяна Олегівна, реєстр. №425**  
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
US 2014056904 A1, 27.02.2014  
WO 2014124334 A2, 14.08.2014  
WO2015010118 A2, 22.01.2015  
MONICHAN PHAY et al. Transthyretin aggregate-specific antibodies recognize cryptic epitopes on patient-derived amyloid fibrils. Rejuvenation research, US, 2014, Vol. 17, no. 2, P. 97 – 104  
GOLDSTEINS G et al. Exposure of cryptic epitopes on transthyretin only in amyloid and in amyloidogenic mutants. Proceedings of the national academy of sciences, National academy of sciences, US, 1999, Vol. 96, no. 6, P. 3108 – 3113  
OLIVIER LÉGER et al. Antibody drug discovery Chapter 1: Humanization of antibodies. Molecular Medicine and Medicinal Chemistry, 2011, P. 1 – 23  
ALMAGRO JUAN C et al. Humanization of antibodies. Frontiers in bioscience, Frontiers in bioscience, Albertson, NY, US, 2008, Vol. 13, P. 1619 – 1633

UA 122142 C2

**(54) АНТИТІЛО ДО ТРАНСТИРЕТИНУ**

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіла, яке специфічно зв'язує транстиретин (TTR). Антитіло може бути використаним для лікування, або здійснення профілактики захворювань або розладів, пов'язаних з накопиченням TTR або накопиченням відкладень TTR (наприклад, TTR-амілоїдозу). Антитіло також може бути використане для діагностики TTR-амілоїдозу та інгібування, або зменшення агрегації TTR, серед інших застосувань.

ПЕРЕХРЕСНІ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

[0001] Ця заявка відноситься до попередньої заявки США № 62/109002, поданої 28 січня 2015 року, і попередньої заявки США № 62/266556, поданої 11 грудня 2015 року, кожна з яких включена в повному обсязі за допомогою посилання.

ПОСИЛАННЯ НА ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

[0002] Ця заявка включає електронний варіант списку послідовностей в файлі з ім'ям 473373\_SEQLIST.TXT, створеному 28 січня 2016 року, що містить 135083 байт, і який повністю включений в повному обсязі за допомогою посилання для всіх цілей.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

[0003] Вважається, що деякі захворювання викликані аномальним згортанням і агрегацією специфічних для хвороби білків. Ці білки можуть збиратися в патологічні діагностичні накопичення, відомі як амілоїди, які візуалізують деякими гістологічними барвниками. Вважається, що амілоїди викликають запальні реакції і є причиною безлічі негативних наслідків для залучених тканин. Крім того, можуть існувати і виявляти цитотоксичну дію менші агрегати аномально згорнутого білка.

[0004] Транстиретин (TTR) є одним з багатьох білків, які, як відомо, можуть неправильно згорнутися і агрегувати (наприклад, зазнають амілоїдогенезу). Пов'язаний з транстиретином амілоїдоз включає дві форми захворювання: сімейне захворювання, що виникає через неправильне згортання мутованого TTR або варіанта TTR, а також спорадичне, негенетичне захворювання, викликане неправильним агрегуванням TTR дикого типу. Процес TTR-амілоїдогенезу може викликати патологію в нервовій системі і/або серці, а також в інших тканинах.

СУТЬ ВИНАХОДУ

[0005] Винахід відноситься до антитіл, які зв'язуються з транстиретином і містять три CDR важкого ланцюга і три CDR легкого ланцюга в основному з антитіла 14G8. Деякі антитіла містять три CDR важкого ланцюга по Кабату і три CDR легкого ланцюга по Кабату антитіла 14G8, за винятком того, що кожна з позицій H52 і L26 може бути N або S. Деякі антитіла містять три CDR важкого ланцюга по Кабату і три CDR легкого ланцюга по Кабату антитіла 14G8. Необов'язково, CDR-H1 є суміщеним CDR по Кабату-Чотіа (Kabat-Chothia) антитіла 14G8. Деякі антитіла містять три CDR важкого ланцюга по Кабату антитіла 9D5. Необов'язково, CDR-H1 є суміщеним CDR по Кабату-Чотіа антитіла 9D5.

[0006] Деякі антитіла зв'язуються з тим самим епітопом на транстиретині що і 9D5 або 14G8, і містять три CDR легкого ланцюга і три CDR важкого ланцюга, причому: а) кожна CDR має щонайменше 90% ідентичності послідовності з відповідною CDR з варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів 9D5; або б) кожна CDR має щонайменше 90% ідентичності послідовності з відповідною CDR з варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів 14G8, за винятком того, що в позиції L26 може бути N або S. Деякі антитіла містять: а) три CDR важкого ланцюга і три CDR легкого ланцюга 9D5; або б) три CDR важкого ланцюга і три CDR легкого ланцюга антитіла 14G8, за винятком того, що в позиції L26 може бути N або S. У деяких антитілах три CDR важкого ланцюга і три CDR легкого ланцюга 9D5 представляють собою SEQ ID NO: 13-15 і 24-26 відповідно. У деяких антитілах, три CDR важкого ланцюга і три CDR легкого ланцюга антитіла 14G8 представляють собою SEQ ID NO: 67-69 і 77-79 відповідно, за винятком того, що в позиції L26 може бути N або S.

[0007] Будь-яке з вищевказаних антитіл може бути моноклональним антитілом. Будь-яке з вищевказаних антитіл може бути химерним, гуманізованим, венированим або людським антитілом. Будь-яке з вищевказаних антитіл може мати ізотип IgG1 людини, ізотип IgG2 людини або ізотип IgG4 людини.

[0008] Винахід додатково відноситься до гуманізованих або химерних антитіл антитіла миші, які специфічно зв'язуються з транстиретином, причому антитіло миші характеризується варіабельною областю зрілого важкого ланцюга SEQ ID NO: 61 і варіабельною областю зрілого легкого ланцюга SEQ ID NO: 70, за винятком того, що в позиції H52 може бути S або N, в позиції H69 може бути F або I, в позиції L26 може бути S або N, а R в позиції L107 є необов'язковим. Необов'язково, антитіла являють собою гуманізоване або химерне антитіло 9D5 або 14G8, яке специфічно зв'язується з транстиретином, причому 9D5 є мишачим антитілом, яке характеризується варіабельною областю зрілого важкого ланцюга SEQ ID NO: 1 і варіабельною областю зрілого легкого ланцюга SEQ ID NO: 16, і 14G8 є мишачим антитілом, яке характеризується варіабельною областю зрілого важкого ланцюга SEQ ID NO: 61 і варіабельною областю зрілого легкого ланцюга SEQ ID NO: 70. Необов'язково, гуманізовані антитіла містять: а) варіабельну область гуманізованого зрілого важкого ланцюга, що містить три CDR важкого ланцюга антитіла 9D5 і варіабельну область гуманізованого зрілого легкого

ланцюга, що містить три CDR легкого ланцюга антитіла 9D5; або б) варіабельну область гуманізованого зрілого важкого ланцюга, що містить три CDR важкого ланцюга антитіла 14G8 і варіабельну область гуманізованого зрілого легкого ланцюга, що містить три CDR легкого ланцюга антитіла 14G8, за винятком того, що в позиції L26 може бути N або S. Необов'язково, три CDR важкого ланцюга і три CDR легкого ланцюга антитіла 9D5 представляють собою SEQ ID NO: 13-15 і 24-26 відповідно. Необов'язково, три CDR важкого ланцюга і три CDR легкого ланцюга антитіла 14G8 представляють собою SEQ ID NO: 67-69 і 77-79 відповідно, за винятком того, що в позиції L26 може бути N або S. Необов'язково, будь-які відмінності в CDR варіабельної області зрілого важкого ланцюга і варіабельної області зрілого легкого ланцюга з SEQ ID NO: 1 і 16, відповідно, знаходяться в позиціях H60-H65. Необов'язково, будь-які відмінності в CDR варіабельної області зрілого важкого ланцюга і варіабельної області зрілого легкого ланцюга з SEQ ID NO: 61 і 70, відповідно, знаходяться в позиціях H60-H65, за винятком того, що в позиції L26 може бути N або S.

[0009] Необов'язково, гуманізоване антитіло містить варіабельну область гуманізованого зрілого важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше, на 90% ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 5-12, і варіабельну область гуманізованого зрілого легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше, на 90% ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 19-23, за винятком того, що в позиції H19 може бути R або K, в позиції H40 може бути A або T, в позиції H44 може бути G або R, в позиції H49 може бути S або A, в позиції H77 може бути S або T, в позиції H82a може бути N або S, в позиції H83 може бути R або K, в позиції H84 може бути A або S, а в позиції H89 може бути V або M. Необов'язково, щонайменше, одна з таких позицій зайнята амінокислотою як зазначено далі: позиція H42 зайнята E, позиція H47 зайнята L, позиція H69 зайнята F, позиція H82 зайнята S, позиція H82b зайнята L, позиція H108 зайнята L, позиція L8 зайнята A, позиція L9 зайнята P, позиція L18 зайнята S, позиція L19 зайнята V, позиція L36 зайнята F, позиція L39 зайнята R, позиція L60 зайнята S, позиція L70 зайнята A, а позиція L74 зайнята R. Необов'язково, позиції H47, H69 і H82 зайняті L, F, і S відповідно. Необов'язково, позиції H47, H69, H82 і H82b зайняті L, F, S і L відповідно. Необов'язково, позиції H42, H47 і H108 зайняті E, L і L відповідно. Необов'язково, позиції H69, H82 і H82b зайняті F, S і L відповідно. Необов'язково, позиції H47 і H108 зайняті L. Необов'язково, позиції H82 і H82b зайняті S і L відповідно. Необов'язково, позиції H42, H47 і H82b зайняті E, L і L відповідно. Необов'язково, позиція L36 зайнята F. Необов'язково, позиція L60 зайнята S. Необов'язково, позиції L8, L9, L19, L36, L39, L60, L70 і L74 зайняті A, P, V, F, R, S, A і R відповідно. Необов'язково, позиції L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70 і L74 зайняті A, P, S, V, F, R, S, A і R відповідно.

[0010] Необов'язково, гуманізоване антитіло містить варіабельну область зрілого важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше, на 95% ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 5-12, і варіабельну область зрілого легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше, на 95% ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 19-23, за винятком того, що в позиції H19 може бути R або K, в позиції H40 може бути A або T, в позиції H44 може бути G або R, в позиції H49 може бути S або A, в позиції H77 може бути S або T, в позиції H82a може бути N або S, в позиції H83 може бути R або K, в позиції H84 може бути A або S, а в позиції H89 може бути V або M. Необов'язково, гуманізоване антитіло містить варіабельну область зрілого важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше, на 98% ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 5-12, і варіабельну область зрілого легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше, на 98% ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 19-23, за винятком того, що в позиції H19 може бути R або K, в позиції H40 може бути A або T, в позиції H44 може бути G або R, в позиції H49 може бути S або A, в позиції H77 може бути S або T, в позиції H82a може бути N або S, в позиції H83 може бути R або K, в позиції H84 може бути A або S, і в позиції H89 може бути V або M. Необов'язково, варіабельна область зрілого важкого ланцюга має амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 5-12, і варіабельна область зрілого легкого ланцюга має амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 19-23. В деяких антитілах варіабельна область зрілого важкого ланцюга має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, а варіабельна область зрілого легкого ланцюга має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19.

[0011] Необов'язково, гуманізоване антитіло містить варіабельну область гуманізованого зрілого важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше, на 90% ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 64-66, і варіабельну область гуманізованого зрілого легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше, на 90% ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 74-76, за винятком того, що в позиції H82a може бути N або S, в позиції H83 може бути R або K, в позиції H84 може бути A або S, в позиції H89 може бути V або M, і в позиції L18 може бути S або P. Необов'язково, щонайменше, одна з таких позицій зайнята амінокислотою як зазначено далі:

позиція H1 зайнята E, позиція H47 зайнята L, а позиція L36 зайнята F. Необов'язково, позиції H1 і H47 зайняті E і L відповідно. Необов'язково, позиція L36 зайнята F. Необов'язково, щонайменше, одна з таких позицій зайнята амінокислотою як зазначено далі: позиція H3 зайнята K, позиція H105 зайнята T, позиція L8 зайнята A, позиція L9 зайнята P, позиція L19 зайнята V, позиція L26 зайнята S, позиція L60 зайнята S, а позиція L70 зайнята A. Необов'язково, позиції H3 і H105 зайняті K і T відповідно. Необов'язково, позиції L8, L9, L19 і L70 зайняті A, P, V і A відповідно. Необов'язково, кожна з позицій L26 і L60 зайнята S.

[0012] Необов'язково, гуманізоване антитіло містить варіабельну область зрілого важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше, на 95% ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 64-66, і варіабельну область зрілого легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше, на 95% ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 74-76, за винятком того, що в позиції H82a може бути N або S, в позиції H83 може бути R або K, в позиції H84 може бути A або S, в позиції H89 може бути V або M, а в позиції L18 може бути S або P. Необов'язково, гуманізоване антитіло містить варіабельну область зрілого важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше, на 98% ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 64-66, і варіабельну область зрілого легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше, на 98% ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 74-76, за винятком того, що в позиції H82a може бути N або S, в позиції H83 може бути R або K, в позиції H84 може бути A або S, в позиції H89 може бути V або M, а в позиції L18 може бути S або P. Необов'язково, варіабельна область зрілого важкого ланцюга має амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 64-66, і варіабельна область зрілого легкого ланцюга має амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 74-76. В деяких антитілах варіабельна область зрілого важкого ланцюга має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 65, а варіабельна область зрілого легкого ланцюга має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76.

[0013] Будь-яке з вищевказаних антитіл може бути інтактним антитілом, зв'язуючим фрагментом, одностанцюговим антитілом, фрагментом Fab або Fab'2. У будь-якому з вищевказаних антитіл варіабельна область зрілого легкого ланцюга може бути поєднана з константною областю легкого ланцюга, а варіабельна область зрілого важкого ланцюга може бути поєднана з константною областю важкого ланцюга. Необов'язково, константна область важкого ланцюга являє собою мутантну форму природної константної області важкого ланцюга людини, яка має ослаблене зв'язування з рецептором Fcγ відносно природної константної області важкого ланцюга людини. Необов'язково, константна область важкого ланцюга є такою ізотипу IgG1. Необов'язково, варіабельна область зрілого важкого ланцюга злита з константною областю важкого ланцюга, що має послідовність SEQ ID NO: 103, і/або варіабельна область зрілого легкого ланцюга злита з константною областю легкого ланцюга, що має послідовність SEQ ID NO: 104 або 105.

[0014] Винахід додатково відноситься до фармацевтичних композицій, які містять будь-яке з вищевказаних антитіл, і фармацевтично прийнятний носій.

[0015] Винахід додатково відноситься до нуклеїнових кислот, які кодують важкий ланцюг і/або легкий ланцюг будь-якого з вищевказаних антитіл, таких як будь-яка з SEQ ID NO: 40, 42, 44-56, 87, 89, 91-96 і 106-108.

[0016] У винаході додатково запропонований рекомбінантний вектор експресії, який містить нуклеїнову кислоту, як описано вище, і запропонована клітина-господар, трансформована рекомбінантним вектором експресії.

[0017] У винаході додатково запропонований спосіб гуманізації антитіла, який включає: а) вибір одного або декількох акцепторних антитіл; б) ідентифікацію амінокислотних залишків мишачого антитіла, які підлягають збереженню; в) синтез нуклеїнової кислоти, яка кодує гуманізований важкий ланцюг, який містить CDR важкого ланцюга антитіла миші, і нуклеїнової кислоти, яка кодує гуманізований легкий ланцюг, який містить CDR легкого ланцюга антитіла миші; і г) експресію нуклеїнових кислот в клітині-хазяїні, щоб продукувати гуманізоване антитіло; причому мишаче антитіло являє собою 9D5 або 14G8, при цьому 9D5 характеризується варіабельною областю зрілого важкого ланцюга SEQ ID NO: 1 і варіабельною областю зрілого легкого ланцюга SEQ ID NO: 16, а 14G8 характеризується варіабельною областю зрілого важкого ланцюга SEQ ID NO: 61 і варіабельною областю зрілого легкого ланцюга SEQ ID NO: 70.

[0018] У винаході додатково запропонований спосіб продукування гуманізованого, химерного або венированого антитіла, який включає: а) культивування клітин, трансформованих нуклеїновими кислотами, які кодують важкий і легкий ланцюги антитіла, так що клітини секретують антитіло; і б) очищення антитіла від клітинного культурального середовища; причому антитіло являє собою гуманізовану, химерну або венировану форму 9D5

або 14G8.

[0019] У винаході додатково запропонований спосіб отримання клітинної лінії, яка продукує гуманізоване, химерне або веніроване антитіло, який включає: а) введення вектора, який кодує важкий і легкий ланцюги антитіла, і селективний маркер, в клітини; б) розмноження клітин в умовах, що дозволяють проводити відбір клітин, які мають збільшену кількість копій вектора; в) виділення окремих клітин з обраних клітин; і г) створення банку клітин, клонованих з однієї клітини, обраної на основі виходу антитіла; причому антитіло являє собою гуманізовану, химерну або веніровану форму 9D5 або 14G8. Необов'язково, спосіб додатково включає розмноження клітин в селективних умовах і відбір ліній клітин, які природно експресують і секретують щонайменше 100 мг/л/10<sup>6</sup> клітин/24 год.

[0020] У винаході додатково запропонований спосіб інгібування або зниження агрегації транстиретина у суб'єкта, який має транстиретин-опосередкований амілоїдоз або знаходиться під ризиком його розвитку, що включає введення суб'єкту будь-якого з вищевказаних антитіл ефективною схемою, тим самим пригнічуючи або зменшуючи агрегацію транстиретина у суб'єкта.

[0021] У винаході додатково запропонований спосіб інгібування або зменшення формування фібрил транстиретина у суб'єкта, який має транстиретин-опосередкований амілоїдоз або знаходиться під ризиком його розвитку, що включає введення суб'єкту будь-якого з вищевказаних антитіл ефективною схемою, тим самим пригнічуючи або зменшуючи накопичення транстиретина у суб'єкта.

[0022] У винаході додатково запропонований спосіб зменшення кількості відкладень транстиретина у суб'єкта, що має транстиретин-опосередкований амілоїдоз або знаходиться під ризиком його розвитку, що включає введення суб'єкту будь-якого з вищевказаних антитіл ефективною схемою, тим самим зменшуючи кількість відкладень транстиретина у суб'єкта.

[0023] У винаході додатково запропоновано спосіб усунення агрегатів транстиретина у суб'єкта, який має транстиретин-опосередкований амілоїдоз або знаходиться під ризиком його розвитку, що включає введення суб'єкту будь-якого з вищевказаних антитіл ефективною схемою, тим самим усуваючи агрегати транстиретина у суб'єкта в порівнянні з суб'єктом, який має транстиретин-опосередкований амілоїдоз або перебуває під ризиком його розвитку, і який не отримував антитіла.

[0024] У винаході додатково запропоновано спосіб стабілізації нетоксичної форми транстиретина у суб'єкта, який має транстиретин-опосередкований амілоїдоз або знаходиться під ризиком його розвитку, що включає введення суб'єкту будь-якого з вищевказаних антитіл ефективною схемою, тим самим стабілізуючи нетоксичну форму транстиретина у суб'єкта.

[0025] У винаході додатково запропоновано спосіб лікування або здійснення профілактики транстиретин-опосередкованого амілоїдозу у суб'єкта, що включає введення суб'єкту будь-якого з вищевказаних антитіл ефективною схемою.

[0026] У винаході додатково запропоновано спосіб уповільнення початку прояву транстиретин-опосередкованого амілоїдозу у суб'єкта, що включає введення суб'єкту будь-якого з вищевказаних антитіл ефективною схемою.

[0027] У винаході додатково запропоновано спосіб діагностування транстиретин-опосередкованого амілоїдозу у суб'єкта, що включає приведення в контакт біологічного зразка з суб'єкта з ефективною кількістю будь-якого з вищевказаних антитіл. Необов'язково, спосіб додатково включає виявлення зв'язування антитіла з транстиретином, причому присутність зв'язаного антитіла вказує на те, що суб'єкт має транстиретин-опосередкований амілоїдоз. Необов'язково, спосіб додатково включає порівняння зв'язування антитіла з біологічним зразком зі зв'язуванням антитіла з контрольним зразком, при цьому підвищене зв'язування антитіла з біологічним зразком відносно контрольного зразка вказує на те, що суб'єкт має транстиретин-опосередкований амілоїдоз. Необов'язково, біологічний зразок і контрольний зразок містять клітини того ж самого тканинного походження. Необов'язково, біологічний зразок і/або контрольний зразок являють собою кров, сироватку, плазму або тверду тканину. Необов'язково, тверда тканина являє собою тканину з серця, периферичної нервової системи, вегетативної нервової системи, нирок, очей або шлунково-кишкового тракту.

[0028] У будь-якому з вищевказаних способів, транстиретин-опосередкований амілоїдоз, може необов'язково бути сімейним транстиретиновим амілоїдозом або спорадичним транстиретиновим амілоїдозом. Необов'язково, сімейний транстиретиновий амілоїдоз являє собою сімейну амілоїдну кардіоміопатію (FAC), сімейну амілоїдну поліневропатію (FAP) або селективний амілоїдоз центральної нервової системи (CNSA). Необов'язково, спорадичний транстиретиновий амілоїдоз являє собою старечий системний амілоїдоз (SSA) або старечий серцевий амілоїдоз (SCA). У будь-якому з вищевказаних способів, транстиретин-

опосередкований амілоїдоз може необов'язково бути пов'язаний з накопиченням амілоїдів в серці, периферичній нервовій системі, вегетативній нервовій системі, нирках, очах або шлунково-кишковому тракту суб'єкта.

[0029] У винаході додатково запропоновано спосіб виявлення присутності або відсутності відкладень транстиретина у суб'єкта, що включає приведення в контакт біологічного зразка з суб'єкта, підозрюваного в наявності амілоїдного скупчення, з ефективною кількістю будь-якого з вищевказаних антитіл. Необов'язково, спосіб додатково включає виявлення зв'язування антитіла з транстиретинном, причому виявлення зв'язаного антитіла вказує на наявність відкладень транстиретина. Необов'язково, спосіб додатково включає порівняння зв'язування антитіла з біологічним зразком зі зв'язуванням антитіла з контрольним зразком, при цьому підвищене зв'язування антитіла з біологічним зразком відносно контрольного зразка вказує на те, що суб'єкт має транстиретин-опосередкований амілоїдоз. Необов'язково, біологічний зразок і контрольний зразок містять клітини того ж самого тканинного походження. Необов'язково, біологічний зразок і/або контрольний зразок являють собою кров, сироватку, плазму або тверду тканину. Необов'язково, тверда тканина являє собою тканину з серця, периферичної нервової системи, вегетативної нервової системи, нирок, очей або шлунково-кишкового тракту.

[0030] У винаході додатково запропоновано спосіб виявлення кількості відкладень транстиретина у суб'єкта, що включає введення будь-якого з антитіл і виявлення присутності зв'язаного антитіла у суб'єкта. Необов'язково, присутність зв'язаного антитіла визначається позитронно-емісійною томографією (ПЕТ).

#### КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

[0031] Фіг. 1А ілюструє вирівнювання варіабельних областей важкого ланцюга антитіла 9D5 миші, модельних антитіл миші, акцепторних антитіл людини і гуманізованих варіантів антитіла 9D5. Послідовності CDR, як визначено по Кабату, охоплені рамками, за винятком того, що перша охоплююча рамка являється поєднанням CDR-H1 по Чотіа і CDR-H1 по Кабату, з підкресленим і виділеним напівжирним шрифтом CDR-H1 по Кабату.

[0032] Фіг. 1В ілюструє вирівнювання варіабельних областей легкого ланцюга антитіла 9D5 миші, модельного антитіла миші, акцепторного антитіла людини і гуманізованих варіантів антитіла 9D5. Послідовності CDR, як визначено по Кабату, охоплені рамками.

[0033] Фіг. 2А ілюструє вирівнювання варіабельних областей важкого ланцюга антитіла 14G8 миші, модельного антитіла миші, акцепторних антитіл людини і гуманізованих варіантів антитіла 14G8. Послідовності CDR, як визначено по Кабату, охоплені рамками, за винятком того, що перша охоплююча рамка являється поєднанням CDR-H1 по Чотіа і CDR-H1 по Кабату, з підкресленим і виділеним напівжирним шрифтом CDR-H1 по Кабату.

[0034] Фіг. 2В ілюструє вирівнювання варіабельних областей легкого ланцюга антитіла 14G8 миші, модельного антитіла миші, акцепторних антитіл людини і гуманізованих варіантів антитіла 14G8. Послідовності CDR, як визначено по Кабату, охоплені рамками.

[0035] Фіг. 3А і 3В: Фіг. 3А ілюструє криві зв'язування антитіл 5A1, 6C1, 9D5 і 14G8 миші з TTR, обробленим pH4. Фіг. 3В ілюструє криві зв'язування антитіл 5A1, 6C1, 9D5 і 14G8 миші з нативним TTR.

[0036] Фіг. 4А, 4В і 4С: Фіг. 4А ілюструє інгібування утворення фібрил TTR-Y78F за допомогою антитіл до mis-TTR. Фіг. 4В ілюструє інгібування утворення фібрил TTR-V122I за допомогою антитіла 14G8. Фіг. 4С ілюструє інгібування утворення фібрил TTR-V122I за допомогою контрольного антитіла.

[0037] Фіг. 5А і 5В: Фіг. 5А ілюструє аналіз оптичної щільності Вестерн-блот аналізу зразків плазми від пацієнтів, для яких підтверджений V30M ATTR (зразок № 11, № 12, № 15, № 18, № 19, № 20), і зразків від суб'єктів з нормальним станом (зразок № 21, 22, № 23, № 24, № 25, № 27), із застосуванням антитіла 9D5 mis-TTR. Фіг. 5В ілюструє аналіз оптичної щільності Вестерн-блот аналізу тих же зразків із застосуванням антитіла 5A1 mis-TTR.

[0038] Фіг. 6 ілюструє плашковий аналіз MesoScale Discovery (MSD) зразків плазми від пацієнтів з підтвердженням V30M ATTR (зразок № 11, № 12, № 15, № 18, № 19, № 20) і зразків від суб'єктів з нормальним станом (№ 21, № 22, № 23, № 24, № 25, № 27), із застосуванням антитіла 6C1.

[0039] Фіг. 7А і 7В: Фіг. 7А ілюструє ефект антитіла 14G8 на поглинання TTR з F87M/L110M клітинами THP-1. Фіг. 7В ілюструє ефект кожного антитіла до mis-TTR на поглинання TTR з V30M клітинами THP-1.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

[0040] SEQ ID NO: 1 вказана як амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга антитіла 9D5 миші.

[0041] SEQ ID NO: 2 вказана як амінокислотна послідовність 1SEQ\_H шаблону структури

мишачої варіабельної області важкого ланцюга.

[0042] SEQ ID NO: 3 вказана як амінокислотна послідовність варіабельного акцептора важкого ланцюга ACC № BAC02114.

5 [0043] SEQ ID NO: 4 вказана як амінокислотна послідовність варіабельного акцептора важкого ланцюга ACC № AAX82494.1.

[0044] SEQ ID NO: 5 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 1 варіабельної області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 9D5 (Hu9D5VHv1).

[0045] SEQ ID NO: 6 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 2 варіабельної області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 9D5 (Hu9D5VHv2).

10 [0046] SEQ ID NO: 7 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 2b варіабельної області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 9D5 (Hu9D5VHv2b).

[0047] SEQ ID NO: 8 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 3 варіабельної області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 9D5 (Hu9D5VHv3).

15 [0048] SEQ ID NO: 9 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 3b варіабельної області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 9D5 (Hu9D5VHv3b).

[0049] SEQ ID NO: 10 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 4 варіабельної області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 9D5 (Hu9D5VHv4).

[0050] SEQ ID NO: 11 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 4b варіабельної області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 9D5 (Hu9D5VHv4b).

20 [0051] SEQ ID NO: 12 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 5 варіабельної області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 9D5 (Hu9D5VHv5).

[0052] SEQ ID NO: 13 вказана як амінокислотна послідовність CDR-H1 по Кабату антитіла 9D5 миші.

25 [0053] SEQ ID NO: 14 вказана як амінокислотна послідовність CDR-H2 по Кабату антитіла 9D5 миші.

[0054] SEQ ID NO: 15 вказана як амінокислотна послідовність CDR-H3 по Кабату антитіла 9D5 миші.

[0055] SEQ ID NO: 16 вказана як амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга антитіла 9D5 миші.

30 [0056] SEQ ID NO: 17 вказана як амінокислотна послідовність 1MJU\_L шаблону структури варіабельної області легкого ланцюга миші.

[0057] SEQ ID NO: 18 вказана як амінокислотна послідовність варіабельного акцептора легкого ланцюга ACC № ABC66952.

35 [0058] SEQ ID NO: 19 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 1 варіабельної області легкого ланцюга гуманізованого антитіла 9D5 (Hu9D5VLv1).

[0059] SEQ ID NO: 20 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 2 варіабельної області легкого ланцюга гуманізованого антитіла 9D5 (Hu9D5VLv2).

[0060] SEQ ID NO: 21 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 3 варіабельної області легкого ланцюга гуманізованого антитіла 9D5 (Hu9D5VLv3).

40 [0061] SEQ ID NO: 22 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 4 варіабельної області легкого ланцюга гуманізованого антитіла 9D5 (Hu9D5VLv4).

[0062] SEQ ID NO: 23 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 5 варіабельної області легкого ланцюга гуманізованого антитіла 9D5 (Hu9D5VLv5).

45 [0063] SEQ ID NO: 24 вказана як амінокислотна послідовність CDR-L1 по Кабату антитіла 9D5 миші.

[0064] SEQ ID NO: 25 вказана як амінокислотна послідовність CDR-L2 по Кабату антитіла 9D5 миші.

[0065] SEQ ID NO: 26 вказана як амінокислотна послідовність CDR-L3 по Кабату антитіла 9D5 миші.

50 [0066] SEQ ID NO: 27 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 1 важкого ланцюга гуманізованого 9D5.

[0067] SEQ ID NO: 28 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 2 важкого ланцюга гуманізованого 9D5.

55 [0068] SEQ ID NO: 29 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 2b важкого ланцюга гуманізованого 9D5.

[0069] SEQ ID NO: 30 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 3 важкого ланцюга гуманізованого 9D5.

[0070] SEQ ID NO: 31 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 3b важкого ланцюга гуманізованого 9D5.

60 [0071] SEQ ID NO: 32 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 4 важкого ланцюга





варіабельної області важкого ланцюга миші.

[00102] SEQ ID NO: 63 вказана як амінокислотна послідовність варіабельного акцептора важкого ланцюга ACC№ AAD30410.1.

5 [00103] SEQ ID NO: 64 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 1 варіабельної області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 14G8 (Hu14G8VHv1).

[00104] SEQ ID NO: 65 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 2 варіабельної області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 14G8 (Hu14G8VHv2).

[00105] SEQ ID NO: 66 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 3 варіабельної області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 14G8 (Hu14G8VHv3).

10 [00106] SEQ ID NO: 67 вказана як амінокислотна послідовність CDR-H1 по Кабату антитіла 14G8 миші.

[00107] SEQ ID NO: 68 вказана як амінокислотна послідовність CDR-H2 по Кабату антитіла 14G8 миші.

15 [00108] SEQ ID NO: 69 вказана як амінокислотна послідовність CDR-H3 по Кабату антитіла 14G8 миші.

[00109] SEQ ID NO: 70 вказана як амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга антитіла 14G8 миші.

[00110] SEQ ID NO: 71 вказана як амінокислотна послідовність 1MJU\_L шаблону структури варіабельної області легкого ланцюга миші.

20 [00111] SEQ ID NO: 72 вказана як амінокислотна послідовність варіабельного акцептора легкого ланцюга ACC № ABA71374.1.

[00112] SEQ ID NO: 73 вказана як амінокислотна послідовність варіабельного акцептора легкого ланцюга ACC № ABC66952.1.

25 [00113] SEQ ID NO: 74 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 1 варіабельної області легкого ланцюга гуманізованого антитіла 14G8 (Hu14G8VLv1).

[00114] SEQ ID NO: 75 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 2 варіабельної області легкого ланцюга гуманізованого антитіла 14G8 (Hu14G8VLv2).

[00115] SEQ ID NO: 76 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 3 варіабельної області легкого ланцюга гуманізованого антитіла 14G8 (Hu14G8VLv3).

30 [00116] SEQ ID NO: 77 вказана як амінокислотна послідовність CDR-L1 по Кабату антитіла 14G8 миші.

[00117] SEQ ID NO: 78 вказана як амінокислотна послідовність CDR-L2 по Кабату антитіла 14G8 миші.

35 [00118] SEQ ID NO: 79 вказана як амінокислотна послідовність CDR-L3 по Кабату антитіла 14G8 миші.

[00119] SEQ ID NO: 80 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 3 CDR-L1 по Кабату гуманізованого антитіла 14G8 миші (Hu14G8VLv3).

[00120] SEQ ID NO: 81 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 1 важкого ланцюга гуманізованого 14G8.

40 [00121] SEQ ID NO: 82 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 2 важкого ланцюга гуманізованого 14G8.

[00122] SEQ ID NO: 83 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 3 важкого ланцюга гуманізованого 14G8.

45 [00123] SEQ ID NO: 84 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 1 легкого ланцюга гуманізованого 14G8.

[00124] SEQ ID NO: 85 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 2 легкого ланцюга гуманізованого 14G8.

[00125] SEQ ID NO: 86 вказана як амінокислотна послідовність варіанта 3 легкого ланцюга гуманізованого 14G8.

50 [00126] SEQ ID NO: 87 вказана як нуклеотидна послідовність варіабельної області важкого ланцюга антитіла 14G8 миші з сигнальним пептидом.

[00127] SEQ ID NO: 88 вказана як амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга антитіла 14G8 миші з сигнальним пептидом.

55 [00128] SEQ ID NO: 89 вказана як нуклеотидна послідовність варіабельної області легкого ланцюга антитіла 14G8 миші з сигнальним пептидом.

[00129] SEQ ID NO: 90 вказана як амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга антитіла 14G8 миші з сигнальним пептидом.

[00130] SEQ ID NO: 91 вказана як нуклеотидна послідовність варіанта 1 варіабельної області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 14G8 (Hu14G8VHv1).

60 [00131] SEQ ID NO: 92 вказана як нуклеотидна послідовність варіанта 2 варіабельної

області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 14G8 (Hu14G8VHv2).

[00132] SEQ ID NO: 93 вказана як нуклеотидна послідовність варіанта 3 варіабельної області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 14G8 (Hu14G8VHv3).

5 [00133] SEQ ID NO: 94 вказана як нуклеотидна послідовність варіанта 1 варіабельної області легкого ланцюга гуманізованого антитіла 14G8 (Hu14G8VLv1).

[00134] SEQ ID NO: 95 вказана як нуклеотидна послідовність варіанта 2 варіабельної області легкого ланцюга гуманізованого антитіла 14G8 (Hu14G8VLv2).

[00135] SEQ ID NO: 96 вказана як нуклеотидна послідовність варіанта 3 варіабельної області легкого ланцюга гуманізованого антитіла 14G8 (Hu14G8VLv3).

10 [00136] SEQ ID NO: 97 вказана як амінокислотна послідовність сигнального пептиду варіабельної області важкого ланцюга антитіла 14G8 миші.

[00137] SEQ ID NO: 98 вказана як нуклеотидна послідовність сигнального пептиду варіабельної області важкого ланцюга антитіла 14G8 миші.

15 [00138] SEQ ID NO: 99 вказана як амінокислотна послідовність сигнального пептиду варіабельної області легкого ланцюга антитіла 14G8 миші.

[00139] SEQ ID NO: 100 вказана як нуклеотидна послідовність сигнального пептиду варіабельної області легкого ланцюга антитіла 14G8 миші.

[00140] SEQ ID NO: 101 вказана як амінокислотна послідовність типової константної області важкого ланцюга IgG1 людини.

20 [00141] SEQ ID NO: 102 вказана як амінокислотна послідовність типової константної області важкого ланцюга IgG1 людини аллотипу G1m3 імуноглобуліну IgG1.

[00142] SEQ ID NO: 103 вказана як амінокислотна послідовність типової константної області важкого ланцюга IgG1 людини аллотипу G1m3 імуноглобуліну IgG1.

25 [00143] SEQ ID NO: 104 викладена амінокислотна послідовність типової константної області каппа легкого ланцюга людини, що має N-кінцевий аргінін.

[00144] SEQ ID NO: 105 викладена амінокислотна послідовність типової константної області каппа легкого ланцюга людини без N-кінцевого аргініну.

[00145] SEQ ID NO: 106 вказана як нуклеотидна послідовність типової константної області важкого ланцюга аллотипу G1m3.

30 [00146] SEQ ID NO: 107 вказана як нуклеотидна послідовність типової константної області легкого ланцюга, що має N-кінцевий аргінін.

[00147] SEQ ID NO: 108 вказана як нуклеотидна послідовність типової константної області легкого ланцюга без N-кінцевого аргініну.

35 [00148] SEQ ID NO: 109 вказана як амінокислотна послідовність транстиретина людини, яка представлена під ідентифікаційним номером P02766.1 (UniProt).

[00149] SEQ ID NO: 110 вказана як амінокислотна послідовність транстиретина людини, яка представлена під ідентифікаційним номером AAB35639.1 (GenBank).

[00150] SEQ ID NO: 111 вказана як амінокислотна послідовність транстиретина людини, яка представлена під ідентифікаційним номером AAB35640.1 (GenBank).

40 [00151] SEQ ID NO: 112 вказана як амінокислотна послідовність транстиретина людини, яка представлена під ідентифікаційним номером ABI63351.1 (GenBank).

[00152] SEQ ID NO: 113 вказана як амінокислотна послідовність залишків 89-97 транстиретина людини.

45 [00153] SEQ ID NO: 114 вказана як амінокислотна послідовність потенційного транстиретинового імуногена.

[00154] SEQ ID NO: 115 вказана як амінокислотна послідовність потенційного транстиретинового імуногена.

[00155] SEQ ID NO: 116 вказана як амінокислотна послідовність потенційного транстиретинового імуногена.

50 [00156] SEQ ID NO: 117 вказана як амінокислотна послідовність комбінованого CDR-H1 по Чотіа-Кабату антитіла 9D5 миші.

[00157] SEQ ID NO: 118 вказана як амінокислотна послідовність комбінованого CDR-H1 по Чотіа-Кабату антитіла 14G8 миші.

#### ВИЗНАЧЕННЯ

55 [00158] Моноклональні антитіла або інші біологічні об'єкти зазвичай надаються у виділеній формі. Це означає, що антитіло або інший біологічний об'єкт зазвичай є щонайменше на 50% мас./мас. чистим від заважаючих білків та інших забруднювачів, що виникають в результаті його отримання або очищення, але це не виключає можливості змішування моноклонального антитіла з надмірною кількістю фармацевтично-прийнятного носія(-їв) або іншого переносника, призначеного для полегшення його застосування. Іноді моноклональні антитіла є щонайменше

на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% або 99% мас./мас. чистими від заважаючих білків і забруднюючих речовин, які виникають в результаті виробництва або очищення. Часто, виділене моноклональне антитіло або інший біологічний об'єкт є переважаючим макромолекулярним видом, який залишився після його очищення.

5 [00159] Специфічне зв'язування антитіла з його цільовим антигеном означає афінність, яка складає щонайменше  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ , або  $10^{10}$   $M^{-1}$ . Специфічне зв'язування в більшій мірі виявляється і відрізняється від неспецифічного зв'язування, яке трапляється, щонайменше, з однією сторонньою мішенню. Специфічне зв'язування може бути результатом формування зв'язків між конкретними функціональними групами, або конкретно просторовою підгонкою (наприклад, тип «замок і ключ»), тоді як неспецифічне зв'язування зазвичай є результатом Ван дер Ваальсових сил. Однак, специфічне зв'язування не обов'язково означає те, що антитіло зв'язує одну і тільки одну мішень.

10 [00160] Основна структурна одиниця антитіла являє собою тетрамер субодиноць. Кожен тетрамер містить дві ідентичні пари поліпептидних ланцюгів, причому кожна пара має один «легкий» (близько 25 кДа) і один «важкий» ланцюг (близько 50-70 кДа). Амінокінцева частина кожного ланцюга містить варіабельну область довжиною близько від 100 до 110 або більше амінокислот, які в основному відповідають за розпізнавання антигену. Ця варіабельна область в первісному експресованому вигляді зв'язана з сигнальним пептидом який відщеплюється. Варіабельна область без сигнального пептиду іноді згадується як зріла варіабельна область. Так, наприклад, зріла варіабельна область легкого ланцюга позначає варіабельну область легкого ланцюга без сигнального пептиду легкого ланцюга. Карбоксикінцева частина кожного ланцюга визначає константну область, яка головним чином відповідає за ефекторну функцію.

20 [00161] Легкі ланцюги ділять на каппа і лямбда. Важкі ланцюги поділяють на гамма, мю, альфа, дельта або епсилон, і виділяють такі ізотипи антитіла як: IgG, IgM, IgA, IgD і IgE відповідно. В межах легкого і важкого ланцюгів варіабельна і константна області з'єднуються областю «J», довжиною близько 12 або більше амінокислот, причому важкий ланцюг також містить область «D», яка включає близько 10 або більше амінокислот. Дивіться в цілому, Fundamental Immunology, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7 (включене в повному обсязі за допомогою посилання для всіх цілей).

30 [00162] Варіабельна область легкого або важкого ланцюга імуноглобуліну (також позначена в даному документі як «варіабельний домен легкого ланцюга» («домен VL») або «варіабельний домен важкого ланцюга» («домен VH»), відповідно) складається з «каркасної» області, яка розмежовується трьома «областями, які визначають комплементарність» або «CDR». Каркасні області використовують для вирівнювання CDR відповідно до специфічного зв'язування з епітопом антигена. CDR містять амінокислотні залишки антитіла, які в першу чергу відповідають за зв'язування антигена. Від амінокінця до карбоксикінця обидва домени VL і VH містять такі каркасні (FR - framework) і CDR області: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4. CDR 1, 2 і 3 домену VL також згадуються в даному документі відповідно як CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3; CDR 1, 2 і 3 домену VH також згадуються в даному документі відповідно як CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3.

40 [00163] Позначення амінокислот для кожного з доменів VL і VH відповідає будь-якому звичайному визначенню CDR. Загальноприйняті визначення включають визначення по Кабату Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), визначення по Чотіа (Chothia & Lesk, J. Mol. 196: 901-917, 1987; Chothia et al., Nature 342: 878-883, 1989); поєднане визначення для CDR по Чотіа-Кабату, в якому CDR-H1 є суміщеними CDR по Чотіа і Кабату; визначення AbM, яке використовується програмним забезпеченням для моделювання антитіл Oxford Molecular; і контактне визначення Мартіна та співавторів (bioinfo.org.uk/abs) (див. Таблицю 1). Кабат пропонує широко застосовувану угоду про нумерацію (нумерація Кабата), в якій відповідним залишкам між різними важкими ланцюгами або між різними легкими ланцюгами надається однакове число. Коли вказується, що антитіло містить CDR за деякими визначеннями CDR (наприклад, Кабата), це визначення вказує мінімальну кількість залишків CDR, присутніх в антитілі (тобто CDR по Кабату). Це не виключає того, що також присутні інші залишки, які потрапляють в інше загальноприйняте визначення CDR, але вони виходять за межі вказаного визначення. Наприклад, антитіло, яке містить CDR, визначені по Кабату, включає серед інших варіантів, антитіло, в якому CDR містять залишки CDR по Кабату і не містять інших залишків CDR, і антитіло, в якому CDR H1 являє собою комбіновану CDR H1 по Чотіа-Кабату, та інші CDR містять залишки CDR по Кабату, і жодних додаткових залишків CDR на основі інших визначень.

[00164]

Таблиця 1

Загальноприйняті визначення CDR з використанням нумерації Кабата

Петля	По Кабату	По Чотіа	Комбіноване по Чотіа і Кабату	AbM	За контактом
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H32..H34 *	H26--H35B *	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

\*CDR-H1 по Чотіа може закінчуватися на H32, H33 або H34 (в залежності від довжини петлі). Це пов'язано з тим, що в схемі нумерації Кабата розміщують вставки додаткових залишків в 35A і 35B, тоді як в нумерації Чотіа їх розміщують в 31A і 31B. Якщо не представлено ні H35A, ні H35B (нумерація Кабата), петля CDR-H1 по Чотіа закінчується на H32. Якщо є тільки H35A, вона закінчується на H33. Якщо присутні і H35A і H35B, вона закінчується на H34.

[00165] Термін «антитіло» включає інтактні антитіла та їх зв'язуючі фрагменти. Як правило, фрагменти конкурують з інтактним антитілом, з якого вони були отримані, за специфічне зв'язування з мішенню, включаючи окремі важкі ланцюги, легкі ланцюги Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Dabs, нанотіла і Fv. Фрагменти можуть бути продуковані за допомогою методів рекомбінантної ДНК, або шляхом ферментативного або хімічного розділення інтактних імуноглобулінів. Термін «антитіло» також включає біспецифічне антитіло і/або гуманізоване антитіло. Біспецифічне або біфункціональне антитіло являє собою штучне гібридне антитіло, яке має дві різні пари важких/легких ланцюгів і два різних сайти зв'язування (див., наприклад, Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53 (1992)). У деяких біспецифічних антитіл дві різні пари важких/легких ланцюгів включають пару важкий ланцюг/легкий ланцюг гуманізованого 9D5, і пару важкий ланцюг/легкий ланцюг, специфічну до іншого епітопа на транстиретині, ніж той, що зв'язаний антитілом 9D5. У деяких біспецифічних антитіл дві різні пари важких/легких ланцюгів включають пару важкий ланцюг/легкий ланцюг гуманізованого 14G8, і пару важкий ланцюг/легкий ланцюг, специфічну до іншого епітопа на транстиретині, ніж той, що зв'язаний антитілом 14G8.

[00166] У деяких біспецифічних антитіл одна пара важкий ланцюг/легкий ланцюг являє собою гуманізоване антитіло 9D5 або 14G8, як додатково описано нижче, а інша пара важкий ланцюг/легкий ланцюг з антитіла, яке зв'язується з рецептором, що експресується на гематоенцефалічному бар'єрі, таким як рецептор інсуліну, рецептор інсулін-подібного фактора (IGF - insulin-like growth factor), рецептор лептину або рецептор ліпопротеїнів або рецептор трансферину (Friden et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4771-4775, 1991; Friden et al., Science 259:373-377, 1993). Таке біспецифічне антитіло може бути перенесене через гематоенцефалічний бар'єр за допомогою рецептор-опосередкованого транцитозу. Поглинання мозком біспецифічного антитіла може бути додатково посилене шляхом проектування біспецифічного антитіла для зниження його афінності до рецептора гематоенцефалічного бар'єру. Знижена афінність до рецептора призводить до більш широкого поширення в мозку (див., наприклад, Atwal et al., Sci. Trans. Med. 3, 84ra43, 2011; Yu et al., Sci. Trans. Med. 3, 84ra44, 2011).

[00167] Прикладами біспецифічних антитіл також можуть бути: 1) антитіло з подвійним варіабельним доменом (DVD-Ig), в якому кожний легкий ланцюг і важкий ланцюг містять два варіабельних домени в тандемі, об'єднаних коротким пептидним сполученням (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig<sup>TM</sup>) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) тандаб (Tandab), яке представляє собою гібрид двох одноланцюгових діатіл, що утворюють чотирьохвалентне біспецифічне антитіло, яке має два сайти зв'язування для кожного з цільових антигенів; 3) флекситіло, яке представляє собою поєднання scFvs з діатілом, що призводить до утворення багатовалентної молекули; 4) так звана молекула «dock and lock», створена на основі «домени димеризації і докінгу» протеїнкінази A, застосування якого з Fab призводить до отримання біспецифічного тривалентного зв'язуючого білка, що складається з двох ідентичних Fab-фрагментів, приєднаних до іншого Fab-фрагмента; (5) так звана молекула Scorpion, яка містить, наприклад,

два scFv, злитих з обома кінцями Fc-області антитіла людини. Приклади платформ, корисних для приготування біспецифічних антитіл, включають: BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab і Mab2 (F-star), Fc-спроєктований IgG1 (Xencor) або DuoBody (на основі обміну плечей Fab, Genmab).

5 [00168] Термін «епітоп» відноситься до сайту на антигені, з яким зв'язується антитіло. Епітоп може бути сформований з суміжних амінокислот або несуміжних амінокислот, що зближуються за допомогою третинного згортання одного або декількох білків. Епітопи, сформовані з суміжних амінокислот (також відомі як лінійні епітопи), зазвичай зберігаються при впливі денатуруючих розчинників, тоді як епітопи, сформовані шляхом третинного згортання (також відомі як конформаційні епітопи), зазвичай втрачаються при обробці денатуруючими розчинниками. 10 Епітоп зазвичай включає щонайменше 3, але як правило - щонайменше 5 або 8-10 амінокислот в унікальній просторовій конформації. Способи визначення просторової конформації епітопів включають, наприклад, рентгенівську кристалографію та двовимірний ядерний магнітний резонанс. Дивіться, наприклад, Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Епітоп може бути лінійним, таким як епітоп, наприклад, 2-5, 3-5, 15 3-9 або 5-9 суміжних амінокислот з SEQ ID NO: 109. Епітоп також може бути конформаційним епітопом, який містить, наприклад, два або більше несуміжних сегмента амінокислот в межах залишків 89-97 SEQ ID NO: 109.

[00169] Якщо говорять, що антитіло зв'язується з епітопом в межах амінокислот 89-97 транстиретина (TTR), наприклад, то мається на увазі, що епітоп знаходиться в межах описаного проміжку амінокислот, включаючи ті, які визначають зовнішні межі проміжку. Це не обов'язково означає, що кожна амінокислота в межах проміжку становить частину епітопа. Так, наприклад, епітоп в межах амінокислот 89-97 TTR може складатися з амінокислот 89-97, 89-96, 90-96, 91-96, 92-96, 93-96, 94-96, 89-96, 89-95, 89-94, 89-93, 89-92 або 89-93 серед інших лінійних сегментів SEQ ID NO: 113, або в разі конформаційних епітопів, несуміжних сегментів амінокислот SEQ ID NO: 113. 25

[00170] Антитіла, які розпізнають одні й ті ж епітопи, або епітопи які перекриваються, можуть бути ідентифіковані в простому імуноаналізі, який показує здатність одного антитіла конкурувати з іншим антитілом за зв'язування з цільовим антигеном. Епітоп антитіла також може 30 бути визначений рентгенівською кристалографією антитіла, зв'язаного з його антигеном, для ідентифікації контактуючих залишків. В альтернативному варіанті, два антитіла мають один і той же епітоп, якщо всі амінокислотні мутації в антигені, які зменшують або усувають зв'язування одного антитіла, також зменшують або усувають зв'язування іншого антитіла. Два антитіла мають епітопи які перекриваються, якщо деякі амінокислотні мутації, які зменшують або усувають зв'язування одного антитіла, також зменшують або усувають зв'язування іншого антитіла. 35

[00171] Конкуренція між антитілами визначається аналізом, в якому антитіло яке тестують, інгібує специфічне зв'язування еталонного антитіла з спільним антигеном (див., наприклад, Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990). Антитіло, яке тестують, конкурує з еталонним 40 антитілом, якщо надлишок антитіла, яке тестують (наприклад, щонайменше, 2x, 5x, 10x, 20x або 100x), інгібує зв'язування еталонного антитіла щонайменше на 50%, як виміряно при аналізі конкурентного зв'язування. Деякі антитіла, які тестують, інгібують зв'язування еталонних антитіл щонайменше на 75%, 90% або 99%. Антитіла, ідентифіковані конкурентним аналізом (конкуруючі антитіла), включають антитіла, які зв'язуються з тим самим епітопом, що і еталонне 45 антитіло, і антитіла, які зв'язуються з сусіднім епітопом, який знаходиться доволі проксимально по відношенню до епітопа, зв'язаного еталонним антитілом для створення стеричної перешкоди.

[00172] Термін «нативний» по відношенню до структури транстиретина (TTR) відноситься до нормально згорнутої структури TTR в його правильно функціонуючому стані (тобто тетрамер TTR). Оскільки TTR є тетрамером в його початковій згорнутій формі, ненативні форми TTR 50 включають, наприклад, неправильно згорнуті тетрамери TTR, мономері TTR, агреговані форми TTR, і TTR в формі фібрил. Ненативні форми TTR можуть включати молекули, які містять амінокислотні послідовності TTR дикого типу або мутації.

[00173] Термін «неправильно згорнутий» по відношенню до TTR відноситься до вторинної і третинної структури поліпептидного мономера або мультимера TTR, і вказує на те, що поліпептид прийняв конформацію, яка не є нормальною для цього білка в його правильно функціонуючому стані. Хоча неправильне згортання TTR може бути викликане мутаціями в білку (наприклад, делецією, заміною або інсерцією), білки TTR дикого типу також можуть бути 55 неправильно згорнуті при захворюваннях, експонуючи специфічні епітопи.

60 [00174] Термін «фармацевтично прийнятний» означає, що носій, розчинник, ексципієнт або

допоміжна речовина є сумісними з іншими інгредієнтами складу і не є по суті шкідливими для його реципієнта.

[00175] Термін «пацієнт» включає людей та інших суб'єктів-ссавців, які отримують або профілактичне, або терапевтичне лікування.

5 [00176] Людина є схильною до підвищеного ризику захворювання, якщо у суб'єкта є хоча б один відомий фактор ризику (наприклад, генетичний, біохімічний, сімейний анамнез і ситуаційний ризик), в результаті чого люди з цим фактором ризику мають статистично значимий більший ризик розвитку захворювання ніж люди без фактора ризику.

10 [00177] Термін «біологічний зразок» відноситься до зразка біологічного матеріалу всередині біологічного джерела або який може бути отриманий з джерела, наприклад людини або ссавця. Такі зразки можуть бути органами, органеллами, тканинами, зрізами тканин, фізіологічними рідинами, периферичної кров'ю, плазмою крові, сироваткою крові, клітинами, молекулами, такими як білки і пептиди, і будь-якими отриманими з них частинами або комбінаціями. Термін «біологічний зразок» може також охоплювати будь-який матеріал, отриманий шляхом обробки зразка. Похідний матеріал може включати клітини або їх потомство. Обробка біологічного зразка може включати одну або декілька фільтрацій, дистиляцій, екстракцій, концентрацій, фіксацій, інактивацій компонентів, які заважають, і тому подібного.

20 [00178] Термін «контрольний зразок» відноситься до біологічного зразка, для якого не є відомими чи для якого не підозрюють наявності мономерних, неправильно згорнутих, агрегованих або фібрильних форм транстиретина (TTR), наприклад, таких як в амілоїдних відкладеннях TTR. Контрольні зразки можуть бути отримані в осіб, які не страждають TTR амілоїдозом або специфічно обраним типом TTR амілоїдозу. Альтернативно, контрольні зразки можуть бути отримані у пацієнтів, які страждають TTR амілоїдозом або специфічно обраним типом TTR амілоїдозу. Такі зразки можуть бути отримані в той же час, що і біологічний зразок, який, як вважається, містить TTR амілоїдоз, або в іншому випадку. Біологічний зразок і контрольний зразок можна отримати з однієї і тієї ж тканини (наприклад, зріз тканини, що містить як відкладення TTR амілоїду, так і навколишні нормальні тканини). Бажано, контрольні зразки складаються в основному або повністю з тканини, вільної від амілоїдних відкладень TTR, і можуть бути використані для порівняння з біологічним зразком, який, як вважається, містить амілоїдні відкладення TTR. Бажано, тканина в контрольному зразку має той самий тип, що і тканина в біологічному зразку (наприклад, кардіоміоцити в серці).

25 [00179] Термін «хвороба» відноситься до будь-якого аномального стану, який погіршує фізіологічну функцію. Цей термін широко використовується для охоплення будь-якого розладу, хвороби, аномалії, патології, недугу, стану або синдрому, при яких порушується фізіологічна функція, незалежно від характеру етіології.

30 [00180] Термін «симптом» відноситься до суб'єктивних свідчень захворювання, таких як змінена хода, як це сприймається суб'єктом. «Ознака» відноситься до об'єктивних свідчень хвороби, які спостерігаються лікарем.

40 [00181] Для класифікації амінокислотних замін на консервативні або неконсервативні, амінокислоти згруповані таким чином: група I (гідрофобні бічні ланцюги): met, ala, val, leu, ile; група II (нейтральні гідрофільні бічні ланцюги): cys, ser, thr; група III (кислотні бічні ланцюги): asp, glu; група IV (основні бічні ланцюги): asn, gln, his, lys, arg; група V (залишки, що впливають на орієнтацію ланцюгів): gly, pro; і група VI (ароматичні бічні ланцюги): trp, tyr, phe. Під консервативними замінами мають на увазі заміни між амінокислотами в одному класі. Неконсервативні заміни полягають в обміні члена одного з цих класів на член іншого.

45 [00182] Ідентичність послідовності у відсотках визначається за допомогою послідовностей антитіл, максимально вирівняних відповідно до угоди нумерації Кабата. Після вирівнювання, якщо область антитіла суб'єкта (наприклад, вся зріла варіабельна область важкого або легкого ланцюга) порівнюють з тією ж областю еталонного антитіла, то ідентичність послідовності у відсотках між областями антитіла суб'єкта і еталонного антитіла являє собою число позицій, зайнятих такою ж амінокислотою як в області суб'єкта, так і в області еталонного антитіла, розділене на загальну кількість вирівняних позицій двох областей, причому проміжки не враховуються, помножене на 100 для перетворення у відсотки.

50 [00183] Композиції або способи, «які містять» або «які включають» один або кілька розглянутих елементів, можуть включати інші елементи, що не були точно вказані. Наприклад, композиція, яка «містить» або «включає» антитіло, може містити антитіло окремо або в комбінації з іншими складовими.

55 [00184] Позначення діапазону значень включає всі цілі числа в межах діапазону або які задають діапазон, і всі піддіапазони, задані цілими числами в межах діапазону.

60 [00185] Якщо інше не впливає з контексту, термін «близько» охоплює значення в межах

стандартної похибки вимірювання (наприклад, SEM) вказаного значення.

[00186] Статистична значимість означає  $p \leq 0,05$ .

[00187] Форми іменників в однині включають також форми в множині, до тих пір, поки інше чітко не впливає з контексту. Наприклад, термін «сполука» або «щонайменше одна сполука»

5 може включати в себе безліч сполук, включаючи їх суміші.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС СУТІ ВИНАХОДУ

##### I. Загальні положення

[00188] У винаході запропоновані антитіла, які специфічно зв'язуються з залишками 89-97 транстиретина (TTR). Антитіла мають здатність зв'язуватися з мономерними, неправильно згорнутими, агрегованими або фібрильними формами TTR. Антитіла можуть бути використані для лікування, або здійснення профілактики захворювань або розладів, пов'язаних з накопиченням TTR або накопиченням відкладень TTR (наприклад, TTR амілоїдозу). Антитіла також можуть бути використані для діагностики TTR амілоїдозу і пригнічення, або зменшення агрегації TTR, серед інших застосувань.

##### 15 II. Молекули-мішені

[00189] Транстиретин (TTR) являє собою сироватковий білок і транспортний білок спинномозкової рідини, має довжину 127 амінокислот, масу 55 кДа і синтезується в основному печінкою. Він також згадується як преальбумін, тироксинзв'язуючий преальбумін, ATTR (TTR amyloidosis) і TBPA (thyroxine-binding prealbumin - тироксинзв'язуючий преальбумін). У своєму нативному стані TTR існує як тетрамер. У гомозигот тетрамери містять ідентичні 127-амінокислотні субодиниці, багаті на бета-шари. У гетерозигот тетрамери TTR складаються з різних субодиниць і/або субодиниць дикого типу, які зазвичай об'єднуються статистичними способом.

[00190] Встановлена функція TTR в крові полягає в транспорті голо-ретинолзв'язуючого білка. Хоча TTR є основним переносником тироксину ( $T_4$ ) в крові гризунів, задіюючи сайти зв'язування, які ортогональні до сайтів, що використовуються для голо-ретинолзв'язуючого білка, сайти зв'язування  $T_4$  фактично незайняті у людей.

[00191] TTR є одним з, щонайменше, тридцять різноманітних людських білків, чие позаклітинне неправильне згортання і/або неправильна збірка (амілоїдогенез) в різноманітні агрегатних структур, як вважають, викликають дегенеративні захворювання, названі амілоїдними захворюваннями. TTR повинний зазнати конформаційних змін, щоб стати амілоїдогенним. Часткове розгортання розкриває ділянки майже незаряджених гідрофобних залишків в розгорнутій конформації, які успішно неправильно збираються в майже повністю неструктуровані сферичні агрегати, які в кінцевому підсумку зазнають конформаційного перетворення в амілоїдні структури з бета-листами.

[00192] Якщо інше не очевидно з контексту, відсилання до транстиретина (TTR), або його фрагментів, або доменів, включає природні амінокислотні послідовності людини, включаючи їх ізоформи, мутантні і алельні варіанти. Ілюстративні поліпептидні послідовності TTR позначаються ідентифікаційними номерами P02766.1 (UniProt), AAB35639.1 (GenBank), AAB35640.1 (GenBank) і ABI63351.1 (GenBank) (SEQ ID NOS: 109-112, відповідно). Залишки нумеруються відповідно до P02766.1 Swiss Prot, з першою амінокислотою зрілого білка (тобто, не включаючи 20-амінокислотну сигнальну послідовність), позначеною залишком 1. У будь-якому іншому білку TTR залишки нумеруються згідно з відповідними залишками в P02766.1 при максимальному вирівнюванні.

##### 45 III. Транстиретиновий амілоїдоз

[00193] Транстиретиновий (TTR) амілоїдоз являє собою системний розлад, який характеризується патогенним, неправильно згорнутим TTR і позаклітинним відкладенням амілоїдних фібрил, які складаються з TTR. TTR амілоїдоз зазвичай викликаний дестабілізацією нативної тетрамерної форми TTR (через умови середовища або генетичних патологій), що призводить до дисоціації, неправильного згортання і агрегації TTR в амілоїдні фібрили, які накопичуються в різних органах і тканинах, викликаючи прогресуючу дисфункцію. Дивіться, наприклад, Almeida and Saraiva, FEBS Letters 586:2891-2896 (2012); Ando et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013).

[00194] У людей, як тетрамери TTR дикого типу, так і змішані тетрамери, які складаються з субодиниць мутантного і дикого типу, можуть дисоціювати, неправильно згорнутись і агрегувати, причому процес амілоїдогенезу призводить до дегенерації постмітотичної тканини. Таким чином, TTR амілоїдоз включають захворювання, викликані патогенним неправильно згорнутим TTR, який виникає в результаті мутацій в TTR, або виникає з немутованого, неправильно згорнутого TTR.

60 [00195] Наприклад, старечий системний амілоїдоз (SSA - senile systemic amyloidosis) і



старечий серцевий амілоїдоз (SCA - senile cardiac amyloidosis) представляють собою вікові типи амілоїдозу, які виникають в результаті відкладення TTR амілоїду дикого типу за межами і всередині кардіоміоцитів серця. TTR амілоїдоз також є найбільш поширеною формою спадкового (сімейного) амілоїдозу, який викликаний мутаціями, які дестабілізують білок TTR.

5 TTR амілоїдози, які пов'язані з точковими мутаціями в гені TTR, включають сімейну амілоїдну поліневропатію (FAP - familial amyloid polyneuropathy), сімейну амілоїдну кардіоміопатію (FAC - familial amyloid cardiomyopathy) і рідкісний вибірково амілоїдоз центральної нервової системи (CNSA - central nervous system selective amyloidosis). Пацієнти зі спадковим (сімейним) TTR амілоїдозом майже завжди є гетерозиготами, що означає, що тетрамери TTR складаються з

10 субодиниць TTR мутантного і/або дикого типу, в цілому, як правило, статистично розподілених. Спадкові (сімейні) форми TTR амілоїдозу, як правило, є аутосомно-домінантними і, як правило, мають більш ранній прояв перших симптомів, ніж спорадичні захворювання (SSA і SCA).

[00196] У гені, який кодує TTR, більше 100 мутацій які пов'язують з аутосомно-домінантними розладами FAP і FAC. Дивіться, наприклад, US 2014/0056904; Saraiva, Hum. Mutat. 17(6):493-503 (2001); Damas and Saraiva, J. Struct. Biol. 130:290-299; Dwulet and Benson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 114:657-662 (1983). Ці мутації, які викликають утворення амілоїду, розподілені по всій молекулі TTR. Як правило, чим більш дестабілізуючими для тетрамерної структури TTR є мутантні субодиниці, тим раніше виявляються перші симптоми амілоїдного захворювання. Патогенний потенціал варіанта TTR в цілому, як правило, визначається комбінацією його

20 нестабільності та ефективності його клітинної секреції. Первісна патологія, спричинена деякими варіантами TTR, є результатом їх вибіркового руйнування серцевої тканини, тоді як інші варіанти TTR призводять до порушень в периферичній і вегетативній нервових системах. Пошкодження тканини, викликане TTR амілоїдогенезом, швидше за все, обумовлене головним чином токсичністю невеликих, дифундуючих агрегатів TTR, хоча накопичення позаклітинного

25 амілоїду може сприяти і майже напевно призводить до зміни структури органу на пізніх стадіях TTR амілоїдозу.

[00197] TTR амілоїдоз представлений багатьма різними формами, зі значними фенотиповими відмінностями між індивідами і географічними регіонами. Наприклад, TTR амілоїдоз може являти собою прогресуючу, аксональну сенсорну вегетативну і моторну

30 невропатію. TTR амілоїдоз може також являти собою проникаючу кардіоміопатію.

[00198] Вік прояву перших симптомів, пов'язаних з хворобою, коливається між другим і дев'ятим десятиліттями життя з великими варіаціями в різних популяціях. Мультисистемне враження TTR амілоїдозом є ключем до його діагностики. Наприклад, діагноз TTR амілоїдозу розглядається при наявності одного або декількох наступних факторів: 1) сімейний анамнез

35 невропатичного захворювання, особливо пов'язаного з серцевою недостатністю; 2) невропатична біль або прогресуючі сенсорні порушення невідомої етіології; 3) синдром кистевого тунелю без очевидної причини, особливо якщо він двосторонній і вимагає хірургічного усунення; 4) порушення моторики шлунково-кишкового тракту або дисфункція автономної нервової системи невідомої етіології (наприклад, еректильна дисфункція,

40 ортостатична гіпотензія, неврогенний голод); 5) серцева хвороба, яка характеризується потовщеними стінками шлуночків за відсутності гіпертонії; 6) розширений з невідомих причин атріо-вентрикулярний блок, особливо коли він супроводжується потовщеним серцем; і 6) включення в склоподібному тілі за типом вати. Дивіться Ando et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013). Інші симптоми можуть включати, наприклад, поліневропатію, втрату чутливості, біль, слабкість нижніх кінцівок, дисгідроз, діарею, запор, втрату ваги і нетримання/утримання сечі.

[00199] Діагностика TTR амілоїдозу зазвичай спирається на біопсію органів-мішеней з наступним гістологічним фарбуванням вирізаної тканини за допомогою специфічного до амілоїду барвника Congo red. Якщо спостерігається позитивний результат на амілоїд, згодом

50 проводиться імуногістохімічне фарбування для TTR, щоб гарантувати, що білок-попередник, відповідальний за утворення амілоїду, дійсно є TTR. Для сімейних форм захворювань необхідно продемонструвати мутацію в гені, який кодує TTR, до постановки діагнозу. Це може бути досягнуто, наприклад, за допомогою ізоелектричного фокусуючого електрофорезу, полімеразної ланцюгової реакції або лазерної диссекції/ рідинної хроматографії в тандемі з мас-спектрометрією. Дивитись, наприклад, US 2014/0056904; Ruberg and Berk, Circulation 126:1286-1300 (2012); Ando et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013).

#### IV. Антитіла

##### А. Специфічність зв'язування і функціональні властивості

[00200] У винаході запропоновані моноклональні антитіла, які зв'язуються з білком транстиретинном (TTR), більш конкретно, з епітопами в межах амінокислотних залишків 89-97

60

(SEQ ID NO: 113) білка TTR. Такі епітопи є прихованими в нативному тетрамері TTR, і експоновані в мономерних, неправильно згорнутих, агрегованих або фібрильних формах TTR.

[00201] Антитіла, позначені як 9D5 і 14G8, являють собою два таких ілюстративних антитіла миші. Якщо не очевидно з контексту, відсилання до 9D5 або 14G8 слід розуміти, як відсилання до будь-якої з мишачих, химерних, венированих і гуманізованих форм цих антитіл. Ці антитіла специфічно зв'язуються в межах амінокислотних залишків 89-97 (SEQ ID NO: 113) білка TTR. Ці антитіла додатково характеризуються їх здатністю зв'язуватися з мономерними, неправильно згорнутими, агрегованими або фібрильними формами TTR, але не з нативними тетрамерними формами TTR. Крім того, ці антитіла характеризуються імунореактивністю до серцевої тканини, схильної до TTR-опосередкованого амілоїдозу, але не до здорової серцевої тканини. Здатність зв'язуватися з конкретними білками або їх фрагментами може бути продемонстрована з використанням ілюстративних форматів аналізу, представлених в прикладах.

[00202] Деякі антитіла зв'язуються з тим же епітопом або епітопом який перекривається, що і антитіла, позначені як 9D5 або 14G8. Послідовності зрілих варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів цих антитіл позначені як SEQ ID NO: 1 і 16 (9D5), і, 61 і 70 (14G8) відповідно. Інші антитіла, які володіють такою специфічністю зв'язування, можуть бути отримані шляхом імунізації мишей за допомогою TTR або його частини, включаючи бажаний епітоп (наприклад, SEQ ID NO: 113), і шляхом скринінгу отриманих антитіл на зв'язування з мономерним TTR або пептидом, який містить SEQ ID NO: 113, необов'язково в конкуренції з антитілом, яке має варіабельні області антитіла миші 9D5 або 14G8 (IgG1 каппа). Фрагменти TTR, включаючи бажаний епітоп, можуть бути зв'язані з носієм, який допомагає викликати гуморальну відповідь на фрагмент, і/або змішані з ад'ювантом, який допомагає викликати таку відповідь. Такі антитіла можуть бути перевірені на відмінність в зв'язуванні з мономерним варіантом TTR, варіантом дикого типу або фрагментом TTR (наприклад, SEQ ID NO: 113) в порівнянні з мутантами за вказаними залишкам. Скринінг при порівнянні з такими мутантами більш точно визначає специфічність зв'язування, що дозволяє ідентифікувати антитіла, зв'язування яких інгібується мутагенезом певних залишків і які, ймовірно, будуть володіти функціональними властивостями інших ілюстративних антитіл. Мутації можуть бути систематичною заміщаючою заміною аланіном (або серином, якщо вже присутній аланін), по одному залишку за раз, або заміною більш широкими інтервалами по всій мішені або по всій її ділянці, в якій, як відомо, знаходиться епітоп. Якщо один і той же набір мутацій значно знижує зв'язування двох антитіл, обидва антитіла зв'язують один і той самий епітоп.

[00203] Антитіла, які володіють специфічністю зв'язування обраного антитіла миші (наприклад, 9D5 або 14G8), також можуть бути отримані з використанням варіанту способу фагового дисплея. Див. Winter, WO 92/20791. Цей спосіб особливо підходить для продукування людських антитіл. У цьому способі в якості вихідного матеріалу використовують варіабельну область або важкого, або легкого ланцюга обраного антитіла миші. Якщо, наприклад, в якості вихідного матеріалу обрана варіабельна область легкого ланцюга, то створюють бібліотеку фагів, в якій елементи відображають одну і ту ж варіабельну область легкого ланцюга (тобто вихідний матеріал миші) та іншу варіабельну область важкого ланцюга. Варіабельні області важкого ланцюга можна, наприклад, отримати з бібліотеки перегрупованих варіабельних областей важкого ланцюга людини. Відбирається фаг, який демонструє сильне специфічне зв'язування (наприклад, щонайменше  $10^8$ , а більш бажано, щонайменше,  $10^9$  M<sup>-1</sup>) для мономера TTR або його фрагмента (наприклад, амінокислотних залишків 89-97). Варіабельна область важкого ланцюга з цього фага потім служить в якості вихідного матеріалу для конструювання додаткової бібліотеки фагів. У цій бібліотеці кожен фаг відображає ту ж саму варіабельну область важкого ланцюга (тобто область, ідентифіковану з першої дисплей-бібліотеки), та іншу варіабельну область легкого ланцюга. Варіабельні області легкого ланцюга можуть бути отримані, наприклад, з бібліотеки перегрупованих варіабельних областей легкого ланцюга людини. Знову ж, вибирають фаг, який демонструє сильне специфічне зв'язування для мономерного TTR або його фрагмента (наприклад, амінокислотних залишків 89-97). Отримані антитіла зазвичай мають таку ж або подібну специфічність до епітопів, що і вихідний матеріал миші. CDR по Кабату важкого ланцюга 9D5 позначені SEQ ID NO: 13-15 відповідно, а CDR по Кабату легкого ланцюга 9D5 позначені SEQ ID NO: 24-26, відповідно. Комбінована CDR-H1 по Чотіа-Кабату антитіла 9D5 позначена як SEQ ID NO: 117. CDR по Кабату важкого ланцюга 14G8 позначені SEQ ID NO: 67-69 відповідно, а CDR по Кабату легкого ланцюга 14G8 позначені SEQ ID NO: 77-79, відповідно. Комбінована CDR-H1 по Чотіа-Кабату антитіла 14G8 позначена як SEQ ID NO: 118. Варіант CDR-L1 антитіла 14G8 позначений як SEQ ID NO: 80.

[00204] Інші антитіла можуть бути отримані шляхом мутагенезу кДНК, яке кодує важкий і легкий ланцюги ілюстративного антитіла, такого як 9D5 або 14G8. У винахід також включені

моноклональні антитіла, які щонайменше на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичні антитілу 9D5 або 14G8 за амінокислотною послідовністю варіабельних областей зрілого важкого і/або легкого ланцюга, і зберігають його функціональні властивості, і/або які відрізняються від відповідного антитіла невеликим числом функціонально несуттєвих амінокислотних замін (наприклад, консервативних замін), делецій або вставок. Також включені моноклональні антитіла, які мають щонайменше одну або всі шість CDR, як визначено відповідно до будь-якої загальноприйнятої угоди, але бажано по Кабату, які є на 90%, 95%, 99% або 100% ідентичними відповідним CDR антитіла 9D5 або 14G8.

[00205] У винаході також запропоновані антитіла, які мають деякі або всі (наприклад, 3, 4, 5 і 6) CDR повністю або майже повністю з 9D5 або 14G8. Такі антитіла можуть містити варіабельну область важкого ланцюга, яка має щонайменше дві і, як правило, всі три CDR повністю або майже повністю з варіабельної області важкого ланцюга антитіла 9D5 або 14G8, і/або варіабельну область легкого ланцюга, яка має щонайменше дві і, як правило, всі три CDR повністю або майже повністю з варіабельної області легкого ланцюга антитіла 9D5 або 14G8. Антитіла можуть також включати як важкі, так і легкі ланцюги. CDR є майже повністю взятою з відповідної CDR антитіла 9D5 або 14G8, коли вона містить не більше 4, 3, 2 або 1 замін, вставок або делецій, за винятком того, що CDR-H2 (коли визначено по Кабату) може мати не більше 6, 5, 4, 3, 2 або 1 замін, вставок або делецій. Такі антитіла можуть мати щонайменше 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності з антитілом 9D5 або 14G8 за амінокислотною послідовністю варіабельного зрілого важкого і/або легкого ланцюга (-іv), і зберігають його функціональні властивості, і/або які відрізняються від антитіла 9D5 або 14G8 невеликим числом функціонально несуттєвих амінокислотних замін (наприклад, консервативних замін), делецій або вставок.

[00206] Деякі антитіла, ідентифіковані за допомогою таких аналізів, можуть зв'язуватися з мономерними, неправильно згорнутими, агрегованими або фібрильними формами TTR, але не з нативними тетрамерними формами TTR, як описано в прикладах або де-небудь ще. Аналогічно, деякі антитіла є імунореактивними до тканини, схильної до TTR-опосередкованого амілоїдозу, але не до здорової тканини.

[00207] Деякі антитіла можуть пригнічувати або зменшувати агрегацію TTR, пригнічувати або зменшувати утворення фібрил TTR, зменшувати або видаляти відкладення TTR або агрегований TTR, або стабілізувати нетоксичні конформації TTR в тваринній моделі або клінічних випробуваннях. Деякі антитіла можуть лікувати, надавати профілактичну дію або сповільнювати початок прояву перших симптомів TTR амілоїдозу, як показано в тваринній моделі або клінічних випробуваннях. Ілюстративні моделі тварин для тестування активності проти TTR амілоїдозу включають ті, які описані в Kohno et al., Am. J. Path. 150(4):1497-1508 (1997); Teng et al., Laboratory Investigations 81:385-396 (2001); Wakasugi et al., Proc. Japan Acad. 63B:344-347 (1987); Shimada et al., Mol. Biol. Med. 6:333-343 (1989); Nagata et al., J. Biochem. 117:169-175 (1995); Sousa et al., Am. J. Path. 161:1935-1948 (2002); i Santos et al., Neurobiology of Aging 31:280-289 (2010).

#### В. Нелюдські антитіла

[00208] Виробництво інших нелюдських антитіл, наприклад, антитіл миші, морської свинки, приматів, кроликів або щурів, до мономерного TTR або його фрагменту (наприклад, амінокислотних залишків 89-97) може бути здійснено, наприклад, шляхом імунізації тварини білком TTR або його фрагментом. Дивіться Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP NY, 1988) (включене за допомогою посилання для всіх цілей). Такий імуноген може бути отриманий з природного джерела, шляхом пептидного синтезу або експресією рекомбінантного пептиду. Необов'язково, імуноген можна вводити злитим або іншим чином поєднаним з білком-носієм. Необов'язково, імуноген можна вводити з ад'ювантом. Можуть бути використані декілька типів ад'ювантів, як описано нижче. Для імунізації лабораторних тварин бажаним є повний ад'ювант Фрейнда, після якого застосовують неповний ад'ювант. Кролики або морські свинки зазвичай використовуються для отримання поліклональних антитіл. Мишей зазвичай використовують для продукування моноклональних антитіл. Антитіла піддають скринінгу на специфічне зв'язування з мономерним TTR або епітопом в TTR (наприклад, епітопом, який містить один або декілька амінокислотних залишків 89-97). Такий скринінг може бути здійснений шляхом визначення зв'язування антитіла з набором мономерних варіантів TTR, таких як варіанти TTR, які містять амінокислотні залишки 89-97 або мутації в межах цих залишків, і шляхом визначення того, які варіанти TTR зв'язуються з антитілом. Зв'язування може бути оцінене, наприклад, Вестерн-блоттингом, FACS (Flow Cytometry Staining Protocol) або твердофазним імуноферментним аналізом (ELISA).

#### С. Гуманізовані антитіла

[00209] Гуманізоване антитіло являє собою генетично модифіковане антитіло, в якому CDR з нелюдського «донорного» антитіла переносять в послідовності «акцепторного» антитіла людини (див., наприклад, Queen, US 5530101 і 5585089; Winter, US 5225539; Carter, US 6407213; Adair, US 5859205; і Foote, US 6881557). Послідовності акцепторних антитіл можуть являти собою, наприклад, зрілу послідовність антитіла людини, комбіновану послідовність з таких послідовностей, консенсусну послідовність послідовностей антитіла людини, або послідовність з клітин зародкової лінії. Таким чином, гуманізоване антитіло являє собою антитіло, яке має щонайменше три, чотири, п'ять або всі CDR повністю або майже повністю з донорних антитіл, і каркасні послідовності варіабельної області, і константні області, якщо вони присутні, повністю або майже повністю з послідовностей антитіла людини. Аналогічно, гуманізований важкий ланцюг має щонайменше одну, дві і зазвичай всі три CDR повністю або майже повністю з важкого ланцюга донорного антитіла, і каркасну послідовність варіабельної області важкого ланцюга, і константну область важкого ланцюга, якщо вона присутня, майже повністю з каркаса варіабельної області важкого ланцюга людини і послідовностей константної області. Схожим чином, гуманізований легкий ланцюг має щонайменше одну, дві і зазвичай всі три CDR повністю або майже повністю з легкого ланцюга донорного антитіла, і каркасну послідовність варіабельної області легкого ланцюга, і константну область легкого ланцюга, якщо вона присутня, майже повністю з каркаса варіабельної області легкого ланцюга людини і послідовностей константної області. На відміну від нанотіл і dAbs, гуманізоване антитіло містить гуманізований важкий ланцюг і гуманізований легкий ланцюг. CDR в гуманізованому антитілі являється майже повністю з відповідної CDR в нелюдському антитілі, коли щонайменше 85%, 90%, 95% або 100% відповідних залишків (як визначено за загальноприйнятою угодою, але переважно визначено по Кабату) є ідентичними між відповідними CDR. Каркасні послідовності варіабельної області ланцюга антитіла або константної області ланцюга антитіла являються майже повністю з каркасної послідовності варіабельної області людини або константної області людини відповідно, коли щонайменше 85%, 90%, 95% або 100% відповідних залишків, визначених згідно із загальноприйнятою угодою, але бажано визначені по Кабату, є ідентичними.

[00210] Хоча гуманізовані антитіла часто містять всі шість CDR (визначені згідно будь-якої загальноприйнятої домовленості, але бажано визначені по Кабату) з антитіла миші, вони також можуть бути зроблені з меншою, ніж всі CDR, кількістю (наприклад, щонайменше трьома, чотирма або п'ятьма CDR) з антитіла миші (наприклад, Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos et al., J. of Mol. Biol., 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., J. Immunol., 164:1432-1441, 2000).

[00211] У деяких антитілах для збереження зв'язування в гуманізованому антитілі необхідна лише частина CDR, а саме підгрупа залишків CDR, необхідних для зв'язування, названих SDR. Залишки CDR, які не контактують з антигеном і не входять в SDR, можуть бути ідентифіковані на основі попередніх досліджень (наприклад, залишки H60-H65 в CDR H2 часто не є потрібними), на основі областей CDR по Кабату, розташованих поза гіперваріабельними петлями по Чотіа (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987), за допомогою молекулярного моделювання та/або емпірично, або як описано в Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 2004. У таких гуманізованих антитілах в позиціях, в яких відсутній один або кілька донорних CDR-залишків, або в яких відсутня вся донорна CDR, амінокислота, яка займає позицію, може бути амінокислотою, що займає відповідну позицію (за нумерацією Кабата) в послідовності акцепторного антитіла. Кількість таких заміни акцептора для донорних амінокислот в CDR, що повинні бути включені, відображають баланс конкуруючих переваг. Такі заміни потенційно вигідні для зменшення кількості амінокислот миші в гуманізованому антитілі і, як наслідок, зменшення потенційної імуногенності. Однак заміни можуть також викликати зміни афінності, і бажано уникати значного зниження афінності. Також можуть бути обрані емпірично позиції для заміни в межах CDR, і амінокислоти для заміни.

[00212] Послідовності акцепторного антитіла людини можуть бути необов'язково обрані з багатьох відомих послідовностей антитіл людини для того, щоб забезпечити високу ступінь ідентичності послідовності (наприклад, ідентичність 65-85%) між каркасами варіабельної області послідовності акцептора людини і відповідними каркасами варіабельної області ланцюга донорного антитіла.

[00213] Прикладами послідовностей акцептора для важкого ланцюга є варіабельні області зрілого важкого ланцюга людини з ідентифікаційними номерами NCBI - BAC02114 і AAX82494.1 (SEQ ID NOS: 3 і 4), і варіабельні області важкого ланцюга людини підгрупи 3 по Кабату. BAC02114 розділяє ту ж традиційну форму, що і важкий ланцюг 9D5 миші. Іншими прикладами послідовностей акцептора для важкого ланцюга є варіабельні області зрілого важкого ланцюга

людини з ідентифікаційними номерами NCBI - AAD30410.1 і AAX82494.1 (SEQ ID NOS: 63 і 4), і варіабельні області важкого ланцюга людини підгрупи 1 по Кабату. AAD30410.1 і AAX82494.1 включають дві CDR, які мають ту ж традиційну форму, що і важкий ланцюг 14G8 миші. Прикладами послідовностей акцептора для легкого ланцюга є варіабельна область зрілого легкого ланцюга людини з ідентифікаційним номером NCBI - ABC66952 (SEQ ID NO: 18) і варіабельні області легкого ланцюга людини підгрупи 3 по Кабату. ABC66952 включає дві CDR, які мають ту ж традиційну форму, що і легкий ланцюг 9D5 миші. Іншими прикладами послідовностей акцептора для легкого ланцюга є варіабельні області зрілого легкого ланцюга людини з ідентифікаційними номерами NCBI - ABA71374.1 і ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 і 73 відповідно), і варіабельні області легкого ланцюга людини підгрупи 2 по Кабату. ABA71374.1 і ABC66952.1 мають ту ж традиційну форму, що і легкий ланцюг 14G8 миші.

[00214] Якщо вибрано більше однієї послідовності акцепторного антитіла людини, може бути використаний композит або гібрид цих акцепторів, і амінокислоти, які використовуються в різних позиціях в варіабельних областях гуманізованого легкого ланцюга і гуманізованого важкого ланцюга, можуть бути взяті з будь-яких використовуваних послідовностей акцепторного антитіла людини. Наприклад, варіабельні області зрілого важкого ланцюга людини, з ідентифікаційними номерами NCBI - BAC02114 і AAX82494.1 (SEQ ID NO: 3 і 4), використовувалися в якості послідовностей акцептора для гуманізації варіабельної області зрілого важкого ланцюга 9D5. Приклади позицій, в яких ці два акцептора розрізняються, включають позиції H19 (R або K), H40 (A або T), H44 (G або R), H49 (S або A), H77 (S або T), H82a (N або S), H83 (R або K), H84 (A або S) і H89 (V або M). Гуманізовані варіанти варіабельної області важкого ланцюга 9D5 можуть містити одну з двох таких амінокислот в будь-якій з цих позицій. Аналогічно, варіабельні області зрілого важкого ланцюга людини з ідентифікаційними номерами NCBI - AAD30410.1 і AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 і 4 відповідно) використовували в якості послідовностей акцептора для гуманізації варіабельної області зрілого важкого ланцюга 14G8. Приклади позицій, в яких ці два акцептора розрізняються, включають позиції H82a (N або S), H83 (R або K), H84 (A або S) і H89 (V або M). Гуманізовані варіанти варіабельної області важкого ланцюга 14G8 можуть містити одну з двох таких амінокислот в будь-якій з цих позицій. Аналогічно, варіабельні області зрілого легкого ланцюга людини з ідентифікаційними номерами NCBI - ABA71374.1 і ABC66952.1 (SEQ ID NOS: 72 і 73 відповідно) використовували в якості послідовностей акцептора для гуманізації варіабельної області зрілого легкого ланцюга 14G8. Прикладом позиції, в якій ці два акцептора відрізняються, є позиція L18 (S або P). Гуманізовані варіанти варіабельної області легкого ланцюга 14G8 можуть містити одну з двох таких амінокислот в цій позиції.

[00215] Можуть бути обрані певні амінокислоти із залишків в каркасі варіабельної області людини для заміни, виходячи з їх можливого впливу на конформацію CDR і/або зв'язування з антигеном. Дослідження таких можливих впливів полягає в моделюванні, вивченні характеристик амінокислот в певних місцях, або емпіричному спостереженні ефектів заміни або мутагенезу певних амінокислот.

[00216] Наприклад, коли амінокислота відрізняється між каркасним залишком варіабельної області миші і обраним каркасним залишком варіабельної області людини, амінокислота в людському каркасі може бути замінена еквівалентною каркасною амінокислотою з мишачого антитіла, якщо розумно очікувати, що амінокислота:

1) нековалентно прямо зв'язується з антигеном;

2) є суміжною з областю CDR або знаходиться всередині CDR, як визначено по Чотіа, але не по Кабату;

3) в іншому випадку взаємодіє з областю CDR (наприклад, знаходиться в межах близько 6 Å області CDR) (наприклад, ідентифікується шляхом моделювання легкого або важкого ланцюга на вирішеній структурі гомологічного відомого ланцюга імуноглобуліну); або

4) представляє собою залишок, розміщений в інтерфейсі VL-VH.

[00217] Амінокислотні залишки каркаса з класів 1) - 3), як визначено Queen, US 5530101, іноді по черзі згадуються як канонічні і верніальні (vernier) залишки. Амінокислотні залишки каркаса, які допомагають визначити конформацію петлі CDR, іноді згадуються як канонічні залишки (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Thornton & Martin, J. Mol. Biol. 263:800-815 (1996)). Амінокислотні залишки каркаса, які підтримують конформацію антигензв'язуючої петлі і відіграють певну роль в тонкій підгонці антитіла до антигена, іноді згадуються як верніальні залишки (vernier residues) (Foote & Winter, J. Mol. Biol. 224:487-499 (1992)).

[00218] Іншими залишками каркаса, які представляють собою кандидати на заміну, є залишки, які створюють потенційний сайт глікозилювання. Іншими кандидатами на заміщення є каркасні амінокислоти акцептора людини, які є незвичайними для імуноглобуліну людини в

цьому положенні. Ці амінокислоти можуть бути замінені амінокислотами з еквівалентної позиції донорного антитіла миші, або з еквівалентних позицій більш типових людських імунoglobulinів.

[00219] Ілюстративні гуманізовані антитіла представляють собою гуманізовані форми мишачих антитіл 9D5 або 14G8, позначених відповідно Hu9D5 або Hu14G8. Антитіло 9D5 миші містить варіабельні області зрілого важкого і легкого ланцюгів, які мають амінокислотні послідовності, що включають SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 16, відповідно. У винаході запропоновано вісім ілюстративних варіабельних областей гуманізованого зрілого важкого ланцюга: Hu9D5VHv1, Hu9D5VHv2, Hu9D5VHv2b, Hu9D5VHv3, Hu9D5VHv3b, Hu9D5VHv4, Hu9D5VHv4b і Hu9D5VHv5 (SEQ ID NO: 5-12, відповідно). У винаході додатково запропоновано п'ять ілюстративних варіабельних областей зрілого легкого ланцюга людини: Hu9D5VLv1, Hu9D5VLv2, Hu9D5VLv3, Hu9D5VLv4 і Hu9D5VLv5 (SEQ ID NOS: 19-23, відповідно). Фіг. 1 ілюструє вирівнювання 9D5, модельних антитіл миші, акцепторних антитіл людини і різних гуманізованих антитіл.

[00220] Антитіло 14G8 миші містить варіабельні області важкого і легкого зрілих ланцюгів, які мають амінокислотні послідовності, що включають SEQ ID NO: 61 і SEQ ID NO: 70 відповідно. У винаході запропоновано три ілюстративних варіабельних області гуманізованого зрілого важкого ланцюга: Hu14G8VHv1, Hu14G8VHv2 і Hu14G8VHv3 (SEQ ID NO: 64-66, відповідно). У винаході додатково запропоновано три ілюстративних варіабельних області зрілого легкого ланцюга людини: Hu14G8VLv1, Hu14G8VLv2 і Hu14G8VLv3 (SEQ ID NO: 74-76, відповідно). Фіг. 2 ілюструє вирівнювання 14G8, модельних антитіл миші, акцепторних антитіл людини і різних гуманізованих антитіл.

[00221] 3 причин, таких як: можливий вплив на конформацію CDR і/або зв'язування з антигеном, опосередкування взаємодії між важкими і легкими ланцюгами, взаємодія з константною областю, є сайтом для бажаної чи небажаної посттрансляційної модифікації, є незвичайним залишком для своєї позиції в послідовності варіабельної області людини і, отже, потенційно імуногенний, підвищує потенціал до агрегування, та інших причин, наступні 15 позицій в каркасі варіабельної області були розглянуті як кандидати на заміщення в восьми ілюстративних варіабельних областях зрілого важкого ланцюга Hu9D5, і в п'яти ілюстративних варіабельних областях зрілого легкого ланцюга Hu9D5, як зазначено далі в прикладах: H42 (G42E), H47 (W47L), H69 (I69F), H82 (M82S), H82b (S82(b)L), H108 (T108L), L8 (P8A), L9 (L9P), L18 (P18S), L19 (A19V), L36 (Y36F), L39 (K39R), L60 (D60S), L70 (D70A), і L74 (K74R). Аналогічним чином, наступні 11 позицій каркаса варіабельної області розглядалися як кандидати на заміну в трьох ілюстративних варіабельних областях зрілого важкого ланцюга Hu14G8 і трьох ілюстративних варіабельних областях зрілого легкого ланцюга Hu14G8, як додатково зазначено в прикладах: H1 (Q1E), H3 (Q3K), H47 (W47L), H105 (Q105T), L8 (P8A), L9 (L9P), L19 (A19V), L26 (N26S), L36 (Y36F), L60 (D60S) і L70 (D70A).

[00222] Тут, як і в інших місцях, перший згаданий залишок являє собою залишок гуманізованого антитіла, утвореного шляхом вставки CDR по Кабату або комбінованого CDR по Чотіа-Кабату у випадку CDR-H1, в каркас акцептора людини (наприклад, комбінований або гібридний каркас акцептора людини), а другий згаданий залишок являє собою залишок, який розглядається як залишок, що заміняє такий залишок. Таким чином, в межах каркасів варіабельної області, перший згаданий залишок є людським, а в межах CDR, перший згаданий залишок є мишачим.

[00223] Ілюстративні антитіла Hu9D5 включають будь-які перестановки або комбінації ілюстративних варіабельних областей важкого і легкого зрілих ланцюгів (наприклад, VHv1/VLv1 або H1L1, VHv1/VLv2 або H1L2, VHv1/VLv3 або H1L3, VHv1/VLv4 або H1L4, VHv1/VLv5 або H1L5, VHv2/VLv1 або H2L1, VHv2/VLv2 або H2L2, VHv2/VLv3 або H2L3, VHv2/VLv4 або H2L4, VHv2/VLv5 або H2L5, VHv2b/VLv1 або H2bL1, VHv2b/VLv2 або H2bL2, VHv2b/VLv3 або H2bL3, VHv2b/VLv4 або H2bL4, VHv2b/VLv5 або H2bL5, VHv3/VLv1 або H3L1, VHv3/VLv2 або H3L2, VHv3/VLv3 або H3L3, VHv3/VLv4 або H3L4, VHv3/VLv5 або H3L5, VHv3b/VLv1 або H3bL1, VHv3b/VLv2 або H3bL2, VHv3b/VLv3 або H3bL3, VHv3b/VLv4 або H3bL4, VHv3b/VLv5 або H3bL5, VHv4/VLv1 або H4L1, VHv4/VLv2 або H4L2, VHv4/VLv3 або H4L3, VHv4/VLv4 або H4L4, VHv4/VLv5 або H4L5, VHv4b/VLv1 або H4bL1, VHv4b/VLv2 або H4bL2, VHv4b/VLv3 або H4bL3, VHv4b/VLv4 або H4bL4, VHv4b/VLv5 або H4bL5, VHv5/VLv1 або H5L1, VHv5/VLv2 або H5L2, VHv5/VLv3 або H5L3, VHv5/VLv4 або H5L4, і VHv5/VLv5 або H5L5).

[00224] У винаході запропоновані варіанти гуманізованих антитіл 9D5, в яких варіабельна область гуманізованого зрілого важкого ланцюга показує щонайменше 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності з гуманізованою Hu9D5VHv4b (SEQ ID NO: 11), і варіабельна область гуманізованого зрілого легкого ланцюга показує щонайменше 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності з Hu9D5VLv1 (SEQ ID NO: 19). У деяких таких антитілах зберігаються

щонайменше 1, 2 або всі 3 зворотні мутації або інші мутації в Hu9D5 H4bL1. У винаході також запропоновані варіанти інших ілюстративних гуманізованих антитіл 9D5. Такі варіанти мають варіабельні області легкого і важкого зрілих ланцюгів, які показують щонайменше 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності послідовностей з варіабельними областями легкого і важкого зрілих ланцюгів ілюстративних гуманізованих антитіл 9D5 H1L1, H1L2, H1L3, H1L4, H1L5, H2L1, H2L2, H2L3, H2L4, H2L5, H2bL1, H2bL2, H2bL3, H2bL4, H2bL5, H3L1, H3L2, H3L3, H3L4, H3L5, H3bL1, H3bL2, H3bL3, H3bL4, H3bL5, H4L1, H4L2, H4L3, H4L4, H4L5, H4bL1, H4bL2, H4bL3, H4bL4, H4bL5, H5L1, H5L2, H5L3, H5L4 або H5L5.

[00225] У деяких антитілах щонайменше одна з позицій H42, H47, H69, H82, H82b і H108 в області Vh зайнята E, L, F, S, L і L, відповідно. У деяких антитілах позиції H47, H69 і H82 в області Vh зайняті відповідно L, F і S, як в Hu9D5VHv1. У деяких антитілах позиції H47, H69, H82 і H82b в області Vh зайняті відповідно L, F, S і L, як в Hu9D5VHv2. У деяких антитілах позиції H42, H47 і H108 в області Vh зайняті E, L і L відповідно, як в Hu9D5VHv2b. У деяких антитілах позиції H69, H82, і H82b в області Vh зайняті відповідно F, S і L, як в Hu9D5VHv3. У деяких антитілах позиції H47 і H108 в області Vh кожна зайнята L, як в Hu9D5VHv3b і Hu9D5VHv4b. У деяких антитілах позиції H82, і H82b в області Vh зайняті відповідно S і L, як в Hu9D5VHv4. У деяких антитілах позиції H42, H47 і H82b в області Vh зайняті E, L і L відповідно, як в Hu9D5VHv5. У деяких антитілах щонайменше одна з позицій L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70 і L74 в області Vk зайнята A, P, S, V, F, R, S, A, і R, відповідно. У деяких антитілах позиція L36 в області Vk зайнята F, як в Hu9D5VLv1. У деяких антитілах позиція L60 в області Vk зайнята S, як в Hu9D5VLv3. У деяких антитілах позиції L8, L9, L19, L36, L39, L60, L70 і L74 в області Vk зайняті A, P, V, F, R, S, A і R відповідно, як в Hu9D5VLv4. У деяких антитілах позиції L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70 і L74 в області Vk зайняті A, P, S, V, F, R, S, A і R відповідно, як в Hu9D5VLv5. Області CDR таких гуманізованих антитіл можуть бути ідентичними або майже повністю ідентичними областям CDR мишачого донорного антитіла 9D5 або будь-якого з вищевказаних гуманізованих антитіл 9D5. Області CDR можуть бути визначені відповідно до будь-якої загальноприйнятої домовленості (наприклад, по Чотіа, або комбіновано по Чотіа і Кабату), але бажано, як визначено по Кабату.

[00226] Каркасні позиції варіабельних областей відповідають нумерації Кабата, якщо не вказано інше. Інші такі варіанти зазвичай відрізняються від послідовностей ілюстративних важкого і легкого ланцюгів Hu9D5 невеликим числом (наприклад, зазвичай не більше 1, 2, 3, 5, 10 або 15) замін, делецій або інсерцій. Такі відмінності зазвичай припадають на каркас, але можуть також зустрічатися в CDR.

[00227] Ілюстративні антитіла Hu14G8 включають будь-які перестановки або комбінації ілюстративних варіабельних областей важкого і легкого зрілих ланцюгів (наприклад, VHv1/VLv1 або H1L1, VHv1/VLv2 або H1L2, VHv1/VLv3 або H1L3, VHv2/VLv1 або H2L1, VHv2/VLv2 або H2L2, VHv2/VLv3 або H2L3, VHv3/VLv1 або H3L1, VHv3/VLv2 або H3L2, і VHv3/VLv3 або H3L3).

[00228] У винаході запропоновані варіанти гуманізованих антитіл 14G8, в яких варіабельна область гуманізованого зрілого важкого ланцюга показує щонайменше 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності з Hu14G8VHv2 (Hu14G8 H2) (SEQ ID NO: 65), і варіабельна область гуманізованого зрілого легкого ланцюга показує щонайменше 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності з Hu14G8VLv3 (Hu14G8 L3) (SEQ ID NO: 76). У деяких таких антитілах зберігаються щонайменше 1, 2, 3, 4 або всі 5 зворотних мутацій або інших мутацій в Hu14G8 H2L3. У винаході також запропоновані варіанти інших ілюстративних гуманізованих антитіл 14G8. Такі варіанти мають варіабельні області легкого і важкого зрілих ланцюгів, які показують щонайменше 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичності послідовностей з варіабельними областями легкого і важкого зрілих ланцюгів ілюстративних гуманізованих антитіл 14G8 H1L1, H1L2, H1L3, H2L1, H2L2, H2L3, H3L1, H3L2, або H3L3.

[00229] У деяких антитілах щонайменше одна з позицій H1, і H47 в області Vh зайнята E і L, відповідно. У деяких антитілах позиції H1 і H47 в області Vh зайняті E і L відповідно, як в Hu14G8VHv2 і Hu14G8VHv3. У деяких антитілах щонайменше одна з позицій H3 і H105 в області Vh зайнята відповідно K і T. У деяких антитілах позиції H3 і H105 в області Vh зайняті відповідно K і T, як в Hu14G8VHv1. У деяких антитілах позиція L36 в області Vk зайнята F, як в Hu14G8VLv2. У деяких антитілах щонайменше одна з позицій L8, L9, L19, L26, L60 і L70 в області Vk зайнята відповідно A, P, V, S, S і A. У деяких антитілах позиції L8, L9, L19 і L70 в області Vk зайняті відповідно A, P, V і A, як в Hu14G8VLv1. У деяких антитілах позиції L26 і L60 в області Vk зайняті S, як в Hu14G8VLv3. Області CDR таких гуманізованих антитіл можуть бути ідентичними або майже повністю ідентичними областям CDR мишачого донорного антитіла 14G8. Області CDR можуть бути визначені відповідно до будь-якої загальноприйнятої домовленості (наприклад, по Чотіа, або комбіновано по Чотіа і Кабату), але бажано, як

визначено по Кабату.

[00230] Каркасні позиції варіабельних областей відповідають нумерації Кабата, якщо не вказано інше. Інші такі варіанти зазвичай відрізняються від послідовностей ілюстративних важкого і легкого ланцюгів Hu14G8 невеликим числом (наприклад, зазвичай не більше 1, 2, 3, 5, 10 або 15) замін, делецій або інсерцій. Такі відмінності зазвичай припадають на каркас, але можуть також зустрічатися в CDR.

[00231] Можливістю для додаткових варіацій в гуманізованих варіантах 9D5 або 14G8 є додаткові зворотні мутації в каркасах варіабельної області. Багато із залишків каркаса, які не контактують з CDR в гуманізованому mAb, можуть вміщати заміни амінокислот з відповідних позицій донорного mAb миші, або інших антитіл миші або людини, і навіть багато потенційних контактних залишків в CDR також піддаються заміні. Навіть амінокислоти в CDR можуть бути замінені, наприклад, на залишки, виявлені у відповідній позиції послідовності акцептора людини, яка використовується для надання каркасів варіабельної області. Крім того, альтернативні послідовності акцептора людини можуть бути використані, наприклад, для важкого і/або легкого ланцюгів. Якщо застосовуються різні акцепторні послідовності, одна або кілька рекомендованих вище зворотних мутацій можуть не виконуватися, оскільки відповідні донорні і акцепторні залишки вже є однаковими без зворотних мутацій.

[00232] Бажано заміни або зворотні мутації в гуманізованих варіантах 9D5 або 14G8 (незалежно від того, консервативні вони чи ні) не здійснюють істотного впливу на афінність зв'язування або активність гуманізованого mAb, тобто його здатність зв'язуватися з мономерним TTR (наприклад, активність в деяких або всіх аналізах, які описані в справжніх прикладах, варіанта гуманізованого антитіла 9D5 або 14G8, є по суті, такою ж, тобто в межах експериментальної похибки, як і у антитіла 9D5 або 14G8 миші).

D. Химерні і веніровані антитіла

[00233] У винаході додатково запропоновані химерні і веніровані форми нелюдських антитіл, зокрема антитіла 9D5 або 14G8 прикладів.

[00234] Химерне антитіло являє собою антитіло, в якому варіабельні області легких і важких зрілих ланцюгів нелюдського антитіла (наприклад, миші), об'єднані з константними областями легкого і важкого ланцюгів людини. Такі антитіла майже повністю або повністю зберігають специфічність зв'язування мишачого антитіла, і складають близько двох третин людської послідовності.

[00235] Веніроване антитіло є типом гуманізованого антитіла, яке зберігає деякі і, як правило, всі CDR, і деякі залишки каркаса нелюдської варіабельної області нелюдського антитіла, але в якому замінюють інші каркасні залишки варіабельної області, які можуть робити внесок у B- або T-клітинні епітопи, наприклад, експоновані залишки (Padlan, Mol. Immunol. 28: 489, 1991) на залишки з відповідних позицій послідовності людського антитіла. Результатом є антитіло, в якому CDR взяті повністю або майже повністю з нелюдського антитіла, і каркаси варіабельної області нелюдського антитіла роблять більш подібними таким людини за допомогою замін. Веніровані форми антитіл 9D5 або 14G8 включені у винахід.

E. Антитіла людини

[00236] Людські антитіла до мономерного TTR або його фрагменту (наприклад, амінокислотним залишкам 89-97 (SEQ ID NO: 113) білка TTR) виготовляють за допомогою різних методів, описаних нижче. Деякі антитіла людини вибирають за допомогою експериментів з конкурентного зв'язування, за допомогою способу Вінтера - фагового дисплея, описаного вище, або іншим чином, щоб отримати антитіло з такою ж специфічністю до епітопів, як і в конкретному антитілі миші, такому як одне з моноклональних антитіл миші, які описані в прикладах. Також для людських антитіл може бути проведено скринінг на специфічність до певного епітопу, використовуючи лише фрагмент TTR, такий як варіант TTR, який містить лише амінокислотні залишки 89-97 TTR, в якості цільового антигена, і/або скринінг антитіл проти набору варіантів TTR, таких як варіанти TTR, які містять різні мутації в амінокислотних залишках 89-97 TTR.

[00237] Способи отримання людських антитіл включають: спосіб тріоми Oestberg et al., Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, патент США № 4634664; і Engleman et al., патент США № 4634666, використання трансгенної миші, яка містить гени імуноглобулінів людини (див., наприклад, Lonberg et al., WO93/12227 (1993); US 5877397; US 5874299; US 5814318; US 5789650; US 5770429; US 5661016; US 5633425; US 5625126; US 5569825; US 5545806; Neuberger, Nat. Biotechnol. 14: 826 (1996); і Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)) та способи фагового дисплея (див. наприклад Dower et al., WO 91/17271; McCafferty et al., WO 92/01047; US 5877218; US 5871907; US 5858657; US 5837242; US 5733743; і US 5565332).

F. Вибір константної області



[00238] Варіабельні області важкого і легкого ланцюгів химерних, венированих або гуманізованих антитіл можуть бути з'єднані, щонайменше, з частиною константної області антитіла людини. Вибір константної області залежить від бажаного ефекту будь-то антитілозалежна клітинно-опосередкована цитотоксичність (АЗКЦ), антитілозалежний клітинний фагоцитоз і/або залежна від комплементу цитотоксичність. Наприклад, ізотипи IgG1 і IgG3 людини можуть викликати залежну від комплементу цитотоксичність, а ізотипи IgG2 і IgG4 людини - не можуть. IgG1 і IgG3 людини також індукують сильніші клітинно-опосередковані ефекторні функції, ніж IgG2 і IgG4 людини. Константними областями легкого ланцюга можуть бути лямбда або каппа.

[00239] Одна або декілька амінокислот на аміно- або карбоксикінці легкого і/або важкого ланцюга, така як С-кінцевий лізин важкого ланцюга, може бути відсутньою, або може утворювати похідне в пропорції, або бути у всіх молекулах. Заміни можуть бути зроблені в константних областях для зниження або посилення ефекторної функції, такої як комплемент-опосередкована цитотоксичність або АЗКЦ (див., наприклад, Winter et al., патент США № 5624821, Tso et al., патент США № 5834597 та Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 4005, 2006), або для збільшення періоду напіввиведення в людині (див., наприклад, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279: 6213, 2004). Типові заміни включають Gln в позиції 250 і/або Leu у позиції 428 (нумерація ЕС використовується в цьому параграфі для константної області) для збільшення періоду напіввиведення антитіла. Заміни в будь-якій або у всіх позиціях 234, 235, 236 і/або 237 зменшують спорідненість до рецепторів Fcγ, зокрема рецептора FcγRI (див., наприклад, US 6624821). Може бути використана аланінова заміна в позиціях 234, 235 і 237 людського IgG1 для зниження ефекторних функцій. Деякі антитіла мають заміни на аланін в позиціях 234, 235 і 237 IgG1 людини для зниження ефекторних функцій. Необов'язково, амінокислоти в позиціях 234, 236 і/або 237 в IgG2 людини замінені на аланін, а в позиції 235 - на глутамін (див., наприклад, US 5624821). У деяких антитілах використовується мутація в одній або декількох позиціях 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 і 331 за нумерацією ЕС IgG1 людини. У деяких антитілах використовується мутація в одній або декількох позиціях 318, 320 і 322 за нумерацією ЕС IgG1 людини. У деяких антитілах в позиціях 234 і/або 235 амінокислота заміщена аланіном, і/або в позиції 329 заміщена гліцином. У деяких антитілах, в позиціях 234 і 235 амінокислоти заміщені на аланін, наприклад, в SEQ ID NO: 102. У деяких антитілах, ізотипом є IgG2 або IgG4 людини.

[00240] Ілюстративна константна область каппа-легкого ланцюга людини має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 104. N-кінцевий аргінін SEQ ID NO: 104 може бути опущений, і в цьому випадку константна область каппа-легкого ланцюга має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 105. Ілюстративна константна область важкого ланцюга IgG1 людини має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 101 (з або без С-кінцевого лізину). Антитіла можуть бути експресовані у вигляді тетрамерів, які містять два легких і два важких ланцюги, у вигляді окремих важких ланцюгів, легких ланцюгів, у вигляді Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> і Fv, або у вигляді одноланцюгових антитіл, в яких зрілі варіабельні домени важкого і легкого ланцюгів сполучені спейсером.

[00241] Константні області антитіла людини показують аллотипічну варіацію і ізоаллотипічну варіацію у різних індивідів, тобто константні області можуть відрізнятися у різних людей в одній або більше поліморфних позиціях. Ізоаллотипи відрізняються від аллотипів тим, що сироватки, які розпізнають ізоаллотип, зв'язуються з неполіморфною областю одного або декількох інших ізотипів. Так, наприклад, інша константна область важкого ланцюга відноситься до аллотипу G1m3 IgG1 і має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 103. Інша константна область важкого ланцюга аллотипу G1m3 IgG1 має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 102 (з або без С-кінцевого лізину). Відсилання до константної області антитіла людини включає константну область з будь-яким природним аллотипом або будь-якою перестановкою залишків, які займають позиції в природних аллотипах.

#### G. Експресія рекомбінантних антитіл

[00242] Відомий ряд способів продукування химерних і гуманізованих антитіл з використанням клітинної лінії, яка експресує антитіла (наприклад, гібридоми). Наприклад, імуноглобулінові варіабельні області антитіла можуть бути клоновані і секвеновані з використанням добре відомих способів. В одному способі, варіабельну область VH важкого ланцюга клонують за допомогою RT-PCR, з використанням мРНК, отриманої з клітин гібридоми. Консенсусні праймери застосовують до лідерного пептиду VH-області, охоплюючи кодон ініціації трансляції за допомогою 5'-праймера, і константні області g2b за допомогою 3'-праймера. Ілюстративні праймери описані в публікації патента США 2005/0009150 Шенком і співавторами (далі «Шенк»). Послідовності з декількох незалежно отриманих клонів можна порівняти для того, щоб гарантувати, що під час ампліфікації не будуть внесені зміни.

Послідовність області VH також може бути визначена або підтверджена шляхом секвенування фрагмента VH, отриманого за допомогою 5'-RACE RT-PCR-методики і 3'-g2b-специфічного праймера.

[00243] Аналогічним чином можна клонувати варіабельну область VL легкого ланцюга. В одному підході, набір консенсусних праймерів призначений для ампліфікації областей VL використовуючи 5'-праймер, спроектований для гібридизації з областю VL, яка включає кодон ініціації трансляції, і використовуючи 3'-праймер, специфічний до області C<sub>k</sub> нижче від V-J об'єднуючої області. В іншому підході, використовується 5'RACE RT-PCR методика для клонування кодуєчої VL кДНК. Ілюстративні праймери описані в Шенк, див. вище. Згодом клоновані послідовності об'єднують з послідовностями, які кодують константні області людини (або інших нелюдських видів). Ілюстративні послідовності, які кодують константні області антитіла людини, включають SEQ ID NO: 106, яка кодує константну область IgG1 людини (SEQ ID NO: 103) і SEQ ID NO: 107 і 108, які кодують константні області каппа-легкого ланцюга людини (SEQ ID NO: 104 і 105 відповідно).

[00244] В одному з підходів, варіабельні області важкого і легкого ланцюгів реконструюють для того, щоб вони кодували з'єднані донорні послідовності після відповідних з'єднань VDJ або VJ, і клонують у вектор для експресії в клітинах ссавців, такий як pCMV-hy1 для важкого ланцюга, і pCMV-McI для легкого ланцюга. Ці вектори кодують константні області γ1 і C<sub>k</sub> людини як екзонні фрагменти після вставленої касети з варіабельною областю. Після перевірки послідовності, вектори експресії з важким ланцюгом і легким ланцюгом можуть бути спільно трансфіковані в клітини CHO для того, щоб продукувати химерні антитіла. Середовище, частково використане клітинами, збирають через 48 годин після трансфекції і аналізують Вестерн-блот-аналізом на продукування антитіл, або ELISA на зв'язування антигену. Химерні антитіла гуманізовані, як описано вище.

[00245] Химерні, веніровані, гуманізовані і людські антитіла зазвичай продукують за допомогою рекомбінантної експресії. Рекомбінантні полінуклеотидні конструкції зазвичай містять послідовність контролю експресії, функціонально зв'язану з послідовностями, які кодують ланцюги антитіла, включаючи природні або гетерологічні елементи контролю експресії, такі як промотор. Послідовності контролю експресії можуть бути промоторними системами у векторах, здатних трансформувати або трансфікувати еукаріотичні або прокаріотичні клітини-господарі. Одразу як вектор був поміщений у відповідного господаря, господаря підтримують в умовах, які є підходящими для експресії нуклеотидних послідовностей на високому рівні, і збору, і очищення перехресно-реактивних антитіл.

[00246] Ці вектори експресії зазвичай реплікуються в організмах-господарях або у вигляді епісом, або як невід'ємна частина хромосомної ДНК господаря. Зазвичай вектори експресії містять маркери селекції, наприклад, резистентність до ампіциліну або стійкість до пігроміцину для того, щоб можна було виявити ті клітини, які були трансформовані бажаними послідовностями ДНК.

[00247] E. coli є одним прокаріотичним господарем, корисним для експресії антитіл, зокрема фрагментів антитіл. Мікроби, такі як дріжджі, також корисні для експресії. Saccharomyces є дріжджовим господарем з відповідними векторами, які мають послідовності контролю експресії, точку початку реплікації, послідовності термінації транскрипції, тощо за бажанням. Типові промотори включають 3-фосфогліцераткіназу та інші гліколітичні ферменти. Індукційні дріжджові промотори включають, серед інших, промотори з алкогольдегідрогенази, ізоцитохрома C і ферментів, відповідальних за використання мальтози і галактози.

[00248] Клітини ссавців можуть бути використані для експресії нуклеотидних сегментів, які кодують імуноглобуліни або їх фрагменти. Див. Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, Нью-Йорк, 1987). Був створений ряд відповідних ліній клітин-господарів, здатних секретувати інтактні гетерологічні білки, і вони включають клітинні лінії CHO, різні клітинні лінії COS, клітини HeLa, клітини HEK293, L-клітини і клітини мієломи, які не продукують антитіла, включаючи Sp2/0 і NS0. Клітини можуть бути нелюдськими. Експресуючі вектори для цих клітин можуть містити послідовності контролю експресії, такі як точку початку реплікації, промотор, енхансер (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)) та необхідні сайти обробки інформації, такі як сайти зв'язування рибосом, сайти сплайсингу РНК, сайти поліаденілювання, і послідовності які термінують транскрипцію. Послідовності, які контролюють експресію, можуть включати промотори, отримані з: ендегенних генів, цитомегаловірусу, SV40, аденовірусу, бичачого папіломавірусу і тому подібних. Дивіться Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992).

[00249] Альтернативно, послідовності, які кодують антитіла, можуть бути внесені в трансгени для введення в геном трансгенної тварини і наступної експресії в молоці трансгенної тварини (див., наприклад, патент США № 5741957; США № 5304489; і США № 5849992). Відповідні

трансгени містять кодуєчі послідовності легких і/або важких ланцюгів, функціонально зв'язані з промотором і енхансером зі специфічного гена молочної залози, такого як казеїн або бета-лактоглобулін.

[00250] Вектори, які містять сегменти ДНК інтересу, можуть бути перенесені в клітину-господаря способами, які залежать від типу клітинного господаря. Наприклад, трансфекція за допомогою хлориду кальцію зазвичай використовується для прокариотичних клітин, тоді як обробка фосфатом кальцію, електропорація, ліпофекція, біолістика або трансфекція на основі вірусів можуть застосовуватися до інших клітинних господарів. Інші способи, які використовуються для трансформації клітин ссавців, включають використання полібрена, злиття протопластів, ліпосоми, електропорації і мікроін'єкції. Для отримання трансгенних тварин, трансгени можуть бути внесені мікроін'єкцією в запліднені ооцити, або можуть бути внесені в геном ембріональних стовбурових клітин, а ядра таких клітин перенесені в позбавлені від ядер ооцити.

[00251] Після введення вектора(-ів), який кодує важкі і легкі ланцюги антитіла, в культуру клітин, клітинні пули можна перевірити на зростання продуктивності і якість продукту в безсироватковому середовищі. Топ-продукуючі пули клітин потім можуть бути піддані поклітинному клонуванню на основі FACS для створення моноклональних ліній. Можуть використовуватися специфічні врожайності вище 50 пг або 100 пг на клітину в день, які відповідають титрам продукту більше 7,5 г на л культури. Антитіла, продуковані клонами однієї клітини, також можуть бути протестовані на мутність, фільтраційні властивості, можуть бути проведені PAGE, IEF, УФ сканування, HP-SEC, картування вуглеводів-олігосахаридів, мас-спектрометрія та аналіз зв'язування, такий як ELISA або Bioscore. Обраний клон згодом може бути перенесений в кілька флаконів і збережений в замороженому вигляді для подальшого використання.

[00252] Після експресії, антитіла можуть бути очищені відповідно до стандартних процедур в даній області техніки, включаючи захоплення білком А, очищення ВЕРХ, колонкову хроматографію, гель-електрофорез, тощо (див., в цілому, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, Нью-Йорк, 1982)).

[00253] Може бути використана методика комерційного виробництва антитіл, включаючи оптимізацію кодонів, підбір промоторів, вибір елементів транскрипції, вибір термінаторів, клонування з однієї клітини без сироватки, створення стоку клітин, використання маркерів відбору для ампліфікації кількості копій, термінатора CHO, або поліпшення титрів білка (див., наприклад, US 5786464, US 6114148, US 6063598, US 7569339, W02004/050884, W02008/012142, W02008/012442, W02005/019442, W02008/107388, W02009/027471 і US 5888809).

Н. Скринінгові дослідження антитіла

[00254] Антитіла можуть піддаватися декільком дослідженням, включаючи дослідження зв'язування, дослідження функціональності, дослідження на тваринах моделях захворювань, пов'язаних з відкладеннями TTR, і клінічні випробування. Дослідження зв'язування тестують специфічне зв'язування і, необов'язково, афінність і специфічність до епітопів, з мономерним TTR або його фрагментом. Наприклад, в аналізах зв'язування можуть піддавати скринінгу антитіла, які зв'язуються з амінокислотними залишками 89-97 (SEQ ID NO: 113) TTR, які є епітопом, що занурений в нативному тетрамері TTR, і є експонованим в мономерній, неправильно згорнутій, агрегованій або фібрильній формах TTR. Антитіла також можуть бути піддані скринінгу на здатність зв'язувати пре-фібрилярні, ненативні конформації TTR і амілоїдні фібрили TTR, але не нативні конформації TTR. Наприклад, антитіла можуть бути піддані скринінгу на здатність зв'язуватися з мономерними формами TTR, створеними шляхом дисоціації або дезагрегації нативного тетрамерного TTR, і можуть бути в той же час піддані скринінгу проти нативного тетрамерного TTR, як описано в прикладах, або іншим чином. Аналогічно, антитіла також можуть бути піддані скринінгу на їх імунореактивність до тканини, схильної до TTR-опосередкованого амілоїдозу, але не до здорової тканини. Такі дослідження іноді проводять разом конкурентним ілюстративним антитілом, таким як антитіло, яке має варіабельні області 9D5 або 14G8 (ізотип каппа IgG1). Необов'язково, в такому аналізі іммобілізують або антитіло, або TTR-мішень.

[00255] Дослідження функціональності можуть бути виконані в клітинних моделях, включаючи клітини, які природно експресують TTR, або клітини трансфіковані ДНК, що кодує TTR або його фрагмент. Відповідні клітини включають клітини, отримані з серцевої тканини або інших тканин, уражених TTR амілоїдогенезом. Клітини можуть бути піддані скринінгу на знижені рівні мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR (наприклад, шляхом Вестерн-блоттингу, або шляхом імунопреципітації клітинних екстрактів або

супернатантів) або на знижену токсичність, приписувану мономерній, неправильно згорнутій, агрегованій або фібрильній формам TTR. Наприклад, антитіла можуть бути протестовані на здатність пригнічувати або зменшувати агрегацію TTR, пригнічувати або зменшувати утворення фібрил TTR, зменшувати відкладення TTR, видаляти агрегований TTR або стабілізувати нетоксичні конформації TTR.

[00256] Можуть бути виконані в розчині інші функціональні аналізи, такі як перевірка того, чи здатне антитіло порушувати або зменшувати утворення фібрил TTR, коли мономерний TTR або проміжні форми неправильно згорнутого TTR в розчині контактують з антитілом. Ступінь утворення фібрил може бути досліджений вимірами каламутності, наприклад, при 400 нм на УФ-детектуючому спектрометрі, який оснащений блоком управління температурою. Також може бути використаний тіофлавін-Т для оцінки ступеня формування амілоїдних фібрил. Наприклад, п'ятикратний молярний надлишок тіофлавіна-Т можна додати до зразків TTR і залишити їх при кімнатній температурі на 30 хвилин перед проведенням вимірювань. Флюоресценцію тіофлавіна-Т можна спостерігати за допомогою спектрофлуориметра. Дивіться US 2014/0056904.

[00257] Дослідження із застосуванням тваринних моделей тестують спроможність антитіла до терапевтичного або профілактичного лікування ознак або симптомів на тваринній моделі, яка моделює хворобу людини, пов'язану з накопиченням TTR або відкладеннями TTR. До таких захворювань належать типи TTR амілоїдозу, такі як старечий системний амілоїдоз (SSA - senile systemic amyloidosis), старечий серцевий амілоїдоз (SCA - senile cardiac amyloidosis), сімейна амілоїдна поліневропатія (FAP - familial amyloid polyneuropathy), сімейна амілоїдна кардіоміопатія (FAC - familial amyloid cardiomyopathy) і селективний амілоїдоз центральної нервової системи (CNSA - central nervous system selective amyloidosis). Відповідними ознаками або симптомами, які можна спостерігати, є присутність і кількість амілоїдних відкладень в різних тканинах, таких як шлунково-кишковий тракт або серце. Ступінь зниження кількості амілоїдних відкладень можна визначити порівнянням з відповідним контролем, таким як рівень відкладень TTR амілоїду у контрольних тварин, які отримали контрольне антитіло (наприклад, контрольне антитіло з підібраним ізотипом), плацебо або зовсім не отримували лікування. Ілюстративна тваринна модель для тестування активності проти TTR амілоїдозу являє собою мишачу модель, яка несе нуль-мутацію в ендегенному локусі Ttr миші і людський мутантний ген TTR, який містить мутацію V30M, яка пов'язана з сімейною амілоїдною поліневропатією. Дивіться, наприклад, Kohno et al., Am. J. Path. 150(4):1497-1508 (1997); Cardoso and Saraiva, FASEB J 20(2):234-239 (2006). Також існують подібні моделі, які включають інші моделі сімейних варіантів TTR амілоїдозу і моделі для спорадичних варіантів TTR амілоїдозу. Див., наприклад, Teng et al., Lab. Invest. 81(3): 385-396 (2001); Ito and Maeda, Mouse Models of Transthyretin Amyloidosis, in Recent Advances in Transthyretin Evolution, Structure, and Biological Functions, pp. 261-280 (2009) (Springer Berlin Heidelberg). Трансгенні тварини можуть містити людський трансген TTR, такий як трансген TTR з мутацією, асоційованою з TTR амілоїдозом, або трансгени TTR дикого типу. Для того, щоб полегшити тестування на тваринних моделях, можна використовувати химерні антитіла, які мають константну область, яка підходить для тваринної моделі (наприклад, химерні антитіла миша-щур можна використовувати для тестування антитіл на щурах). Можна зробити висновок, що гуманізована версія антитіла буде ефективною, якщо відповідне антитіло миші або химерне антитіло буде ефективним у відповідній тваринній моделі, і гуманізоване антитіло має подібну афінність зв'язування (наприклад, в межах експериментальної похибки, наприклад, при коефіцієнті 1,5, 2 або 3).

[00258] Клінічні випробування досліджують безпеку і ефективність для людини, яка має захворювання, яке пов'язане з TTR амілоїдозом.

#### I. Нуклеїнові кислоти

[00259] У винаході додатково запропоновані нуклеїнові кислоти, які кодують будь-який з важких і легких ланцюгів, описаних вище (наприклад, SEQ ID NO: 40, 42, 44-56, 87, 89, 91-96 і 106-108). Необов'язково, такі нуклеїнові кислоти додатково кодують сигнальний пептид і можуть бути експресовані з сигнальним пептидом, сполученим з константною областю (наприклад, сигнальні пептиди, які мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 41 і 88 (важкий ланцюг) і 43 і 90 (легкий ланцюг), які можуть кодуватися відповідно SEQ ID NOS: 40 і 87 (важкий ланцюг) і відповідно 42 і 89 (легкий ланцюг)). Кодуючі нуклеотидні послідовності можуть бути функціонально зв'язані з регуляторними послідовностями для забезпечення експресії кодуючих послідовностей, такими як промотор, енхансер, сайт зв'язування рибосом, сигнал термінації транскрипції тощо. Нуклеїнові кислоти, які кодують важкі і легкі ланцюги, можуть бути у виділеній формі або можуть бути клоновані в один або кілька векторів. Нуклеїнові кислоти можуть бути синтезовані, наприклад, шляхом твердофазного синтезу або ПЛР з

олігонуклеотидами які перекриваються. Нуклеїнові кислоти, які кодують важкі і легкі ланцюги, можуть бути з'єднані у вигляді однієї суцільної нуклеїнової кислоти, наприклад, всередині вектора експресії або можуть бути роздільними, наприклад, кожна клонована в свій власний вектор експресії.

#### 5 J. Кон'юговані антитіла

[00260] Кон'юговані антитіла, які специфічно зв'язуються з антигенами, експонованими в патогенних формах TTR, але не в нативних тетрамерних формах TTR, такими як амінокислотні залишки 89-97 (SEQ ID NO: 113) TTR, корисні для: виявлення присутності мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR; спостереження і оцінки ефективності терапевтичних засобів, які використовуються для лікування пацієнтів з діагнозом TTR амілоїдоз; інгібування або зниження агрегації TTR; інгібування або зменшення формування фібрил TTR; зменшення кількості або видалення відкладень TTR; стабілізації нетоксичних конформацій TTR; або лікування або здійснення профілактики TTR амілоїдозу у пацієнта. Наприклад, такі антитіла можуть бути кон'юговані з іншими терапевтичними фрагментами, іншими білками, іншими антитілами і/або мітками, які можна виявити. Дивіться WO 03/057838; US 8455622.

[00261] Кон'югованими терапевтичними фрагментами можуть бути будь-які речовини, які можуть бути використані для лікування, боротьби, поліпшення, запобігання або поліпшення небажаного стану або перебігу захворювання у пацієнта, наприклад, TTR амілоїдозу. Терапевтичні речовини можуть включати, наприклад, імунomodulatory або будь-які біологічно активні речовини, які стимулюють або посилюють активність антитіла. Імунomodulatory може бути будь-яка речовина, яка стимулює або пригнічує розвиток або підтримку імунологічної відповіді. Якщо такі терапевтичні фрагменти з'єднані з антитілом, специфічним до мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR, таким як описані в цьому документі антитіла, то приєднані терапевтичні фрагменти матимуть специфічну афінність до чужорідних патогенних форм TTR в порівнянні з нативними тетрамерними формами TTR. Отже, введення кон'югованих антитіл безпосередньо впливає на тканини, які містять патогенні форми TTR, з мінімальним пошкодженням навколишньої нормальної здорової тканини. Це може бути особливо корисно для терапевтичних компонентів, які є занадто токсичними для введення самих по собі. Крім того, можна використовувати меншу кількість терапевтичних речовин.

[00262] Приклади відповідних терапевтичних фрагментів включають лікарські засоби, які знижують рівні TTR, стабілізують нативну тетрамерну структуру TTR, інгібують агрегацію TTR, руйнують фібрили TTR або заважають утворенню амілоїду, або протидіють токсичності для клітини. Дивіться, наприклад, Almeida and Saraiva, FEBS Letters 586:2891-2896 (2012); Saraiva, FEBS Letters 498:201-203 (2001); Ando et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013); Ruberg and Berk, Circulation 126:1286-1300 (2012); і Johnson et al., J. Mol. Biol. 421(2-3):185-203 (2012). Наприклад, антитіла можуть бути кон'юговані з тафамідом, діфлуніазом, ALN-TTR01, ALN-TTR02, ISIS-TTRRx, доксицикліном (doxy), таурорсодезоксихолевою кислотою (TUDCA), Doxy-TUDCA, галлатом епігаллокатехіна (EGCG), куркуміном або ресвератролом (3,5, 4'-тригідроксистільбеном). Інші репрезентативні терапевтичні фрагменти включають інші речовини, які, як відомо, корисні для лікування, контролю або поліпшення TTR амілоїдозу або симптомів TTR амілоїдозу. Див., наприклад, Ando et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013) для загальновідомих клінічних симптомів TTR амілоїдозу і типових речовин, які використовуються для лікування таких симптомів.

[00263] Антитіла також можуть бути з'єднані з іншими білками. Наприклад, антитіла можуть бути з'єднані з файномерами (Fynomers). Файномери представляють собою невеликі зв'язуючі білки (наприклад, 7 кДа), отримані з людського домену Fyn SH3. Вони можуть бути стабільними і розчинними, і вони можуть бути позбавлені цистеїнових залишків і дисульфідних зв'язків. Файномери можуть бути сконструйовані для зв'язування з молекулами-мішенями з тієї ж афінністю і специфічністю, що й антитіла. Вони підходять для створення мультиспецифічних гібридних білків на основі антитіл. Наприклад, файномери можуть бути злиті з N-кінцевими і/або C-кінцевими кінцями антитіл для створення бі- і триспецифічних файномерних антитіл (FynomAb) з різними структурами. Файномери можуть бути підібрані з використанням бібліотек файномерів, за допомогою технології скринінгу із застосуванням FACS, Bioscore і клітинних аналізів, які дозволяють ефективно вибирати файномери з оптимальними властивостями. Приклади файномерів описані в Grabulovski et al., J. Biol. Chem. 282:3196-3204 (2007); Bertschinger et al., Protein Eng. Des. Sel. 20:57-68 (2007); Schlatter et al., MAbs. 4:497-508 (2011); Banner et al., Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 69(Pt6):1124-1137 (2013); і Brack et al., Mol. Cancer Ther. 13:2030-2039 (2014).

[00264] Зазначені в цьому документі антитіла також можуть бути з'єднані або кон'юговані з

одним або декількома іншими антитілами (наприклад, для утворення гетерокон'югатів антитіл). Такі інші антитіла можуть зв'язуватися з різними епітопами в межах TTR або його частини, або можуть зв'язуватися з іншим цільовим антигеном.

[00265] Антитіла також можуть бути з'єднані з міткою, яку можна виявити. Такі антитіла можуть бути використані, наприклад, для діагностики TTR амілоїдозу, для моніторингу прогресування TTR амілоїдозу і/або для оцінки ефективності лікування. Такі антитіла особливо корисні для виконання таких визначень у суб'єктів, які схильні до або можуть бути схильні до TTR амілоїдозу, або у відповідних біологічних зразках, отриманих від таких суб'єктів. Типові мітки детекції, які можуть бути приєднані або причеплені до антитіла, включають: різні ферменти, такі як пероксидаза хрому, лужна фосфатаза, бета-галактозидаза або ацетилхолінестераза; протезні групи, такі як стрептавідин/біотин і авідин/біотин; флуоресцентні матеріали, такі як зонтиліферон, флуоресцеїн, ізотіоціанат флуоресцеїну, родамін, дихлортриазініламін флуоресцеїн, дансілхлорид або фікоеритрин; люмінесцентні матеріали, такі як люмінол; біолюмінесцентні матеріали, такі як люцифераза, люциферин і аекорін; радіоактивні матеріали, такі як іттрій<sup>90</sup> (90Y), радіосрібло-111, радіосрібло-199, вісмут<sup>213</sup>, йод (<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I), вуглець (<sup>14</sup>C), сірка (<sup>35</sup>S), тритій (<sup>3</sup>H), індій (<sup>115</sup>In, <sup>113</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In), технецій (<sup>99</sup>Tc), талій (<sup>201</sup>Tl), галій (<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), паладій (<sup>103</sup>Pd), молибден (<sup>99</sup>Mo), ксенон (<sup>133</sup>Xe), фтор (<sup>18</sup>F), <sup>153</sup>Sm, <sup>177</sup>Lu, <sup>159</sup>Gd, <sup>149</sup>Pm, <sup>140</sup>La, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>47</sup>Sc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>142</sup>Pr, <sup>105</sup>Rh, <sup>97</sup>Ru, <sup>68</sup>Ge, <sup>57</sup>Co, <sup>65</sup>Zn, <sup>85</sup>Sr, <sup>32</sup>P, <sup>153</sup>Gd, <sup>169</sup>Yb, <sup>51</sup>Cr, <sup>54</sup>Mn, <sup>75</sup>Se, <sup>113</sup>Sn, и <sup>117</sup>Tin; позитрон-випромінюючі метали з використанням різних позитронно-емісійних томографій; нерадіоактивні парамагнітні іони металів; і молекули, які радіоактивно мічені або кон'юговані з певними радіоізотопами.

[00266] Зв'язування радіоізоотопів з антитілами може бути виконано з використанням звичайних біфункціональних хелатів. Для приєднання радіосрібла-111 і радіосрібла-199 можна використовувати лінкери на основі сірки. Дивіться Hazra et al., Cell Biophys. 24-25: 1-7 (1994). Приєднання радіоізоотопів срібла може включати відновлення імуноглобуліну за допомогою аскорбінової кислоти. Для радіоізоотопів, таких як <sup>111</sup>In і <sup>90</sup>Y, можна використовувати ірітрімомаб-тіуксетан, і воно буде реагувати з такими ізотопами з утворенням <sup>111</sup>In-ірітрімомаб-тіуксетана і <sup>90</sup>Y-ірітрімомаб-тіуксетана, відповідно. Дивіться Witzig, Cancer Chemother. Pharmacol., 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

[00267] Терапевтичні фрагменти, інші білки, інші антитіла і/або мітки детекції можуть бути з'єднані або кон'юговані, прямо, або непрямо через посередник (наприклад, лінкер) з антитілом за цим винаходом. Дивіться, наприклад, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985); і Thorpe et al., Immunol. Rev., 62:119-58 (1982). Придатні лінкери включають, наприклад, лінкери які відщеплюються і невідщеплюються. Можна застосовувати різні лінкери, які вивільняють приєднані терапевтичні фрагменти, білки, антитіла і/або мітки детекції в кислотних або відновлювальних умовах, при впливі специфічних протеаз або в інших певних умовах.

#### V. Терапевтичні застосування

[00268] Вищевказані антитіла можуть бути використані для лікування або здійснення профілактики захворювання у пацієнта, який має або схильного до ризику захворювання, опосередкованого, щонайменше частково, транстиретином (TTR) і, зокрема, мономерною, неправильно згорнутою, агрегованою або фібрильною формами TTR. Хоча розуміння механізмів не є потрібним для практики, вважається, що будь-який або всі з наступних механізмів можуть сприяти лікуванню TTR амілоїдозу з використанням вищевказаних антитіл: опосередковане антитілом інгібування агрегації і утворення фібрил TTR, опосередкована антитілом стабілізація нетоксичних конформацій TTR (наприклад, тетрамерних форм), або опосередкований антитілом кліренс агрегованого TTR, олігомерного TTR або мономерного TTR. Антитіло-лікарські кон'югати можуть мати додаткові механізми дії, обумовлені кон'югованим фрагментом.

[00269] Антитіла вводять ефективною схемою, яка позначає дозування, спосіб введення та частоту введення, яка затримує початок прояву симптомів, зменшує тяжкість захворювання, уповільнює подальше погіршення і/або покращує щонайменше одну ознаку або симптом розладу, що піддається лікуванню. Якщо пацієнт вже страждає від розладу, схему можна

позначити як терапевтично-ефективна схема. Якщо пацієнт піддається підвищеному ризику захворювання в порівнянні із загальною популяцією, але ще не відчуває симптомів, схему можна назвати профілактично-ефективною схемою. У деяких випадках можна спостерігати терапевтичну або профілактичну ефективність у окремого пацієнта в порівнянні з історичними

контролями або минулим досвідом у того ж пацієнта. В інших випадках терапевтична або профілактична ефективність може бути продемонстрована в доклінічному або клінічному дослідженні на популяції пацієнтів, які отримували лікування, в порівнянні з контрольною популяцією необроблених пацієнтів.

[00270] Частота введення залежить від періоду напіввиведення антитіла з кровообігу, стану пацієнта і шляху введення серед інших чинників. Частота може бути щоденною, щотижневою, щомісячною, щоквартальною або з нерегулярними інтервалами у відповідь на зміни стану пацієнта або прогресування розладу, який лікується. Ілюстративна частота внутрішньовенного введення знаходиться між щотижневою і щоквартальною при безперервному курсі лікування, хоча також можливе більш або менш часте дозування. Для підшкірного введення ілюстративна частота дозування становить від щоденної до щомісячної, хоча можливе більш або менш часте дозування.

[00271] Кількість доз які вводяться залежить від того, чи є захворювання гострим або

хронічним, а також відповіді розладу на лікування. При гострих розладах або гострих загостреннях хронічного розладу часто буває досить від 1 до 10 доз. Іноді однієї болюсної дози, необов'язково у вигляді розділеної дози, досить для гострого розладу або гострого загострення хронічного розладу. Лікування може повторюватися для рецидивів гострого розладу або гострого загострення. При хронічних захворюваннях антитіло можна вводити через регулярні проміжки часу, наприклад, щотижня, раз на два тижні, щомісяця, щокварталу, кожні шість місяців впродовж щонайменше 1, 5 або 10 років, або впродовж життя пацієнта.

VI. Фармацевтичні композиції і способи їх застосування

[00272] В цьому документі наведено кілька способів діагностики, моніторингу, лікування або здійснення профілактики захворювань або станів, опосередкованих, щонайменше частково, транстиретином (TTR) і, зокрема, мономерною, неправильно згорнутою, агрегованою або фібрильною формами TTR (наприклад, TTR амілоїдоз). Приклади таких захворювань включають сімейні TTR амілоїдоз, такі як сімейна амілоїдна кардіоміопатія (FAC), сімейна амілоїдна поліневропатія (FAP), або селективний амілоїдоз центральної нервової системи (CNSA), і спорадичні амілоїдоз TTR, такі як старечий системний амілоїдоз (SSA) або старечий серцевий амілоїдоз (SCA). Антитіла, описані вище, можуть бути включені в фармацевтичну композицію для використання в таких способах. В цілому, як правило, антитіло або фармацевтичну композицію, яка містить антитіло, вводять суб'єкту, який цього потребує. Пацієнти, які піддаються лікуванню, включають індивідів з ризиком TTR амілоїдозу, але не проявляють симптомів, а також пацієнтів, які в цей час проявляють симптоми. Деяких пацієнтів можна лікувати під час продромальної стадії TTR амілоїдозу.

[00273] Фармацевтичні композиції можна вводити профілактично особам, які мають відомий генетичний ризик TTR амілоїдозу. До таких осіб належать ті, у кого є родичі, які зазнали такого захворювання, і ті, чий ризик визначається аналізом генетичних або біохімічних маркерів (наприклад, мутацій в TTR, пов'язаних з TTR амілоїдозом), включаючи використання діагностичних методів, представлених в цьому документі. Наприклад, в гені, який кодує TTR, є більше 100 мутацій, які залучені до TTR амілоїдозу. Дивіться, наприклад, US 2014/0056904; Saraiva, Hum. Mutat. 17(6):493-503 (2001); Damas and Saraiva, J. Struct. Biol. 130:290-299; Dwulet and Benson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 114:657-662 (1983).

[00274] Індивіди, які страждають від TTR амілоїдозу можуть іноді бути розпізнані за клінічними проявами TTR амілоїдозу, включаючи один або декілька з наступних: 1) сімейний анамнез невропатичного захворювання, особливо пов'язаного з серцевою недостатністю; 2) невропатична біль або прогресуючі сенсорні порушення невідомої етіології; 3) синдром кистьового тунелю без очевидної причини, особливо якщо він двосторонній і вимагає хірургічного усунення; 4) порушення моторики шлунково-кишкового тракту або дисфункція автономної нервової системи невідомої етіології (наприклад, еректильна дисфункція, ортостатична гіпотензія, нейрогенний голод); 5) серцева хвороба, яка характеризується потовщеними стінками шлуночків за відсутності гіпертонії; 6) розширений з невідомих причин атрио-вентрикулярний блок, особливо коли він супроводжується потовщеним серцем; 6b) включення в склоподібному тілі за типом вати. Дивіться Ando et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013). Остаточний діагноз TTR амілоїдозу зазвичай опирається на біопсію органів-мішеней з наступним гістологічним фарбуванням вирізаної тканини за допомогою специфічного до амілоїду барвника Congo red. Якщо спостерігається позитивний результат на

амілоїд, згодом проводиться імуногістохімічне фарбування для TTR, щоб гарантувати, що білок-попередник, відповідальний за утворення амілоїду, дійсно є TTR. Для сімейних форм захворювань, необхідно продемонструвати мутацію в гені, який кодує TTR, до постановки остаточного діагнозу.

5 [00275] Ідентифікація суб'єкта може відбуватися в клінічній обстановці або в іншому місці, такому як будинок суб'єкта, наприклад, за допомогою використання суб'єктом власного набору для самоперевірки. Наприклад, суб'єкт може бути ідентифікований на основі різних симптомів, таких як периферична невропатія (сенсорна і моторна), вегетативна невропатія, шлунково-кишкові порушення, кардіоміопатія, нефропатія або відкладення в очах. Дивіться Ando et al.,  
10 Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013). Суб'єкт також може бути ідентифікований за підвищеними рівнями ненативних форм TTR в зразках плазми, отриманих від суб'єкта, в порівнянні з контрольними зразками, як описано в прикладах.

[00276] Згідно з сімейною історією, генетичним тестуванням або медичним скринінгом на TTR амілоїдоз, лікування може бути розпочато в будь-якому віці (наприклад, 20, 30, 40, 50, 60  
15 або 70 років). Лікування зазвичай тягне за собою багаторазове дозування впродовж певного періоду часу і може контролюватися шляхом аналізу антитіл, або активованих відповідей Т-клітин або В-клітин на терапевтичну речовину (наприклад, усічену форму TTR, яка містить амінокислотні залишки 89-97) з плином часу. Якщо відповідь спадає, є потрібною підсилююча її доза.

20 [00277] У профілактичних цілях антитіло або його фармацевтичну композицію вводять суб'єкту, сприйнятливому до захворювання або схильному до ризику захворювання (наприклад, TTR амілоїдозу), схемою (доза, частота і спосіб введення), ефективною для того, щоб зменшити ризик, знизити тяжкість або затримати початок прояву щонайменше однієї ознаки або симптому захворювання. У терапевтичних цілях антитіло, або імуноген для індукції антитіла, вводять  
25 суб'єкту, який підозрюється в наявності хвороби або вже страждає від хвороби (наприклад, TTR амілоїдозу), схемою (доза, частота і спосіб введення), ефективною для того, щоб поліпшити або, щонайменше, перешкодити подальшому погіршенню, щонайменше, однієї ознаки або симптому захворювання.

[00278] Схема вважається терапевтично або профілактично ефективною, якщо окремих суб'єкт, який пройшов лікування, досягає більш успішного результату, ніж середній результат в контрольній популяції порівнюваних суб'єктів, які не пройшли лікування описаними в цьому документі способами, або якщо демонструється більш успішний результат для схеми у суб'єктів, які пройшли лікування, у порівнянні з контрольними суб'єктами в контрольованому клінічному дослідженні (наприклад, фаза II, фаза II/III або фаза III дослідження), або у тваринній моделі на рівні  $p < 0,05$  або 0,01, або навіть 0,001.

[00279] Ефективна схема лікування антитілом може бути використана, наприклад, для: пригнічення або зменшення агрегації TTR у суб'єкта, який має або який знаходиться під ризиком набути стан, пов'язаний з накопиченням TTR; інгібування або зменшення утворення фібрил TTR у суб'єкта, який має або який знаходиться під ризиком набути стан, пов'язаний з накопиченням TTR; зменшення кількості або видалення відкладень TTR, або агрегованого TTR у суб'єкта, який має або який знаходиться під ризиком набути стан, пов'язаний з накопиченням TTR; стабілізації нетоксичних конформацій TTR у суб'єкта, який має або який знаходиться під ризиком набути стан, пов'язаний з накопиченням TTR; інгібування токсичних ефектів агрегатів, фібрил або відкладень TTR у суб'єкта, який має або який знаходиться під ризиком набути стан, пов'язаний з накопиченням TTR; діагностування наявності або відсутності накопичення TTR амілоїдів в тканині, яка ймовірно містить накопичення амілоїду; визначення кількості відкладень TTR у суб'єкта шляхом виявлення наявності зв'язаного антитіла у суб'єкта після введення антитіла; виявлення присутності мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR у суб'єкта; моніторингу та оцінки ефективності терапевтичних засобів, які використовуються  
45 для лікування пацієнтів з діагнозом TTR амілоїдоз; індукування імунної відповіді, яка включає антитіла до TTR у суб'єкта; затримки початку стану, пов'язаного з накопиченням TTR амілоїду у суб'єкта; або лікування, або здійснення профілактики TTR амілоїдозу у пацієнта.

[00280] Ефективні дози варіюють в залежності від багатьох різних факторів, таких як спосіб введення, цільова локалізація, фізіологічний стан суб'єкта, незалежно від того, чи є суб'єкт людиною або твариною, інших ліків які вводяться, і чи є лікування профілактичним або терапевтичним.  
55

[00281] Ілюстративний діапазон доз для антитіл може становити близько 0,1-20, або 0,5-5 мг/кг маси тіла (наприклад, 0,5, 1, 2, 3, 4 або 5 мг/кг) або 10-1500 мг у вигляді фіксованої дози. Дозування залежить від стану пацієнта і реакції на попередній курс лікування, якщо такий є, чи є лікування профілактичним або терапевтичним і чи є захворювання гострим або хронічним,  
60



серед інших чинників.

[00282] Антитіло можна вводити в таких дозах щодня, в дні які чергуються, щотижня, раз в два тижні, щомісяця, щокварталу або відповідно до будь-якого іншого графіка, який визначається емпіричним аналізом. Ілюстративне лікування тягне за собою введення декількома дозами впродовж тривалого періоду, наприклад, щонайменше, впродовж шести місяців. Додаткові ілюстративні схеми лікування пов'язані з введенням один раз в два тижні або один раз в місяць або один раз кожні 3-6 місяців.

[00283] Антитіла можуть вводитися периферичним шляхом. Шляхи введення включають місцевий, внутрішньовенний, оральний, підшкірний, внутрішньоартеріальний, внутрішньочерепний, інтратекальний, внутрішньочеревний, інтраназальний або внутрішньом'язовий. Шляхи для введення антитіл можуть бути внутрішньовенними або підшкірними. Внутрішньовенне введення може бути реалізовано, наприклад, шляхом інфузії впродовж періоду, такого як 30-90 хв. Цей тип ін'єкцій найчастіше виконується в м'язи рук або ніг. У деяких способах речовини вводять безпосередньо в певну тканину, де накопичуються відкладення, наприклад, шляхом внутрішньочерепної ін'єкції.

[00284] Фармацевтичні композиції для парентерального введення можуть бути стерильними і, по суті, ізотонічними (250-350 мОсм/кг води), і виготовлятися в умовах ХПВ (хорошої практики виробництва, GMP - good manufacturing practice). Фармацевтичні композиції можуть бути представлені у вигляді одиничної дозованої форми (тобто дози для одного введення). Фармацевтичні композиції можуть бути складені з використанням одного або декількох фізіологічно прийнятних носіїв, розріджувачів, наповнювачів або допоміжних речовин. Склад залежить від обраного шляху введення. Для ін'єкцій, антитіла можуть бути приготовані у вигляді водних розчинів, наприклад, в фізіологічно сумісних буферах, таких як розчин Хенкса, розчин Рінгера, або фізіологічному сольовому розчині, або ацетатному буфері (щоб зменшити дискомфорт в місці ін'єкції). Розчин може містити допоміжні речовини, такі як суспендуючі, стабілізуючі і/або диспергуючі речовини. Альтернативно, антитіла можуть бути в ліофілізованій формі, для розведення перед використанням відповідним носієм, наприклад, стерильною апірогенною водою.

[00285] Схеми введення можуть бути скомбіновані зі схемами прийому інших засобів, ефективних при лікуванні або профілактиці захворювання, яке підлягає лікуванню. Такі речовини можуть включати siRNA для пригнічення експресії TTR, або Vyndaqel, стабілізатора TTR в тетрамерній формі.

[00286] Після лікування, стан суб'єкта може бути оцінений для визначення прогресу або ефективності такого лікування. Такі способи бажано перевіряють зміну кількості TTR амілоїду або кількості ненативних форм TTR. Наприклад, кількість TTR амілоїду може бути оцінена для визначення поліпшення, в порівнянні з кількостями TTR амілоїду у суб'єкта за таких же обставин до лікування. Кількості TTR амілоїду у суб'єкта також можуть порівнюватися з контрольними популяціями в співставних умовах. Контрольні популяції можуть складатися з однаково уражених суб'єктів, яких не лікували, або звичайних суб'єктів, яких не лікували (серед інших контрольних суб'єктів). Поліпшення в порівнянні з однаково ураженими суб'єктами, яких не лікували, або кількостями, які досягають або наближаються до таких звичайних суб'єктів, яких не лікували, вказує на позитивну відповідь на лікування.

[00287] Кількості TTR амілоїду можуть бути виміряні за допомогою ряду способів, включаючи методи візуалізації. Приклади придатних методів візуалізації включають ПЕТ-сканування за допомогою радіоактивно міченого TTR або його фрагментів, антитіл до TTR або їх фрагментів, речовин, які візуалізують амілоїд, в основі яких барвник Congo-red, таких як, наприклад, PIB (US 2011/0008255), амілоїд-візуалізуючий пептид p31 (біорозподіл амілоїд-візуалізуючого пептиду p31, корелює з кількісною оцінкою амілоїду на основі фарбування тканини Congo-red, Wall et al., Abstract No. 1573, 2011 ISNM Annual Meeting) та інших міток ПЕТ. Рівні ненативних форм TTR можуть бути виміряні, наприклад, шляхом аналізу ДСН-ПААГ-електрофорезу/Вестерн-блоттингу або плашковим аналізом Meso Scale Discovery з антитілами, описаними в цьому документі, на зразках плазми або зразках біопсії з суб'єкта, при порівнянні з контрольними зразками, як описано в прикладах.

А. Способи діагностики та моніторингу

[00288] Також запропоновані способи виявлення імунної відповіді проти TTR у пацієнта, який страждає на або схильний до захворювань, пов'язаних з відкладеннями TTR або патогенними формами TTR (наприклад, мономерними, неправильно згорнутими, агрегованими або фібрильними формами TTR). Способи можуть використовуватися для контролю курсу терапевтичного і профілактичного лікування за допомогою запропонованих тут речовин. Профіль антитіл після пасивної імунізації зазвичай показує безпосередній пік концентрації

антитіл з наступним експоненціальним руйнуванням. Без додаткової дози розпад наближається до рівнів які передували лікуванню, в межах періоду від кількох днів до кількох місяців в залежності від періоду напіввиведення введеного антитіла. Наприклад, період напіввиведення деяких антитіл людини становить близько 20 днів.

5 [00289] У деяких способах перед введенням проводять вимір вихідного рівня антитіла до TTR у суб'єкта, незабаром після цього проводиться другий вимір для визначення пікового рівня антитіла, і проводять один або кілька додаткових вимірів з інтервалами, для моніторингу зменшення кількості антитіла. Коли рівень антитіла знизився до вихідного рівня або заданого відсотка від піку менше базового рівня (наприклад, 50%, 25% або 10%), приписують введення  
10 додаткової дози антитіла. У деяких способах, пікові рівні або виміряні після них рівні менше базового, порівнюють з еталонними рівнями, визначеними до цього, щоб скласти доцільну профілактичну або терапевтичну схему лікування для інших пацієнтів. Якщо виміряний рівень антитілу значно менше еталонного рівня (наприклад, менше середнього мінус одне або, бажано, два стандартних відхилення еталонного значення в популяції суб'єктів, які отримують користь  
15 від лікування), приписують введення додаткової дози антитіла.

[00290] Також запропоновані способи виявлення мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої, або фібрильної форм TTR у суб'єкта, наприклад, шляхом вимірювання TTR амілоїду або патогенних форм TTR (наприклад, мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR). Такі способи корисні для діагностики або підтвердження  
20 діагнозу захворювань, пов'язаних з такими патогенними формами TTR (наприклад, TTR амілоїдозу) або сприйнятливості до них. Також можуть бути використані способи для безсимптомних суб'єктів. Наявність мономерних, неправильно згорнутих, агрегованих або фібрильних форм TTR вказує на сприйнятливості до майбутнього симптоматичного захворювання. Ці способи також корисні для спостереження за прогресуванням захворювання  
25 і/або відповіддю на лікування у пацієнтів, для яких раніше був діагностований TTR амілоїдоз.

[00291] Біологічні зразки, отримані від суб'єкта, підозрюваного в наявності або знаходженні під ризиком наявності TTR амілоїдозу, можуть бути приведені в контакт з антитілами, розкритими в цьому документі, для оцінки присутності мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR. Наприклад, рівні мономерної, неправильно згорнутої,  
30 агрегованої або фібрильної форм TTR у таких суб'єктів можна порівняти з рівнями, характерними для здорових людей. Альтернативно, рівні TTR амілоїду або патогенних форм TTR (наприклад, мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR) у таких суб'єктів, які отримують лікування через хворобу, можна порівняти з такими пацієнтів, які не лікувалися від TTR амілоїдозу. Деякі такі тести включають біопсію тканини, отриману від  
35 таких суб'єктів. Аналізи ELISA також можуть бути корисними способами, наприклад, для оцінки рівнів мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR в зразках рідини. Деякі такі аналізи ELISA включають застосування антитіл проти TTR, які бажано зв'язують мономерну, неправильно згорнуту, агреговану або фібрильну форми TTR відносно нормальних тетрамерних форм TTR.

40 [00292] Способи візуалізації in vivo можуть працювати шляхом введення реагенту, такого як антитіло, яке зв'язується з мономерною, неправильно згорнутою, агрегованою або фібрильною формами TTR в суб'єкті, а потім виявлення реагенту після того, як він зв'язався. Такі антитіла зазвичай зв'язуються з епітопом в межах залишків 89-97 TTR. При бажанні, реакції усунення можна уникнути використанням фрагментів антитіл, які не мають повнорозмірної константної області, таких як Fab. У деяких способах, одне і те ж антитіло може слугувати у якості як  
45 лікувального, так і діагностичного реагенту.

[00293] Діагностичні реагенти можуть бути введені в організм суб'єкта шляхом внутрішньовенної ін'єкції, або іншими шляхами, які вважаються розумними. Доза реагенту повинна бути в тих же межах, що і для способів лікування. Як правило, реагент мітять, хоча в  
50 деяких способах первинний реагент з афінністю до мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR є неміченим, а вторинний мічений реагент використовується для зв'язування з первинним реагентом. Вибір мітки залежить від способу виявлення. Наприклад, флуоресцентна мітка підходить для оптичного виявлення. Використання парамагнітних міток підходить для томографічного виявлення без хірургічного втручання.  
55 Радіоактивні мітки також можуть бути виявлені з використанням ПЕТ або ОФЕКТ (однофотонної емісійної комп'ютерної томографії).

[00294] Діагностика виконується шляхом порівняння кількості, розміру і/або інтенсивності помічених локусів з відповідними значеннями базової лінії. Значення базової лінії можуть являти собою середні рівні в популяції індивідів без захворювання. Значення базової лінії також  
60 можуть являти собою попередні рівні, визначені в одному і тому ж самому суб'єкті. Наприклад,

значення базової лінії можуть бути визначені у суб'єкта до початку лікування, а потім виміряні значення порівнюють зі значеннями базової лінії. Зниження значень відносно базової лінії зазвичай сигналізує про позитивну відповідь на лікування.

#### IX. Набори

[00295] У винаході додатково запропоновані набори (наприклад, контейнери), які містять антитіло, розкриті в цьому документі, і пов'язані з ним матеріали, такі як інструкції для використання (наприклад, вкладиш в упаковці). Інструкції щодо застосування можуть містити, наприклад, інструкції для введення антитіла, і, необов'язково, одну або кілька додаткових речовин. Контейнери з антитілом можуть бути в формі одиночних доз, багаторазових упаковок (наприклад, упаковок з кількома дозами) або суб-одиночних доз.

[00296] Вкладиш упаковки відноситься до інструкцій, які зазвичай включають в комерційні упаковки терапевтичних продуктів, які містять інформацію про показання, використання, дозування, призначення, протипоказання і/або попередження щодо використання таких терапевтичних продуктів.

[00297] Набори можуть також містити другий контейнер, який містить фармацевтично-прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWFІ - bacteriostatic water for injection), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера та розчин глюкози. Він також може містити інші матеріали, бажані з комерційної точки зору та точки зору користувача, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприци.

#### X. Інші застосування

[00298] Антитіла можуть бути використані для виявлення мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм транстиретина (TTR) або їх фрагментів, в контексті клінічної діагностики або лікування, або в дослідженнях. Наприклад, антитіла можуть бути використані для виявлення присутності мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR в біологічному зразку як індикатор того, що біологічний зразок містить відкладення TTR амілоїду. Зв'язування антитіл з біологічним зразком можна порівняти зі зв'язуванням антитіл з контрольним зразком. Контрольний зразок і біологічний зразок можуть містити клітини того ж самого тканинного походження. Контрольні зразки і біологічні зразки можуть бути отримані від тих же або різних осіб, і в тому ж відборі проб або в різних відборах проб. При бажанні безліч біологічних зразків і безліч контрольних зразків оцінюють при численних відборах проб, щоб уникнути випадкового відхилення, незалежного від відмінностей між зразками. Потім може бути проведено пряме порівняння між біологічним зразком(-ами) і контрольним зразком(-ами), щоб визначити, чи збільшується, чи зменшується, чи залишається таким же зв'язування антитіла (тобто присутність мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR) з біологічним зразком(-ами) відносно зв'язування антитіла з контрольним зразком(-ами). Підвищене зв'язування антитіла з біологічним зразком в порівнянні з контрольним зразком вказує на присутність мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR в біологічному зразку. У деяких випадках підвищене зв'язування антитіла є статистично значущим. Необов'язково, зв'язування антитіла з біологічним зразком є щонайменше в 1,5 рази, в 2 рази, в 3 рази, в 4 рази, в 5 разів, в 10 разів, в 20 разів або в 100 разів сильнішим, ніж зв'язування антитіла з контрольним зразком.

[00299] Крім того, антитіла можуть бути використані для виявлення присутності мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR в біологічному зразку для спостереження і оцінки ефективності лікарського засобу, який застосовується для лікування пацієнта з діагностованим TTR амілоїдозом. Оцінюють біологічний зразок з пацієнта з діагнозом TTR амілоїдоз, щоб встановити вихідний рівень зв'язування антитіл з зразком (тобто вихідний рівень наявності мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR в зразку) перед початком терапії лікарським препаратом. У деяких випадках, безліч біологічних зразків з пацієнта оцінюють при безлічі відборів проб, щоб встановити початкове значення, і міру випадкового відхилення, яка не залежить від лікування. Згодом лікарський препарат вводять схемою прийому ліків. Схема може включати безліч введень речовини впродовж певного періоду часу. Необов'язково, зв'язування антитіл (тобто наявність мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR) оцінюється при множинному відборі проб по безлічі біологічних зразків з пацієнта, як для визначення міри випадкового відхилення, так і для демонстрації тенденції у відповідь на імунотерапію. Потім порівнюють різні оцінки зв'язування антитіла з біологічними зразками. Якщо будуть виконані лише два оцінювання, можна провести пряме порівняння між двома оцінюванням для того, щоб визначити, чи збільшилося, зменшилося або залишалося незмінним зв'язування антитіла між двома оцінювання (тобто наявність мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR). Якщо проведено більше двох вимірів, вимірювання можуть бути

проаналізовані як часовий курс, що починається до лікування лікарським препаратом, і триває весь час терапії. Для пацієнтів, у яких зменшилося зв'язування антитіл з біологічними зразками (тобто наявність мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR), можна зробити висновок, що лікарський препарат був ефективним при лікуванні TTR амілоїдозу у пацієнта. Зниження зв'язування антитіл може бути статистично значущим. Необов'язково, зв'язування зменшується щонайменше на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% або 100%. Оцінка зв'язування антитіла може бути проведена в поєднанні з оцінкою інших ознак і симптомів TTR амілоїдозу.

[00300] Антитіла також можуть бути використані в якості дослідних реагентів для лабораторних досліджень, для виявлення мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR або їх фрагментів. У таких застосуваннях антитіла можуть бути помічені флуоресцентними молекулами, спін-міченими молекулами, ферментами або радіоізотопами, і можуть бути надані у вигляді набору з усіма необхідними реагентами для проведення аналізу детекції. Антитіла також можуть бути використані для очищення мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR, або партнерів по зв'язуванню мономерної, неправильно згорнутої, агрегованої або фібрильної форм TTR, наприклад, за допомогою афінної хроматографії.

[00301] Антитіла також можуть бути використані для інгібування або зменшення агрегації TTR, пригнічення або зменшення формування фібрил TTR, зменшення або усунення відкладень TTR або агрегатів TTR, або стабілізації нетоксичних конформацій TTR в біологічному зразку. Біологічний зразок може містити, наприклад, кров, сироватку, плазму або тканину (наприклад, тканину з серця, периферичної нервової системи, вегетативної нервової системи, нирки, ока або шлунково-кишкового тракту). У деяких випадках агрегація TTR, утворення фібрил TTR, або відкладення TTR обмежуються або знижуються, щонайменше, на 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% або 75% (наприклад, 10% -75% або 30%-70%). Аналізи для виявлення утворення фібрил описані в іншому місці в цьому документі. Дивитись також US 2014/0056904.

[00302] Всі патентні заявки, веб-сайти, інші публікації, ідентифікаційні номери тощо, згадані вище або нижче, включені за допомогою посилання в повному обсязі для всіх цілей в тій же мірі, як якби кожен окремий елемент був спеціально і індивідуально вказаний, щоб бути включеним за допомогою посилання. Якщо в різний час з ідентифікаційним номером асоційовані різні варіанти послідовності, то під цим ідентифікаційним номером мається на увазі варіант, асоційований з ним на момент фактичної дати подання цієї заявки. Дійсна дата подачі означає найбільш ранню дійсну дату подачі або дату подачі пріоритетної заявки з посиланням на ідентифікаційний номер при необхідності. Подібним чином, якщо різні варіанти публікації, веб-сайту тощо опубліковані в різний час, мається на увазі варіант, опублікований раніше всього на дійсну дату подачі, якщо не вказано інше. Будь-яка властивість, етап, елемент, варіант реалізації винаходу, або аспект винаходу можуть використовуватися в поєднанні з будь-яким іншим, якщо спеціально не вказано інше. Хоча цей винахід був описаний більш детально за допомогою ілюстрації та прикладу для ясності і розуміння, буде очевидно, що певні зміни і модифікації можуть бути реалізовані в рамках доданої формули винаходу.

#### ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Ідентифікація моноклональних антитіл до mis-TTR

[00303] Конформаційно-специфічні моноклональні антитіла проти мономерної, неправильно згорнутої, фібрильної або агрегованої форм TTR (mis-TTR) створювали, піддавали скринінгу, експресували і очищували, як описано в «Матеріали і способи» (a-d). Для створення моноклональних антитіл до mis-TTR була досліджена кристалічна структура тетрамерного TTR людини для того, щоб знайти області білка, які занурені в тетрамері, але стають експонованими при дисоціації тетрамера на його мономерні субодиниці. В ідентифікованій області були залишки 89-97 (EHAEEVFTA) (SEQ ID NO: 113), розташовані в межах F-ланцюга TTR і розділені на межі поділу димера тетрамерного білка. Пошук BLAST в білковій базі даних не виявив будь-яких інших людських білків, які мають цю послідовність.

[00304] Був синтезований пептид, який містить цю послідовність (ggEHAEEVFTAggkg) (SEQ ID NO: 114). Великі літери позначають залишки 89-97 TTR. Маленькі літери позначають додаткові лінкерні залишки, які додають для збільшення розчинності антигенного пептиду, і для створення 9 амінокислотного фрагмента в якості внутрішньої послідовності. Цей пептид був приєднаний до полілізінового розгалуженого ядра, утворюючи багатоскладовий антигенний пептидний імуноген (TTR-MAP), який містить ядро з лізінових залишків з декількома відгалуженнями, приєднане до пептиду 89-97 TTR. Антитіла, перераховані в Таблиці 2, були отримані проти TTR-MAP.

[00305] На додаток до цього багатоскладового антигенного пептида, два інших імуногена, які

містять один і той же фрагмент TTR, були отримані шляхом ковалентного приєднання аналогічних пептидів 89-97 TTR (Ac-cggEHAEEVFTTA-амід (SEQ ID NO: 115) і Ac-EHAEEVFTTA-cgg-амід (SEQ ID NO: 116)) через N- і C-кінцеві цистеїнові залишки до гемоціаніну фіссурелли (TTR89-97-N-KLH і TTR89-97-C-KLH).

- 5 [00306] Після створення, скринінгу, експресії і очищення антитіл були визначені детальні кінетичні параметри зв'язування (швидкість асоціації ( $k_a$ ), швидкість дисоціації ( $k_d$ ) і константа афінності зв'язування ( $K_D$ )) для «лідуючих» mis-TTR антитіл за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR - surface plasmon resonance) в парі з рекомбінантним людським TTR F87M/L110M, як показано в Таблиці 2. Антимішачий IgG (GE Healthcare) був іммобілізований на сенсорному чіпі C5 (без ланцюгів декстрану) через амінові з'єднання відповідно до інструкцій, наданих в антимішачому наборі GE Healthcare, а mis-TTR mAb (мишачі антитіла до ненативних форм TTR) були захоплені до рівня, достатнього щоб забезпечити максимальне зв'язування аналіту до 30-50 RU (resonance units - резонансних одиниць). Різні концентрації аналіту (рекомбінантний людський TTR F87M/L110M) пропускали через захоплений ліганд при 30 мкл/хв в рухомому буфері (HBS + 0,05% P-20, 1 мг/мл БСА) в 3-кратних розведеннях. Для кожної концентрації реакція протікала впродовж часу, що дозволяє більш високим концентраціям аналіту досягти рівноваги під час асоціації, а також, щонайменше, 10% сигналу до розпаду під час дисоціації. Щонайменше одна концентрація (не найвища або найнижча) була проаналізована з дублюючої пробою. Діапазони концентрацій аналіту були обрані на основі попередніх експериментів, щоб охопити межі вимірювань щонайменше від в 10 разів вище  $K_D$  до в 10 разів нижче  $K_D$ .

[00307] Результати аналізу SPR «лідуючих» mis-TTR mAb наведені в Таблиці 2 нижче.

Таблиця 2

SPR аналіз зв'язування антитіл до mis-TTR з людським TTR (F87M/L110M)

mAb	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$R_{max}$
9D5	2,715E+4	4,930E-4	1,816E-8	31,55
14G8	2,880E+4	5,358E-4	1,861E-8	27,13
5A1	6,107E + 4	4,693E-4	7,684E-9	30,98
6C1	4,607E+4	4,151E-4	9,010E-9	26,32

- 25 Приклад 2. Зв'язування антитіл до mis-TTR з антигеном TTR  
 [00308] Чотири «лідуючих» mis-TTR mAb (9D5, 14G8, 6C1 і 5A1) аналізували за допомогою ELISA в концентраціях від 0,31 до 2,5 мкг/мл, використовуючи як pH4,0-оброблений TTR (pH4-TTR), так і нативний TTR як покриваючий антиген. Підготовка антигену TTR і протоколи ELISA описані в інших місцях, в «Матеріали і способи» (e-g).
- 30 [00309] Отримані криві зв'язування і зведені значення  $K_d$  і  $V_{max}$  показані на Фіг. 3 і в таблиці 3 нижче. Результати на Фіг. 3 представлені в довільних одиницях (д. о.) по осі y. Всі mAb показали значне зв'язування з pH4-TTR з величинами  $K_d$  в діапазоні від 16 нМ (6C1) до 282 нМ (9D5). Значення  $V_{max}$  для зв'язування з pH4-TTR варіювали від мінімуму 0,65 д. о. (14G8) до максимуму 2,02 (9D5). На відміну від зв'язування з pH4-TTR, жодне з антитіл не показало значного зв'язування з нативним TTR, що вказує на те, що всі отримані антитіла проти TTR були специфічними до ненативних форм TTR.

Таблиця 3

Аналіз ELISA зв'язування антитіл до mis-TTR з pH4-TTR

mAb	$K_d$ (нМ)	$V_{max}$ (д. о.)
9D5	282	2,02
14G8	108	0,65
6C1	16	1,07
5A1	23	1,61

- 40 Приклад 3. Аналіз антитіл до mis-TTR за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу і нативного ПААГ-електрофорезу  
 [00310] 9D5 і 14G8 були проаналізовані за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу/Вестерн-блоттингу, щоб продемонструвати специфічність зв'язування з мономерними/денатурованими

формами TTR в порівнянні з нативним, неденатурованим TTR. Протоколи ДСН-ПААГ-електрофореzu, нативного ПААГ-електрофореzu і Вестерн блоттингу описані в інших місцях, в «Матеріали та способи» (h-j).

[00311] Неденатурований TTR або pH4-TTR піддавали електрофореzu в гелі ДСН-ПААГ поряд з термічно денатурованим TTR, і термічно денатурованим pH4-TTR. Після електрофореzu з гелем проводили Вестерн-блоттинг, переносячи білки на нітроцеллюлозу і фарбуючи mAb 9D5 і 14G8 до TTR. Обидва антитіла розпізнавали лише TTR, коли він був оброблений при pH4, або, коли TTR або pH4-TTR спочатку піддавали термічній денатурації перед виконанням ДСН-ПААГ-електрофореzu. Ці 9D5 і 14G8, таким чином, демонструють специфічність до конформерів TTR, отриманих або денатурацією TTR, або обробкою TTR при pH 4.

[00312] 6C1 і 5A1 разом із загальними mAb (7G7, 8C3) до TTR і комерційно доступним поліклональним антитілом Sigma також аналізували за допомогою ДСН-ПААГ-електрофореzu/Вестерн-блоттингу. Кожен блот містив пофарбовані маркери молекулярної маси, неденатурований TTR і pH4-TTR.

[00313] Пофарбований гель ДСН-ПААГ показав, що основними видами, присутніми в неденатурованій зразку TTR, був димер близько 38 кДа. Навпаки, основний компонент, присутній в зразку pH4-TTR, був димером близько 35 кДа, з невеликою частиною димера як мономера близько 15 кДа. Цей димер проходив як трохи менший білок, ніж димер, присутній в неденатурованій зразку TTR, що вказує на конформаційну різницю між цими двома видами димерів TTR.

[00314] Вестерн-блоттинг зразків TTR і pH4-TTR з використанням чотирьох антитіл до mis-TTR показав, що ці mAb не розпізнають неденатурований TTR, але зв'язують як денатурований мономер, так і димер, присутній в зразку pH4-TTR. Таким чином, чотири mAb до mis-TTR (9D5, 14G8, 6C1 і 5A1) показують подібну специфічність для неспоріднених конформацій TTR при аналізі ДСН-ПААГ-електрофореzom/Вестерн-блоттингом.

[00315] На відміну від чотирьох mAb до mis-TTR, два контрольних TTR mAb, 7G7 і 8C3, які були отримані шляхом імунізації мишей з інтактним TTR, розпізнавали всі види TTR, присутні в зразках TTR і pH4-TTR, включаючи види тетрамерного TTR. Таким чином, на відміну від mAb до mis-TTR, ці контрольні mAb зв'язують TTR, але без конформаційної специфічності. Поліклональні антитіла Sigma поведуться аналогічно контрольним mAb - 7G7 і 8C3.

[00316] TTR і pH4-TTR також піддавали електрофореzu в нативному гелі для того, щоб побачити, чи здатні чотири mAb до mis-TTR проявляти конформаційну специфічність в умовах неденатуруючого гелю. На пофарбованому нативному гелі ПААГ після електрофореzu, TTR виглядав як нативний димер близько 35 кДа з невеликою кількістю тетрамера. На відміну від цього, pH4-TTR виглядав в основному як високомолекулярна розмазана пляма з невеликою кількістю димера близько 35 кДа. Неспецифічне поліклональне антитіло Sigma розпізнавало всі форми TTR, присутні як в TTR, так і в зразку pH4-TTR. На протипагу цьому, 9D5 розпізнає лише високомолекулярні види TTR, присутні в зразку pH4-TTR. Як зазначалося в дослідженні ДСН-ПААГ-електрофореz/Вестерн-блоттинг, 9D5 не розпізнає жодного з нативних видів TTR.

[00317] Всі чотири mAb до mis-TTR згодом аналізували за допомогою нативного ДСН-ПААГ-електрофореzu/Вестерн-блоттингу. Як і очікувалося, і аналогічно 9D5, інші mAb до mis-TTR, 14G8, 6C1 і 5A1, специфічно зв'язуються з високомолекулярними ненативним формами TTR, присутніми в зразку pH4-TTR. Жодне з цих антитіл не розпізнавало нативний димер TTR 35 кДа. Ці результати вказують на те, що чотири mAb до mis-TTR поведуться однаково і розпізнають лише ненативні види TTR, які конформаційно відрізняються від нативного TTR.

Приклад 4. Інгибування утворення фібрил TTR за допомогою антитіл до mis-TTR

[00318] TTR-Y78F є варіантом TTR, який містить точкову мутацію в позиції 78, яка дестабілізує тетрамер TTR. Згодом і в м'яких кислотних умовах цей варіант TTR дисоціює на його мономерні субодиниці, які потім можуть зближуватися і утворювати фібрили, здатні зв'язуватися з тіофлавіном-Т. Таким чином, масштаб формування фібрил може спостерігатися шляхом вимірювання флуоресценції тіофлавіна-Т при 480 нм. Введення антитіла до mis-TTR, специфічного до дисоційованих мономерів або агрегатів TTR, запобігає об'єднанню фібрил TTR, що призводить до зменшення флуоресценції тіофлавіна-Т відносно реакції контролю за відсутності антитіла. Протоколи для оцінювання інгибування формування фібрил TTR описані в інших місцях, в «Матеріали і способи» (k).

[00319] Всі чотири антитіла до mis-TTR сильно інгибували формування тіофлавін-Т-реакційноздатних TTR-Y78F-фібрил в порівнянні з ізотипічним контролем. Результати показані на Фіг. 4А і представлені в довільних одиницях (д. о.) на осі у. Антитіло 5A1 до mis-TTR майже повністю інгибує утворення фібрил. Ці результати узгоджуються з думкою про те, що антитіла до mis-TTR зв'язують мономерні і/або агреговані форми TTR, тим самим запобігаючи утворенню

фібрил TTR.

[00320] В Таблиці 4 наведені характеристики, отримані для набору з 4 антитіл до mis-TTR (9D5, 14G8, 6C1 і 5A1), які показали хорошу конформаційну селективність до ненативних форм TTR. Ці антитіла мали афінності ( $K_D$ ) до pH4-TTR в діапазоні від 14,5 нМ (6C1) до 257 нМ (9D5) і значення  $V_{max}$  від 0,65 д. о. (14G8) до 2,02 (9D5). Жодне з цих антитіл не розпізнавало нативний TTR, але насправді вони зв'язувалися з pH4-TTR при ДСН-ПААГ-електрофорезу/Вестерн-блоттингу, і з високомолекулярними агрегатами TTR при нативному ПААГ-електрофорезу/Вестерн-блоттингу. Ці антитіла також інгібували формування фібрил TTR в аналізі формування фібрил з використанням Thio-T для зчитування даних.

Таблиця 4

Таблиця результатів аналізу характеристик mAb до mis-TTR-Y78F

Ідентифіка- тор клону	Сендвіч-ELISA (pH4-TTR)		Вестерн-блоттинг			% Інгібування Фібрил (Тіофлавін-Т)
	K <sub>D</sub> (нМ)	B <sub>max</sub> (OD <sub>450</sub> д. о.)	ДСН-ПААГ електрофорез		Нативний (HMW-TTR)	
			(TTR)	(pH4-TTR)		
9D5	257	2,02	-	+++	+++	83
14G8	98,7	0,65	-	+++	++	65
6C1	14,6	1,07	-	+++	+++	72
5A1	21.3	1.61	-	+++	+++	100

[00321] TTR-V122I є варіантом TTR, який містить в позиції 122 точкову мутацію, яка дестабілізує тетрамер. Формування фібрил пов'язане зі збільшенням флуоресценції тіофлавіна-Т. Збільшення концентрацій mAb 14G8 викликало монотонне зниження флуоресценції тіофлавіна-Т, яке вказує на субстехіометричне інгібування формування фібрил TTR ( $IC_{50} = 0,028 \pm 0,009$  мг/мл,  $n = 3$ , Фіг. 4B і Таблиця 4a). Ізотипне контрольне mAb не викликало інгібування формування фібрил TTR (Фіг. 4C), тим самим демонструючи специфічність опосередкованого 14G8 інгібування.

[00322] Співставні субстехіометричні значення  $IC_{50}$ , визначені для 5A1 і 6C1 (Таблиця 4a), припускали аналогічні механізми інгібування формування фібрил для кожного з цих mAb до mis-TTR. На противагу цьому, 9D5 несподівано не зміг інгібувати формування фібрил TTR-V122I, незважаючи на те, що виявляв подібну специфічність і спорідненість до ненативного TTR. Залишається вивчити, чи є 9D5 більш чутливим до використовуваних умов аналізу.

Таблиця 4a

Таблиця результатів аналізу характеристик mAb до mis-TTR-V122I

Антитіло	$IC_{50} \pm$ середнє-квадратичне відхилення (мг/мл)
9D5	Немає інгібування
14G8	$0,028 \pm 0,009$
6C1	$0,048 \pm 0,059$
5A1	$0,015 \pm 0,02$
EG 27/1	Немає інгібування

Приклад 5. Імуногістохімічне визначення характеристик тканини, схильної до ATTR, з використанням mAb до mis-TTR

[00323] «Лідируючі» mAb до mis-TTR, створені до фрагменту білка транстиретина 89-97 TTR, були імуногістохімічно протестовані на свіжозамороженій і обробленій парафіном тканині, взятій у пацієнтів з підтвердженим серцевим TTR амілоїдозом. Протоколи для отримання і підготовки зразків серцевої тканини, імуногістохімії (IHC - immunohistochemistry) та аналізу зображень наведені в інших місцях, в «Матеріали і способи» (I-o). Антитіла, які використовуються для IHC, описані в Таблиці 5.

Таблиця 5

Антитіла, застосовані для імуногістохімічного визначення характеристик

Антитіло	Тип антитіла	Продавець	Фарбування серцевої тканини	Концентрація
14G8	mis-TTR	Prothema Biosciences	Так	0,5 мкг/мл
9D5	mis-TTR	Prothema Biosciences	Так	0,5 мкг/мл
6C1	mis-TTR	Prothema Biosciences	Так	0,5 мкг/мл
5A1	mis-TTR	Prothema Biosciences	Так	0,5 мкг/мл
7G7	TTR	Prothema Biosciences	Так	0,5 мкг/мл
6F10	Ізотипний контроль	Prothema Biosciences	Ні	0,5 мкг/мл
Преальбумін (A0002)	TTR	Dako North America	Так	1:2000 і 1:20000
Каппа-легкі ланцюги (A0191)	ЛЦ-каппа	Dako North America	Ні	1:8000
Лямбда-легкі ланцюги (A0193)	ЛЦ-лямбда	Dako North America	Ні	1:8000
Амілоїд А (M0759)	AA	Dako North America	Ні	1:8000

5 [00324] Зразки серцевої тканини були отримані у пацієнтів з підтвердженими діагнозами мутацій ATTR. Демографія для досліджуваних імуногістохімічно випадків була наступною і представлена в Таблиці 6: FAC = сімейна амілоїдна кардіоміопатія; FAP = сімейна амілоїдна поліневропатія; 1° AL = амілоїдоз легкого ланцюга; ATTR = транстиретин-опосередкований амілоїдоз; Unk = Невідомо

Таблиця 6

Імуногістохімічне фарбування зразків серцевої тканини за допомогою антитіл до mis-TTR

Пацієнт	Діагноз	Мутації TTR	Форма	Чи забарвлювалося антитілами до TTR?
Пацієнт 1	FAC	Ileu122	Заморожений	Так
Пацієнт 2	FAP	Дикий тип	Заморожений	Так
Пацієнт 3	FAP	84Ser	Заморожений	Так
Пацієнт 4	FAP	84Ser	Заморожений	Так
Пацієнт 5	1° AL	--	Заморожений	Ні
Пацієнт 6	1° AL	--	Заморожений	Ні
Пацієнт 7	ATTR	10Arg	Заморожений	Так
Пацієнт 8	ATTR	V122I	Заморожений	Так
Пацієнт H1	ATTR	Val122Ile	FFPE	Так
Пацієнт H2	ATTR	Thr60Ala	FFPE	Так
Пацієнт H3	ATTR	Thr49Ala	FFPE	Так
Пацієнт H4	ATTR	Ile84Ser	FFPE	Так
Пацієнт H5	Unk.	Senile Cardiac	FFPE	Так
Пацієнт H6	ATTR	Ile84Ser	FFPE	Так

10 [00325] Мишачі моноклональні антитіла (mAb до mis-TTR), створені до фрагменту білка транстиретина 89-97 TTR, були імуногістохімічно протестовані на свіжозамороженій і обробленій парафіном тканині, взятій у пацієнтів з підтвердженим серцевим TTR амілоїдозом. Кожне антитіло до mis-TTR проявляло сильну імунореактивність на серцевій тканині з ATTR.

15 Темне забарвлення спостерігалось у відкладеннях у всьому міокарді і судинній мережі. Коли імунореактивність порівнювали по фарбуванню Congo Red і тіофлавіном-Т, більша частина імунореактивності на тканині показала високу відповідність між двопроменезаломненням Congo red і Т-позитивним фарбуванням тіофлавіном. Це підтверджує бета-складчасту природу листа



TTR амілоїду, відкладеного в цій тканині. 14G8, 9D5, 6C1 і 5A1 також виявляли перед-амілоїдний TTR, присутній в областях міокарда, які були TTR-імунопозитивними, проте Congo red або тіофлавін-Т негативними. Пропущені області як контрольним антитілом ізотипу IgG, так і первинним антитілом були негативними для фарбування у всіх тестованих тканинах. Антитіла, реакційноздатні по відношенню до інших амілоїдогенних білків (легкі ланцюги лямбда і каппа, або амілоїд А), були нереакційноздатними на серцевій тканині з ATTR, яка була використана в цьому аналізі, який вказує на те, що відкладення були специфічно характерні для TTR.

[00326] Шаблони фарбування антитілами до mis-TTR порівнювали з фарбуванням, отриманим з допомогою добре охарактеризованого комерційного еталонного антитіла до TTR (преальбумін, A0002; Dako; Карпінтерія, Каліфорнія). Контрольне антитіло DAKO фарбувало уражений захворюванням міокард в тих же областях, що й антитіла до mis-TTR, але продукувало більш дифузний шаблон фарбування. Контрольне антитіло DAKO не фарбувало відкладення амілоїду TTR в судинній мережі, які забарвлюються Congo Red, так само сильно, як антитіла до mis-TTR.

[00327] Антитіла до mis-TTR не фарбували нормальну, неуразену захворюванням тканину. Крім того, як і очікувалося, фарбування ізотипним контрольним антитілом, 6F10, також було негативним.

[00328] Для того, щоб визначити, чи є реакційна здатність антитіл до mis-TTR специфічною відносно відкладень TTR, була проаналізована крос-реакційна здатність цих антитіл до серцевої тканини, отриманої від пацієнтів з діагнозом первинного амілоїдозу AL (light-chain amyloidosis). Як і очікувалося, жодного фарбування AL-амілоїдної тканини не спостерігалось, підтверджуючи, що антитіла до TTR специфічно реагують на уражену ATTR тканину.

[00329] Серцева тканина пацієнтів з підтвердженими діагнозами старечого системного амілоїдозу або пацієнтів з підтвердженням FAC або FAP, які викликані точковими мутаціями в гені TTR, також позитивно забарвлюється 14G8, 9D5, 6C1 і 5A1. Ці результати показують, що антитіла до TTR мають здатність розпізнавати відкладення TTR в серцевій тканині незалежно від генотипу ATTR.

[00330] Інші несерцеві тканини, які, як відомо, експресують TTR, також досліджували на фарбування антитілами до mis-TTR, і порівнювали з фарбуванням, отриманим з використанням еталонного антитіла DAKO. Як і очікувалося, печінка, підшлункова залоза і судинне сплетіння фарбувались позитивно на TTR з використанням еталонного антитіла Dako. На противагу цьому, 14G8 фарбувало лише альфа-клітини підшлункової залози, розташовані в острівцях Лангерганса, і судинне сплетіння, що вказує на те, що деякі з TTR, локалізовані в цих органах, конформаційно відрізняються від TTR, які експресуються в печінці. Відсутність імунореактивності у mAb до mis-TTR в печінці свідчить про те, що велика кількість TTR, експресованого в ній, є, в основному, тетрамерним, нативним TTR, і не має експонованого епітопу mis-TTR. Аналогічні результати були отримані, коли одні і ті ж тканини забарвлювалися 9D5, 6C1 і 5A1.

Приклад 6. Аналіз ATTR в порівнянні з плазмою звичайної людини за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу/Вестерн-блоттингу і плашкового аналізу Meso Scale Discovery (MSD)

[00331] Шість зразків плазми від пацієнтів, з підтвердженням V30M ATTR (зразок № 11, № 12, № 15, № 18, № 19, № 20) і шість зразків від звичайних суб'єктів (№ 21, № 22, № 23, № 24, № 25, № 27) були отримані від М. Сарайва (Університет Порту, Португалія). Зразок № С6 був звичайним зразком людської сироватки, отриманим з комерційного джерела (BioreclamationIVT). Зразки аналізували за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу і Вестерн-блоттингу або за допомогою плашкового тесту MesoScale Discovery (MSD). Протоколи для цих аналізів описані в інших місцях, в «Матеріали і способи» (p-r). Стандартна крива була згенерована для плашкового аналізу MSD з використанням 6C1.

[00332] В отриманих Вестерн-блотах з використанням mAb до mis-TTR - 9D5 і 5A1, можна виявити відмінності в шаблонах смуг між нормальними зразками плазми і з TTR-V30M. Всі зразки плазми містили смугу TTR близько 14 кДа, яка рухалася разом з ненативним TTR-мономером, присутнім в еталонному зразку pH4-TTR. Загалом, зразки плазми, отримані від пацієнтів з TTR-V30M (№ 21, 22, 23, 24, 25 і 27), мали більше видів цих мономерних mis-TTR. Кроти того, зразки плазми, отримані від пацієнтів з V30M, також містили смугу близько 30 кДа, яка рухалася разом з ненативним димером TTR, присутнім в еталонному зразку pH4-TTR. За винятком зразків № 12 і № 18, зразки плазми, отримані від звичайних особин, володіли меншою кількістю цих димерних видів.

[00333] Вищевказані Вестерн-блоти були відскановані, а інтенсивності комбінованого 9D5-або 5A1-реакційноздатного TTR-димера і смуг мономерів були нанесені на графік для кожного зразка. Результати показані на Фіг. 5А (9D5) і 5В (5A1) і представлені в довільних одиницях (д.

о.) по осі у. За винятком зразків плазми № 15 і № 18, зразки плазми, отримані від звичайних індивідів (11, 12, 19 і 20), містили менше 9D5- і 5A1-реакційноздатних димерних і мономерних видів, ніж зразки, отримані від пацієнтів з V30M (21-25 і 27).

[00334] 12 зразків сироватки, проаналізовані Вестерн-блоттингом з 9D5 і 5A1, також аналізували за допомогою плашкового аналізу MSD з використанням 6C1 як антитіла для захоплення mis-TTR, і антитіла Dako-SulfoTag як антитіла детектування. Результати цих MSD-аналізів показані на Фіг. 6 і представлені в довільних одиницях (д. о.) по осі у. Зразки 11, 12, 15, 18, 19 і 20 являють собою звичайну плазму. Зразки 21-25 і 27 являють собою плазму хворих з V30M.

[00335] За винятком зразків плазми № 15 і № 18, кількість 6C1-реакційноздатного TTR, присутнього в зразках плазми, отриманих від звичайних індивідів, була нижчою, ніж в плазмі у індивідів з TTR-V30M. Рівні реакційної здатності 6C1, виміряні за допомогою аналізу MSD, дуже добре корелювали з кількістю 9D5-реакційноздатного димера і мономера, які спостерігались вище за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу/Вестерн-блоттингу.

[00336] Для того, щоб визначити концентрацію реакційноздатних видів TTR, які присутні в зразках плазми, ті ж зразки повторно аналізували з використанням 6C1 як антитіла захоплення і 8C3-SulfoTag в якості детектуючого антитіла. Сигнали MSD перетворювали в концентрації нг/мл реакційноздатних видів TTR, використовуючи стандартну криву TTR F87M/L110M, створену вище. На підставі цього аналізу середня концентрація 6C1-реакційноздатного TTR, присутнього в контрольних зразках, становила 271 ± 185 нг/мл. На противагу цьому, середня концентрація реакційноздатного TTR, присутнього в зразках плазми V30M, була вищою - на рівні 331 ± 95 нг/мл. Взяті разом, ці результати аналізу MSD показують, що антитіла до mis-TTR здатні розрізняти зразки з ATTR і зразки звичайної плазми. Це гарантує подальше поліпшення антитіл до mis-TTR для використання в діагностичних тестах захворювання ATTR.

Приклад 7. Дизайн гуманізованих антитіл 9D5

[00337] Відправною точкою або донорським антитілом для гуманізації було мишаче антитіло 9D5. Амінокислотна послідовність важкого ланцюга зрілого m9D5 представлена як SEQ ID NO: 1. Амінокислотна послідовність легкого ланцюга зрілого m9D5 представлена як SEQ ID NO: 16. Амінокислотні послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 важкого ланцюга представлені як SEQ ID NO: 13-15 відповідно (як визначено по Кабату). Комбінована по Чотіа-Кабату CDR-H1 представлена як SEQ ID NO: 117. Амінокислотні послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 легкого ланцюга представлені як SEQ ID NO: 24-26 відповідно (як визначено по Кабату). У цьому прикладі використовується нумерація Кабата.

[00338] Варіабельна каппа (Vk) антитіла m9D5 відноситься до підгрупи 2 миші по Кабату, що відповідає підгрупі 3 людини по Кабату. Варіабельна важка (Vh) антитіла m9D5 відноситься до підгрупи 3d миші по Кабату, що відповідає підгрупі 3 по Кабату. Дивіться Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, 1991. CDR-L1 з 16 залишків відноситься до традиційного класу 4, CDR-L2 з 7 залишків відноситься до традиційного класу 1, а CDR-L3 з 9 залишків відноситься до традиційного класу 1 в Vk. Дивіться Martin & Thornton, J. Mol. Biol. 263:800-15, 1996. Комбінована по Чотіа-Кабату CDR-H1 з 10 залишків відноситься до традиційного класу 1, і CDR-H2 з 17 залишків відноситься до традиційного класу 1. Дивіться Martin & Thornton, J Mol. Biol. 263:800-15, 1996. CDR-H3 не має традиційних класів.

[00339] Залишки в зоні взаємодії доменів Vk і Vh є такими, які зазвичай можна спостерігати, за винятком Leu у позиції 47 в важкому ланцюзі, оскільки зазвичай в цій позиції зустрічається Туг. Ця позиція є кандидатом на зворотне мутування.

[00340] Було проведено пошук по білковим послідовностям в базі даних PDB (Deshpande et al., Nucleic Acids Res. 33: D233-7, 2005) щоб знайти структури, які б надали грубу структурну модель для 9D5. Кристалічна структура fab антитіла (код pdb 1MJU) (Ruzhenikov et al., J. Mol. Biol. 332 (2): 423-435, 2003) була використана для структури Vk, так як вона мала гарну роздільну здатність (1,22 Å) і загальну подібність послідовностей з Vk антитіла 9D5, зберігаючи ту ж традиційну структуру для петлі як і в 9D5. Для структури Vh використовували мономерне антитіло з кодом pdb 1SEQ (Covaceuszach et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 57 (PT 9), 1307-1309, 2001), оскільки воно мало гарну схожість послідовності і роздільну здатність (2,0 Å), і воно має ті ж традиційні структури CDR-H1 і CDR-H2, як ті ж Vh антитіла 9D5. Ми моделювали ланцюг Vh антитіла 9D5 також застосовуючи структуру 1MQK, так як вона має кращу роздільну здатність 1,28 Å (Ostermeier et al., Proteins 21 (1):74-77, 1995). Програмне забезпечення BioLuminate (ліцензія від Schrodinger Inc.) використовувалося для моделювання грубої структури 9D5.

[00341] Пошук по базі даних з NCBI, яка не містить надлишкових білкових послідовностей, дозволив вибрати відповідні каркаси антитіла людини для перенесення CDR миші. Для Vh був

обраний важкий ланцюг Ig людини BAC02114 (GI: 21670209) (SEQ ID NO: 3) (Akahori et al., Construction and characterization of antibody libraries: isolation of therapeutic human antibodies and application to functional genomics, Direct Submission, July 25, 2001). Він має традиційну форму, як і в 9D5. Він є членом важкої підгрупи 1 людини по Кабату. Vh з 9D5 має деякі унікальні залишки

5 каркаса, і будь-який людський акцептор каркаса не показував дуже високої гомології. Тому ми також використовували другий каркас, AAX82494 (GI: 62421461) (SEQ ID NO: 4) (Lundquist et al., Infect. Immun. 74(6), 3222-3231, 2006) щоб створити гібридний каркас акцептора. Для Vk був обраний каппа-легкий ланцюг людини з ідентифікаційним номером NCBI ABC66952 (GI: 84798006) (Shriner et al., Vaccine 24(49-50):7159-7166, 2006) (SEQ ID NO: 18). Традиційні класи

10 його CDR-L1 і L2 такі ж як і в батьківському Vk. Він є членом каппа-підгрупи 2 людини по Кабату. [00342] Були сконструйовані вісім варіантів варіабельної області гуманізованого важкого ланцюга і п'ять варіантів варіабельної області гуманізованого легкого ланцюга, які містять різні перестановки замін (Hu9D5VHv1, 2, 2b, 3, 3b, 4, 4b і 5 (SEQ ID NOS: 5-12 відповідно) і Hu9D5VLv1-5 (SEQ ID NOS: 19-23, відповідно)) (Таблиці 7 і 8). Ілюстративні гуманізовані

15 конструкції Vh і Vk із зворотними мутаціями та іншими мутаціями, на основі вибраних людських каркасів показані в Таблицях 7 і 8 відповідно. Заштриховані сірим області в першому стовпчику в Таблицях 7 і 8 позначають CDR, як визначено по Чотіа, а заштриховані сірим в інших стовпчиках в Таблицях 7 і 8 позначають CDR, як визначено по Кабату. SEQ ID NO: 5-12 і 19-23 містять зворотні мутації та інші мутації, як показано в Таблиці 9. Амінокислоти в позиціях H42,

20 H47, H69, H82, H82(b), H108, L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70 і L74 в Hu9D5VHv1, 2, 2b, 3, 3b, 4, 4b і 5 і Hu9D5VLv1-5 наведені в Таблицях 10 та 11.

Таблиця 7

## Гуманізовані області Vh 9D5

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабагу	Лінійний № залишку	FR або CDR	VH 9D5 мінні (SEQ ID NO: 1)	Hu VH Ассептор Fr Acc № BAC02114 (SEQ ID NO: 3)	Hu VH Ассептор Fr Acc № AAX82494 (SEQ ID NO: 4)	Hu9D5 VHv1 (SEQ ID NO: 5)	Hu9D5 VHv2 (SEQ ID NO: 6)	Hu9D5 VHv2b (SEQ ID NO: 7)	Hu9D5 VHv3 (SEQ ID NO: 8)	Hu9D5 VHv3b (SEQ ID NO: 9)	Hu9D5 VHv4 (SEQ ID NO: 10)	Hu9D5 VHv4b (SEQ ID NO: 11)	Hu9D5 VHv5 (SEQ ID NO: 12)
1	1	1	Fr1	E	E	Q	E	E	E	E	E	E	E	E
2	2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	3	Fr1	K	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
5	5	5	Fr1	V	V	Q	V	V	V	V	V	V	V	V
6	6	6	Fr1	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
7	7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
9	9	9	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
10	10	10	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
11	11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
13	13	13	Fr1	Q	Q	K	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
14	14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	18	18	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
19	19	19	Fr1	K	R	K	R	R	K	R	K	R	K	R
20	20	20	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
21	21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
23	23	23	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
24	24	24	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
25	25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабагу	Лінійний № залишку	FR або CDR	VH 9D5 миші (SEQ ID NO: 1)	Hu VH Акцептор Fr Acc № BAC02114 (SEQ ID NO: 3)	Hu VH Акцептор Fr Acc № AAX82494 (SEQ ID NO: 4)	Hu9D5 VHv1 (SEQ ID NO: 5)	Hu9D5 VHv2 (SEQ ID NO: 6)	Hu9D5 VHv2b (SEQ ID NO: 7)	Hu9D5 VHv3 (SEQ ID NO: 8)	Hu9D5 VHv3b (SEQ ID NO: 9)	Hu9D5 VHv4 (SEQ ID NO: 10)	Hu9D5 VHv4b (SEQ ID NO: 11)	Hu9D5 VHv5 (SEQ ID NO: 12)
26	26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
27	27	27	CDR-H1	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
28	28	28	CDR-H1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
29	29	29	CDR-H1	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
30	30	30	CDR-H1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
31	31	31	CDR-H1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
32	32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	33	CDR-H1	T	E	G	T	T	T	T	T	T	T	T
34	34	34	CDR-H1	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
35	35	35	CDR-H1	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S
36	36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	38	Fr2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
39	39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	40	Fr2	T	A	T	A	A	T	A	T	A	A	T
41	41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	42	Fr2	E	G	D	G	G	E	G	G	G	G	E
43	43	43	Fr2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
44	44	44	Fr2	R	G	R	G	G	R	G	R	G	R	R

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабагу	Лінійний № залишку	FR або CDR	VH 9D5 миші (SEQ ID NO: 1)	Hu VH Acceptor Fr Acc № BAC02114 (SEQ ID NO: 3)	Hu VH Acceptor Fr Acc № AAX82494 (SEQ ID NO: 4)	Hu9D5 VHv1 (SEQ ID NO: 5)	Hu9D5 VHv2 (SEQ ID NO: 6)	Hu9D5 VHv2b (SEQ ID NO: 7)	Hu9D5 VHv3 (SEQ ID NO: 8)	Hu9D5 VHv3b (SEQ ID NO: 9)	Hu9D5 VHv4 (SEQ ID NO: 10)	Hu9D5 VHv4b (SEQ ID NO: 11)	Hu9D5 VHv5 (SEQ ID NO: 12)
45	45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
46	46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	47	Fr2	L	W	W	L	L	L	W	L	W	L	L
48	48	48	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
49	49	49	Fr2	A	S	A	A	A	A	S	A	S	A	A
50	50	50	CDR-H2	E	Y	T	E	E	E	E	E	E	E	E
51	51	51	CDR-H2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
52	52	52	CDR-H2	S	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S
52A	52A	53	CDR-H2	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N
53	53	54	CDR-H2	S	S	G	S	S	S	S	S	S	S	S
54	54	55	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
55	55	56	CDR-H2	D	S	S	D	D	D	D	D	D	D	D
56	56	57	CDR-H2	T	T	Y	T	T	T	T	T	T	T	T
57	57	58	CDR-H2	T	I	T	T	T	T	T	T	T	T	T
58	58	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
59	59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	60	61	CDR-H2	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VH 9D5 миші (SEQ ID NO: 1)	Hu VH Акцептор Fr Acc № BAC02114 (SEQ ID NO: 3)	Hu VH Акцептор Fr Acc № AAX82494 (SEQ ID NO: 4)	Hu9D5 VHv1 (SEQ ID NO: 5)	Hu9D5 VHv2 (SEQ ID NO: 6)	Hu9D5 VHv2b (SEQ ID NO: 7)	Hu9D5 VHv3 (SEQ ID NO: 8)	Hu9D5 VHv3b (SEQ ID NO: 9)	Hu9D5 VHv4 (SEQ ID NO: 10)	Hu9D5 VHv4b (SEQ ID NO: 11)	Hu9D5 VHv5 (SEQ ID NO: 12)
61	61	62	CDR-H2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
62	62	63	CDR-H2	T	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T
63	63	64	CDR-H2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
64	64	65	CDR-H2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
65	65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
66	66	67	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
67	67	68	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
68	68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
69	69	70	Fr3	F	I	I	F	F	I	F	I	I	I	I
70	70	71	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
71	71	72	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
72	72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
73	73	74	Fr3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
74	74	75	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
75	75	76	Fr3	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
76	76	77	Fr3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
77	77	78	Fr3	T	S	T	S	S	T	S	T	S	T	T
78	78	79	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
79	79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	80	81	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
81	81	82	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
82	82	83	Fr3	M	M	M	S	S	M	S	M	S	M	M
82A	82A	84	Fr3	S	N	S	N	N	S	N	S	N	S	N
82B	82B	85	Fr3	S	S	S	S	L	S	L	S	L	S	L

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабагу	Лінійний № залишку	FR або CDR	VH 9D5 мінні (SEQ ID NO: 1)	Hu VH Акцептор Fr Acc № BAC02114 (SEQ ID NO: 3)	Hu VH Акцептор Fr Acc № AAX82494 (SEQ ID NO: 4)	Hu9D5 VHv1 (SEQ ID NO: 5)	Hu9D5 VHv2 (SEQ ID NO: 6)	Hu9D5 VHv2b (SEQ ID NO: 7)	Hu9D5 VHv3 (SEQ ID NO: 8)	Hu9D5 VHv3b (SEQ ID NO: 9)	Hu9D5 VHv4 (SEQ ID NO: 10)	Hu9D5 VHv4b (SEQ ID NO: 11)	Hu9D5 VHv5 (SEQ ID NO: 12)
82C	82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
83	83	87	Fr3	K	R	K	K	R	K	R	K	R	K	R
84	84	88	Fr3	S	A	S	A	A	S	A	S	A	S	A
85	85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
86	86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
87	87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
88	88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
89	89	93	Fr3	M	V	M	V	V	M	V	M	V	M	V
90	90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
92	92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
93	93	97	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
94	94	98	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
95	95	99	CDR-H3	H	G	L	H	H	H	H	H	H	H	H
96	96	100	CDR-H3	Y	G	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
97	97	101	CDR-H3	Y	Q	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
98	98	102	CDR-H3	Y	G	G	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
99	99	103	CDR-H3	G	S	Y	G	G	G	G	G	G	G	G
100	100	104	CDR-H3	G	R	R	G	G	G	G	G	G	G	G
100 A	100 A	105	CDR-H3	G	Y	Y	G	G	G	G	G	G	G	G
100 B	100 B	106	CDR-H3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y



№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабагу	Лінійний № залишку	FR або CDR	VH 9D5 миші (SEQ ID NO: 1)	Hu VH Акцептор Fr Acc № BAC02114 (SEQ ID NO: 3)	Hu VH Акцептор Fr Acc № AAX82494 (SEQ ID NO: 4)	Hu9D5 VHv1 (SEQ ID NO: 5)	Hu9D5 VHv2 (SEQ ID NO: 6)	Hu9D5 VHv2b (SEQ ID NO: 7)	Hu9D5 VHv3 (SEQ ID NO: 8)	Hu9D5 VHv3b (SEQ ID NO: 9)	Hu9D5 VHv4 (SEQ ID NO: 10)	Hu9D5 VHv4b (SEQ ID NO: 11)	Hu9D5 VHv5 (SEQ ID NO: 12)
100 C	100 C	107	CDR- H3	G	Y	F	G	G	G	G	G	G	G	G
100 D	100 D	108	CDR- H3	G	Y	-	G	G	G	G	G	G	G	G
100 E	100 E	109	CDR- H3	W	Y	-	W	W	W	W	W	W	W	W
100 F	100 F	110	CDR- H3	F	G	-	F	F	F	F	F	F	F	F
100 G	100 G	111	CDR- H3	F	M	-	F	F	F	F	F	F	F	F
101	101	112	CDR- H3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
102	102	113	CDR- H3	V	V	Y	V	V	V	V	V	V	V	V
103	103	114	Fr4	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
104	104	115	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
105	105	116	Fr4	T	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	106	117	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
107	107	118	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
108	108	119	Fr4	T	T	M	T	T	L	T	L	T	L	T
109	109	120	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
110	110	121	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
111	111	122	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
112	112	123	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
113	113	124	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Таблиця 8

Гуманізовані області V<sub>k</sub> 9D5

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VL 9D5 миші (SEQ ID NO: 16)	Hu VL Acceptor Fr Acc № ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	Hu9D5 VLv1 (SEQ ID NO: 19)	Hu9D5 VLv2 (SEQ ID NO: 20)	Hu9D5 VLv3 (SEQ ID NO: 21)	Hu9D5 VLv4 (SEQ ID NO: 22)	Hu9D5 VLv5 (SEQ ID NO: 23)
1	1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D	D
2	2	2	Fr1	I	I	I	I	I	I	I
3	3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V	V
4	4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M	M
5	5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T	T
6	6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	7	Fr1	A	S	S	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	A	P	P	P	P	A	A
9	9	9	Fr1	P	L	L	L	L	P	P
10	10	10	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
11	11	11	Fr1	V	L	L	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	P	P	P	P	P	P	P
13	13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V	V
14	14	14	Fr1	T	T	T	T	T	T	T
15	15	15	Fr1	P	P	P	P	P	P	P
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	E	E	E	E	E	E	E
18	18	18	Fr1	S	P	P	P	P	P	S
19	19	19	Fr1	V	A	A	A	A	V	V
20	20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
21	21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I	I
22	22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
23	23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C	C
24	24	24	CDR-L1	R	R	R	R	R	R	R
25	25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S	S
26	26	26	CDR-L1	S	N	S	S	S	S	S
27	27	27	CDR-L1	K	Q	K	K	K	K	K

№ залишку по Чотгіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VL 9D5 мипі (SEQ ID NO: 16)	Hu VL Acceptor Fr Acc № ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	Hu9D5 VLv1 (SEQ ID NO: 19)	Hu9D5 VLv2 (SEQ ID NO: 20)	Hu9D5 VLv3 (SEQ ID NO: 21)	Hu9D5 VLv4 (SEQ ID NO: 22)	Hu9D5 VLv5 (SEQ ID NO: 23)
27A	27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S	S	S
27B	27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L	L	L
27C	27C	30	CDR-L1	L	L	L	L	L	L	L
27D	27D	31	CDR-L1	H	Y	H	H	H	H	H
27E	27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S	S	S
28	28	33	CDR-L1	N	N	N	N	N	N	N
29	29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G	G	G
30	30	35	CDR-L1	N	Y	N	N	N	N	N
31	31	36	CDR-L1	T	N	T	T	T	T	T
32	32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L	L	L
34	34	39	CDR-L1	Y	D	Y	Y	Y	Y	Y
35	35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W	W
36	36	41	Fr2	F	Y	F	Y	Y	F	F
37	37	42	Fr2	L	L	L	L	L	L	L
38	38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	39	44	Fr2	R	K	K	K	K	R	R
40	40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P	P
41	41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G	G

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VL 9D5 миші (SEQ ID NO: 16)	Hu VL Acceptor Fr Acc № ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	Hu9D5 VLv1 (SEQ ID NO: 19)	Hu9D5 VLv2 (SEQ ID NO: 20)	Hu9D5 VLv3 (SEQ ID NO: 21)	Hu9D5 VLv4 (SEQ ID NO: 22)	Hu9D5 VLv5 (SEQ ID NO: 23)
42	42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S	S
44	44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P	P
45	45	50	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
46	46	51	Fr2	L	L	L	L	L	L	L
47	47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L	L
48	48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I	I
49	49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
50	50	55	CDR-L2	R	S	R	R	R	R	R
51	51	56	CDR-L2	V	G	V	V	V	V	V
52	52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S	S	S
53	53	58	CDR-L2	N	N	N	N	N	N	N
54	54	59	CDR-L2	L	R	L	L	L	L	L
55	55	60	CDR-L2	A	A	A	A	A	A	A
56	56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S	S	S
57	57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
58	58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
59	59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P	P
60	60	65	Fr3	D	D	D	D	S	S	S
61	61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R	R
62	62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F	F
63	63	68	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
64	64	69	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
65	65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S	S

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VL 9D5 миші (SEQ ID NO: 16)	Hu VL Acceptor Fr Acc № ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	Hu9D5 VLv1 (SEQ ID NO: 19)	Hu9D5 VLv2 (SEQ ID NO: 20)	Hu9D5 VLv3 (SEQ ID NO: 21)	Hu9D5 VLv4 (SEQ ID NO: 22)	Hu9D5 VLv5 (SEQ ID NO: 23)
66	66	71	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
67	67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
68	68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
69	69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T	T
70	70	75	Fr3	A	D	D	D	D	A	A
71	71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F	F
72	72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T	T
73	73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L	L
74	74	79	Fr3	R	K	K	K	K	R	R
75	75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I	I
76	76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
77	77	82	Fr3	R	R	R	R	R	R	R
78	78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
79	79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E	E
80	80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A	A
81	81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E	E
82	82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D	D
83	83	88	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
84	84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
85	85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
86	86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
87	87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
88	88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C	C
89	89	94	CDR-L3	M	M	M	M	M	M	M
90	90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
91	91	96	CDR-L3	H	A	H	H	H	H	H
92	92	97	CDR-L3	L	L	L	L	L	L	L

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VL 9D5 миші (SEQ ID NO: 16)	Hu VL Acceptor Fr Ace № ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	Hu9D5 VLv1 (SEQ ID NO: 19)	Hu9D5 VLv2 (SEQ ID NO: 20)	Hu9D5 VLv3 (SEQ ID NO: 21)	Hu9D5 VLv4 (SEQ ID NO: 22)	Hu9D5 VLv5 (SEQ ID NO: 23)
93	93	98	CDR-L3	E	Q	E	E	E	E	E
94	94	99	CDR-L3	Y	S	Y	Y	Y	Y	Y
95	95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P	P	P
96	96	101	CDR-L3	L	Y	L	L	L	L	L
97	97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T	T	T
98	98	103	Fr4	F	F	F	F	F	F	F
99	99	104	Fr4	G	G	G	G	G	G	G
100	100	105	Fr4	A	Q	Q	Q	Q	Q	Q
101	101	106	Fr4	G	G	G	G	G	G	G
102	102	107	Fr4	T	T	T	T	T	T	T
103	103	108	Fr4	K	K	K	K	K	K	K
104	104	109	Fr4	L	L	L	L	L	L	L
105	105	110	Fr4	E	E	E	E	E	E	E
106	106	111	Fr4	L	I	I	I	I	I	I
107	107	112	Fr4	K	K	K	K	K	K	K

Таблиця 9

Зворотні мутації та інші мутації  $V_H$ ,  $V_L$ 

Варіант $V_H$ або $V_L$	Послідовність екзона акцептора $V_H$ або $V_L$	Залишки каркаса донора
Hu9D5VHv1 (SEQ ID NO: 5)	Ідентифікаційні номери NCBI BAC02114 і AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 і 4 відповідно)	H47, H69, H82
Hu9D5VHv2 (SEQ ID NO: 6)	Ідентифікаційні номери NCBI BAC02114 і AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 і 4 відповідно)	H47, H69, H82, H82b
Hu9D5VHv2b (SEQ ID NO: 7)	Ідентифікаційні номери NCBI BAC02114 і AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 і 4 відповідно)	H42, H47, H108
Hu9D5VHv3 (SEQ ID NO: 8)	Ідентифікаційні номери NCBI BAC02114 і AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 і 4 відповідно)	H69, H82, H82b
Hu9D5VHv3b (SEQ ID NO: 9)	Ідентифікаційні номери NCBI BAC02114 і AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 і 4 відповідно)	H47, H108
Hu9D5VHv4 (SEQ ID NO: 10)	Ідентифікаційні номери NCBI BAC02114 і AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 і 4 відповідно)	H82, H82b
Hu9D5VHv4b (SEQ ID NO: 11)	Ідентифікаційні номери NCBI BAC02114 і AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 і 4 відповідно)	H47, H108
Hu9D5VHv5 (SEQ ID NO: 12)	Ідентифікаційні номери NCBI BAC02114 і AAX82494 (SEQ ID NOS: 3 і 4 відповідно)	H42, H47, H82b
Hu9D5VLv1 (SEQ ID NO: 19)	Ідентифікаційний номер NCBI ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	L36

Hu9D5VLv2 (SEQ ID NO: 20)	Ідентифікаційний номер NCBI ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	Hi
Hu9D5VLv3 (SEQ ID NO: 21)	Ідентифікаційний номер NCBI ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	L60
Hu9D5VLv4 (SEQ ID NO: 22)	Ідентифікаційний номер NCBI ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	L8, L9, L19, L36, L39, L60, L70, L74
Hu9D5VLv5 (SEQ ID NO: 23)	Ідентифікаційний номер NCBI ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70, L74

Таблиця 10

## Нумерація залишків каркаса по Кабату

для зворотних мутацій та інших мутацій в областях Vh гуманізованого антитіла 9D5

Залишок	Важкий ланцюг BAC02114	Важкий ланцюг AAX82494	9D5 миші	Hu9D5 VHv1	Hu9D5 VHv2	Hu9D5 VHv2b	Hu9D5 VHv3	Hu9D5 VHv3b	Hu9D5 VHv4	Hu9D5 VHv4b	Hu9D5 VHv5
H42	G	D	E	G	G	E	G	G	G	G	E
H47	W	W	L	L	L	L	W	L	W	L	L
H69	I	I	F	F	F	I	F	I	I	I	I
H82	M	M	M	S	S	M	S	M	S	M	M
H82 b	S	S	S	S	L	S	L	S	L	S	L
H10 s	T	T	T	T	T	L	T	L	T	L	T



Таблиця 11

## Нумерація залишків каркаса по Кабату

для зворотних мутацій та інших мутацій в областях V<sub>k</sub> гуманізованого антитілу 9D5

Залишок	Легкий ланцюг ABC66952	9D5 миші	Hu9D5 VLv1	Hu9D5 VLv2	Hu9D5 VLv3	Hu9D5 VLv4	Hu9D5 VLv5
L8	P	A	P	P	P	A	A
L9	L	P	L	L	L	P	P
L18	P	S	P	P	P	P	S
L19	A	V	A	A	A	V	V
L36	Y	F	F	Y	Y	F	F
L39	K	R	K	K	K	R	R
L60	D	D	D	D	S	S	S
L70	D	A	D	D	D	A	A
L74	K	R	K	K	K	R	R

[00343] Вирівнювання послідовності V<sub>H</sub> 9D5 миші (SEQ ID NO: 1) з модельними послідовностями миші (1SEQ\_H і 1MQK\_H, SEQ ID NO: 2 і 62 відповідно), послідовностями акцептора людини (BAC02114 і AAX82494; SEQ ID NO: 3 і 4 відповідно), і послідовностями Hu9D5VHv1, Hu9D5VHv2, Hu9D5VHv2b, Hu9D5VHv3, Hu9D5VHv3b, Hu9D5VHv4, Hu9D5VHv4b і Hu9D5VHv5 (SEQ ID NO: 5-12 відповідно) показане на Фіг. 1A. Послідовності CDR, як визначено по Кабату, охоплені рамками, за винятком того, що перша охоплююча рамка являється поєднанням CDR-H1 по Чотіа і CDR-H1 по Кабату, з підкресленим і виділеним напівжирним шрифтом CDR-H1 по Кабату. Позиції, в яких канонічні, верніальні або інтерфейсні залишки розрізняються між послідовностями акцепторів миші і людини, є кандидатами на заміщення. Приклади верніальних/CDR-основних залишків включають залишки 2, 49, 69, 71, 75, 80 і 94 за нумерацією Кабата в Таблиці 7. Приклади традиційних/CDR-взаємодіючих залишків включають залишки 24, 48 і 73 за нумерацією Кабата в Таблиці 7. Приклади залишків інтерфейсу/упаковки (V<sub>H</sub> + V<sub>L</sub>) включають залишки 37, 39, 44, 47, 91, 93 і 103 за нумерацією Кабата в Таблиці 7.

[00344] Вирівнювання послідовності V<sub>K</sub> 9D5 миші (SEQ ID NO: 16) з модельною послідовністю миші (1MJU\_L, SEQ ID NO: 17), послідовністю акцептора людини (ABC66952, SEQ ID NO: 18) і послідовностями Hu9D5VLv1, Hu9D5VLv2, Hu9D5VLv3, Hu9D5VLv4 і Hu9D5VLv5 (SEQ ID NO: 19-23, відповідно) показане на Фіг. 1B. Послідовності CDR, як визначено по Кабату, охоплені рамками, за винятком того, що перша охоплююча рамка являється поєднанням CDR-H1 по Чотіа і CDR-H1 по Кабату, з підкресленим і виділеним напівжирним шрифтом CDR-H1 по Кабату. Позиції, в яких традиційні, верніальні або інтерфейсні залишки розрізняються між послідовностями акцепторів миші і людини, є кандидатами на заміщення. Приклади верніальних/CDR-основних залишків включають залишки 4, 35, 46, 49, 66, 68 і 69 за нумерацією Кабата в Таблиці 8. Приклади традиційних/CDR-взаємодіючих залишків включають залишки 2, 48, 64 і 71 за нумерацією Кабата в Таблиці 8. Приклади залишків інтерфейсу/упаковки (V<sub>H</sub> + V<sub>L</sub>) включають залишки 36, 38, 44, 47, 87, і 98 за нумерацією Кабата в Таблиці 8.

[00345] Обґрунтування вибору позицій, вказаних в Таблицях 9 і 11, у варіабельній області легкого ланцюга в якості кандидатів для заміни, такі.

[00346] P8A: модель показує вигин в петлі в цій позиції, тому була випробувана зворотна мутація на А для пом'якшення цього.

[00347] L9P: модель показує вигин в петлі в цій позиції, тому була випробувана зворотна мутація на Р для пом'якшення цього.

[00348] P18S: Р в цій позиції зустрічається рідше. Була випробувана мутація на S для того, щоб знизити викривлення петлі.

[00349] A19V: А і V в цій позиції зустрічаються однаково часто. Була випробувана мутація на V для того, щоб знизити викривлення петлі.

[00350] Y36F: Це залишок інтерфейсу, і зазвичай він являє собою Y або F. Y має додаткову гідроксильну групу, яка може потенційно впливати на упаковку LC + HC. Полярність Y36 може

потенційно перешкодити розміщенню залишку H95 важкого ланцюга CRD-H3. Гомологічна модель показує, що Y в цьому положенні буде формувати H-зв'язок з F100 (g) в H3 de-novo, що може привести до обмеження рухливості H3. Як F, так і Y використовувалися в окремих версіях.

5 [00351] K39R: R формує H-зв'язки з сусідніми залишками в цій петлі на відміну від K. Щоб виключити будь-який вплив на стабільність петлі, була випробувана мутація на R.

[00352] D60S: присутність D в цьому залишку показує високий ступінь ризику протеолізу. У деяких версіях він був замінений на S-залишок, який найбільш часто зустрічається в цій позиції в клітинах зародкової лінії людини. Це, як передбачено, підвищує стабільність.

[00353] D70A: D має потенціал протеолізу, тому була випробувана мутація на A.

10 [00354] K74R: R, здається, стабілізує петлю в порівнянні з K в цій позиції, тому була випробувана зворотна мутація на R.

[00355] Обґрунтування вибору позицій, вказаних в Таблицях 9 і 10, у варіабельній області важкого ланцюга в якості кандидатів для заміни, такі.

15 [00356] G42E: E має іонні взаємодії з R в позиції 44. Щоб виключити будь-який вплив, який можуть мати ці взаємодії, в деяких версіях була розглянута зворотна мутація на E.

[00357] W47L: Це залишок інтерфейсу, зазвичай W. У важкому ланцюзі 9D5 миші це L, тоді як в каркасі антитіла людини в цій позиції знаходиться W. Хоча L і W є неполярними, фенольне кільце в W може потенційно впливати на упаковку легкий ланцюг:важкий ланцюг. W і L були включені в окремі варіанти.

20 [00358] I69F: Це залишок Верн'є, частина основи CDR-H2. Відповідно до гомологічної моделі, ароматичне кільце F в мишачих послідовностях являє собою стек з ароматичним кільцем залишку Y59 CRD-H2. Залишок I в цій позиції порушує цю укладку. I і F були включені в окремі варіанти.

25 [00359] M82S: M в цій позиції дуже рідко зустрічається в каркасі антитіла людини. Більш поширеними є A або N. Зміна залишку на більш поширений S може зменшити імуногенність, яка може бути пов'язана з рідкісним M в цій позиції. Ґрунтуючись на модельних спостереженнях, існує ймовірність того, що M взаємодіє з Leu80, який є залишком зони Верн'є. M і S були включені в окремі варіанти.

30 [00360] S82(b)L: S присутній в цій позиції як в мишачих, так і в людських каркасних послідовностях, але S в цій позиції є менш частим. Судячи з того, де цей залишок знаходиться в моделі, він, можливо, може вступити в контакт з антигеном. Відомо, що залишки в каркасній області 3 важкого ланцюга зрідка вносять вклад в зв'язування. S і L були включені в окремі варіанти.

35 [00361] T108L: L є найбільш частим залишком в людських каркасах в цій позиції, тому L був випробуваний в деяких варіантах.

40 [00362] Оскільки для гуманізації варіабельної області важкого ланцюга 9D5 використовували два акцепторних каркаса людини (BAC02114 і AAX82494.1 (SEQ ID NOS: 3 і 4)), існують певні позиції каркаса, які мають різні амінокислоти в двох акцепторних каркасах. Гуманізовані варіанти варіабельної області важкого ланцюга 9D5 можуть містити кожен з двох амінокислот в цих залишках. Приклади позицій, в яких ці два акцептора розрізняються, включають позиції H19 (R або K), H40 (A або T), H44 (G або R), H49 (S або A), H77 (S або T), H82a (N або S), H83 (R або K), H84 (A або S) і H89 (V або M) за нумерацією Кабата. Обґрунтування вибору однієї амінокислоти або іншої в цих позиціях полягають в наступному.

45 [00363] H19 (R або K): R і K присутні в двох розглянутих каркасах, тому кожний залишок був випробуваний в окремих випадках.

[00364] H40 (A або T): A і T присутні в двох розглянутих каркасах, тому кожний залишок був випробуваний в окремих випадках.

[00365] H44 (G або R): G і R присутні в двох розглянутих каркасах, тому кожний залишок був випробуваний в окремих випадках.

50 [00366] H49 (S або A): це залишок Верн'є, який упаковується під CDR-H2. У послідовності миші це A. Невелика різниця розмірів і гідрофільний характер S можуть потенційно порушити основу CDR. S і A були включені в окремі версії.

[00367] H77 (S або T): S і T присутні в двох розглянутих каркасах акцептора людини, тому кожний залишок був випробуваний в окремих випадках.

55 [00368] H82a (N або S): N в цій позиції зустрічається набагато рідше, ніж S. Більш того, S, швидше за все, сприяє зв'язуванню антигена. Мутація в S була випробувана в деяких варіантах.

60 [00369] H83 (R або K): K в каркасній області 3 знаходиться близько до поверхні області зв'язування CDR. Заміна його на R, який є більш громіздким ніж K, може перешкоджати розміщенню антигена. R зустрічається найбільш часто, і K є третім за частотою в людських каркасах в цій позиції. R і K були включені в окремі варіанти.

[00370] H84 (A або S): S і A присутні в двох розглянутих каркасах, тому кожний залишок був випробуваний в окремих випадках.

[00371] H89 (V або M): V і M присутні в двох розглянутих каркасах, тому кожний залишок був випробуваний в окремих випадках.

5 [00372] П'ять варіантів варіабельної області гуманізованого легкого ланцюга і п'ять варіантів варіабельної області гуманізованого важкого ланцюга:

[00373] Hu9D5VL варіант 1 (заміна Y36F показана нижнім регістром):

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHLSNGNTYLYWfLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGVPDR  
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 19)

10 [00374] Hu9D5VL варіант 2 (без змін):

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHLSNGNTYLYWfLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGVPD  
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 20)

[00375] Hu9D5VL варіант 3 (заміна D60S показана нижнім регістром):

15 DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHLSNGNTYLYWfLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGVPsR  
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 21)

[00376] Hu9D5VL варіант 4 (P8A, L9P, A19V, Y36F, K39R, D60S, D70A і K74R показані нижнім регістром):

DIVMTQSapSLPVTTPGEPvSISCRSSKSLHLSNGNTYLYWfLQrPGQSPQLLIYRVSNLASGVPsRF  
SGSGSGTaFTLrISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 22)

20 [00377] Hu9D5VL варіант 5 (P8A, L9P, P18S, A19V, Y36F, K39R, D60S, D70A, і K74R показані нижнім регістром):

DIVMTQSapSLPVTTPGEsvSISCRSSKSLHLSNGNTYLYWfLQrPGQSPQLLIYRVSNLASGVPsRFS  
GSGSGTaFTLrISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 23)

[00378] Hu9D5VH варіант 1 (заміни W47L, I69F і M82S показані нижнім регістром):

25 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEIVAEISNSGDTTYYPD  
TVKGRFTfSRDNAKNSLYLQsNSLKAEDTAVYYCARHYYYGGGYGGWFFDVGQGTIVTVSS (SEQ ID NO: 5)

[00379] Hu9D5VH варіант 2 (W47L, I69F, M82S і S82(b)L показані нижнім регістром):

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEIVAEISNSGDTTYYPD  
TVKGRFTfSRDNAKNSLYLQsNILRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGGWFFDVGQGTIVTVSS (SEQ ID NO: 6)

[00380] Hu9D5VH варіант 2b (заміни G42E, W47L і T108L показані нижнім регістром):

35 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPeKRLEIVAEISNSGDTTYYPD  
TVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVGQGTIVTVSS (SEQ ID NO: 7)

[00381] Hu9D5VH варіант 3 (заміни I69F, M82S, M82S і S82(b)L показані нижнім регістром):

40 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVSEISNSGDTTYYPD  
TVKGRFTfSRDNAKNSLYLQsNILRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGGWFFDVGQGTIVTVSS (SEQ ID NO: 8)

[00382] Hu9D5VH варіант 3b (заміни W47L і T108L показані нижнім регістром):

45 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPeKRLEIVAEISNSGDTTYYPD  
TVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVGQGTIVTVSS (SEQ ID NO: 9)

[00383] Hu9D5VH варіант 4 (заміни M82S і S82(b)L показані нижнім регістром):

50 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVSEISNSGDTTYYPD  
TVKGRFTISRDNANTLYLQsNILRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGGWFFDVGQGTIVTVSS (SEQ ID NO: 10)

[00384] Hu9D5VH варіант 4b (заміни W47L і T108L показані нижнім регістром):

55 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKRLEIVAEISNSGDTTYYPD  
TVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVGQGTIVTVSS (SEQ ID NO: 11)

[00385] Hu9D5VH варіант 5 (заміни G42E, W47L і S82 (b) L показані нижнім регістром):

60 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPeKRLEIVAEISNSGDTTYYPD  
TVKGRFTISRDNANTLYLQMNILRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGGWFFDVGQGTIVTVSS (SEQ ID NO: 12)

[00386] Аналіз якості білка разом з аналізом потенціалу до агрегації не виявив явних кластерів, які пов'язані з агрегацією залишків, представлених в каркасних областях або CDR легкого ланцюга або важкого ланцюга антитіла 9D5 (Wang et al., MAbs1 (3): 254-267, 2009).

Приклад 8. Кінетичний аналіз зв'язування гуманізованого антитіла 9D5

60 [00387] Кінетику зв'язування всіх гуманізованих варіантів 9D5, 9D5 миші і химерного 9D5 з

рекомбінантним людським TTR F87M/L110M визначали за допомогою Biotac, як показано в Таблиці 12. Анти-людський (GE Healthcare) був іммобілізований на сенсорному чіпі C5 (без ланцюгів декстрану) через амінові з'єднання відповідно до інструкцій, представлених в анти-людському наборі GE Healthcare, а mAb були захоплені до рівня, щоб забезпечити максимальне зв'язування аналіту до 30-50 RU. Різні концентрації аналіту (рекомбінантний людський TTR F87M/L110M) пропускали через захоплений ліганд при 50 мкл/хв в рухомому буфері (HBS + 0,05% P-20, 1 мг/мл БСА) в 3-кратних розведеннях. Для кожної концентрації реакція протікала впродовж часу, що дозволяє більш високим концентраціям аналіту досягти рівноваги під час асоціації, а також, щонайменше, 10% сигналу до розпаду під час дисоціації. Щонайменше одна концентрація (не найвища або найнижча) була проаналізована з дублюючою пробою. Діапазони концентрацій аналіту були обрані на основі попередніх експериментів, щоб охопити межі вимірювань щонайменше від в 10 разів вище  $K_D$  до в 10 разів нижче  $K_D$ .

[00388] В Таблиці 12 наведені швидкість асоціації ( $k_a$ ), швидкість дисоціації ( $k_d$ ) і константа афінності зв'язування ( $K_D$ ) по Biotac мишачих, химерних і гуманізованих варіантів 9D5 для рекомбінантного людського TTR F87M/L110M.

Таблиця 12

Афінність зв'язування антигена антитілами 9D5 до TTR людини (F87M/L110M)

Антитіло	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	Rmax
9D5 миші	2,72E + 04	493E-04	1,82E-08	31,55
Химерне 9D5	2,59E + 05	3,50E-04	1,35E-09	47,05
Hu9D5 H2L5	1,15E + 05	7,85E-04	6,84E-09	57,6
Hu9D5 H3L1	1,52E + 04	6,57E-04	4,32E-09	54,93
Hu9D5 H4L1	2,54E + 05	5,33E-04	2,09E-09	43,91

[00389] Ці результати показують, що афінність 9D5 миші до TTR-F87M/L110M ( $K_D = 1,82E-08M$ ) була трохи поліпшена в химерному варіанті 9D5 ( $K_D = 1,35E-09M$ ). Крім того, повністю гуманізовані варіанти 9D5 мають подібні значення афінності у вузькому нМ діапазоні. Hu9D5 H4L1 володіє найсильнішою афінністю ( $K_D = 2,09E-09$ ) серед гуманізованих варіантів 9D5.

Приклад 9. Дизайн гуманізованих антитіл 14G8

[00390] Відправною точкою або донорським антитілом для гуманізації було мишаче антитіло 14G8. Амінокислотна послідовність важкого ланцюга зрілого m14G8 представлена як SEQ ID NO: 61. Амінокислотна послідовність легкого ланцюга зрілого m14G8 представлена як SEQ ID NO: 70. Амінокислотні послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 важкого ланцюга представлені як SEQ ID NO: 67-69 відповідно (як визначено по Кабату). Комбінована по Чотіа-Кабату CDR-H1 представлена як SEQ ID NO: 118. Амінокислотні послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 легкого ланцюга представлені як SEQ ID NO: 77-79 відповідно (як визначено по Кабату). Варіантна версія CDR1 надана як SEQ ID NO: 80. У цьому прикладі використовується нумерація Кабату.

[00391] Варіабельна каппа (Vk) антитіла m14G8 відноситься до підгрупи 2 миші по Кабату, що відповідає підгрупі 2 людини по Кабату. Варіабельна важка (Vh) антитіла m14G8 відноситься до підгрупи 3d миші по Кабату, що відповідає підгрупі 1 по Кабату. Дивіться Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, 1991. CDR-L1 з 16 залишків відноситься до традиційного класу 3, CDR-L2 з 7 залишків відноситься до традиційного класу 1, а CDR-L3 з 9 залишків відноситься до традиційного класу 1 в Vk. Дивіться Martin & Thornton, J. Mol. Biol. 263:800-15, 1996. Комбінована по Чотіа-Кабату CDR-H1 з 10 залишків відноситься до традиційного класу 1, і CDR-H2 з 17 залишків відноситься до традиційного класу 1. Дивіться Martin & Thornton, J Mol. Biol. 263:800-15, 1996. CDR-H3 не має традиційних класів, але петля з 15 залишків, ймовірно, має вигнуту основу відповідно до правил Shirai et al., FEBS Lett. 455:188-97 (1999).

[00392] Залишки в зоні взаємодії доменів Vk і Vh є такими, які зазвичай можна спостерігати, за винятком L47, оскільки зазвичай в цій позиції зустрічається W.

[00393] Було проведено пошук по білковим послідовностям в базі даних PDB (Deshpande et al., Nucleic Acids Res. 33: D233-7, 2005), щоб знайти структури, які надали б грубу структурну модель 14G8. Кристалічна структура Fab з активністю естерази (pdb 1MJU) використовувалася в якості моделі для структури Vk. Вона була побудована з роздільною здатністю 1,22 Å, і містить ті ж традиційні структури для CDR-H1 і CDR-H2, і також містить CDR-H3 такої ж довжини, із зігнутою основою. Для структури Vh використовували Fv-фрагмент антитіла 7E2 - антитіла до цитохром-С оксидази (код pdb 1MQK\_H). Вона має роздільну здатність 1,28 Å і зберігає ту ж

традиційну структуру для петель, як і в 14G8. Програмне забезпечення BioLuminate (ліцензія від Schrodinger Inc.) використовувалося для моделювання грубої структури 14G8.

[00394] Пошук по базі даних з NCBI, яка не містить надлишкових білкових послідовностей, дозволив вибрати відповідні каркаси антитіла людини для перенесення CDR миші. Для Vh були обрані важкі ланцюги людського Ig з ідентифікаційними номерами NCBI AAD30410.1 і AAX82494.1. Вони мають загальні традиційні форми з доменами CDR-H1 і H2 антитіла 14G8, а H3 AAD30410.1 має довжину 15 залишків з передбаченою вигнутою основою. Для Vk були обрані два людські каппа-легкі ланцюги з ідентифікаційними номерами NCBI ABA71374.1 і ABC66952.1. Вони мають однакові традиційні класи для LCDR.

[00395] Були сконструйовані три гуманізовані варіанти варіабельної області важкого ланцюга і три гуманізовані варіанти варіабельної області легкого ланцюга, які містять різні перестановки замін (Hu14G8VHv1-3 (SEQ ID NO: 64-66 відповідно) і Hu14G8VLv1-3 (SEQ ID NO: 74-76, відповідно)) (Таблиці 13 та 14). Ілюстративні гуманізовані конструкції Vh і Vk із зворотними мутаціями та іншими мутаціями, на основі вибраних людських каркасів показані в Таблицях 13 та 14 відповідно. Заштриховані сірим області в першому стовпчику в Таблицях 13 і 14 позначають CDR, як визначено по Чотіа, а заштриховані сірим в інших стовпчиках в Таблицях 13 і 14 позначають CDR, як визначено по Кабату. SEQ ID NO: 64-66 і 74-76 містять зворотні мутації та інші мутації, як показано в Таблиці 15. Амінокислоти в позиціях H1, H3, H47, H105, L8, L9, L19, L26, L36, L60 і L70 в Hu14G8VHv1-3, і в Hu14G8VLv1-3 перераховані в Таблицях 16 та 17.

Таблиця 13

## Гуманізовані області Vh 14G8

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VH 14G8 миші (SEQ ID NO: 61)	Hu VH Acceptor Fr Acc № AAD30410.1 (SEQ ID NO: 63)	Hu VH Acceptor Fr Acc № AAX82494.1 (SEQ ID NO: 4)	Hu14G8 VHv1 (SEQ ID NO: 64)	Hu14G8 VHv2 (SEQ ID NO: 65)	Hu14G8 VHv3 (SEQ ID NO: 66)
1	1	1	Fr1	E	Q	Q	E	E	E
2	2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V
3	3	3	Fr1	K	Q	Q	K	Q	Q
4	4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L
5	5	5	Fr1	V	V	Q	V	V	V
6	6	6	Fr1	E	Q	E	E	E	E
7	7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G
9	9	9	Fr1	G	G	G	G	G	G

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VH 14G8 мінні (SEQ ID NO: 61)	Hu VH Acceptor Fr Acc № AAD30410.1 (SEQ ID NO: 63)	Hu VH Acceptor Fr Acc № AAX82494.1 (SEQ ID NO: 4)	Hu14G8 VHv1 (SEQ ID NO: 64)	Hu14G8 VHv2 (SEQ ID NO: 65)	Hu14G8 VHv3 (SEQ ID NO: 66)
10	10	10	Fr1	G	G	G	G	G	G
11	11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	V	V	V	V	V	V
13	13	13	Fr1	Q	Q	K	Q	Q	Q
14	14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P
15	15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	S	S	S	S	S	S
18	18	18	Fr1	L	R	L	L	L	L
19	19	19	Fr1	K	K	K	K	K	K
20	20	20	Fr1	L	L	L	L	L	L
21	21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S
22	22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C
23	23	23	Fr1	A	A	A	A	A	A
24	24	24	Fr1	A	A	A	A	A	A
25	25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S
26	26	26	Fr1	G	G	G	G	G	G
27	27	27	Fr1	F	F	F	F	F	F
28	28	28	Fr1	T	T	T	T	T	T
29	29	29	Fr1	F	F	F	F	F	F
30	30	30	Fr1	S	S	S	S	S	S
31	31	31	CDR-H1	S	S	S	S	S	S
32	32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	33	CDR-H1	T	A	G	T	T	T
34	34	34	CDR-H1	M	M	M	M	M	M
35	35	35	CDR-H1	S	S	S	S	S	S
36	36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W
37	37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V
38	38	38	Fr2	R	R	R	R	R	R
39	39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VH 14G8 миші (SEQ ID NO: 61)	Hu VH Acceptor Fr Acc № AAD30410.1 (SEQ ID NO: 63)	Hu VH Acceptor Fr Acc № AAX82494.1 (SEQ ID NO: 4)	Hu14G8 VHv1 (SEQ ID NO: 64)	Hu14G8 VHv2 (SEQ ID NO: 65)	Hu14G8 VHv3 (SEQ ID NO: 66)
40	40	40	Fr2	T	T	T	T	T	T
41	41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P
42	42	42	Fr2	E	E	D	E	E	E
43	43	43	Fr2	K	K	K	K	K	K
44	44	44	Fr2	R	R	R	R	R	R
45	45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L
46	46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E
47	47	47	Fr2	L	W	W	L	L	L
48	48	48	Fr2	V	V	V	V	V	V
49	49	49	Fr2	A	A	A	A	A	A
50	50	50	CDR-H2	E	A	T	E	E	E
51	51	51	CDR-H2	I	I	I	I	I	I
52	52	52	CDR-H2	N	S	S	N	N	N
52 A	52A	53	CDR-H2	N	T	S	N	N	N
53	53	54	CDR-H2	S	D	G	S	S	S
54	54	55	CDR-H2	G	G	G	G	G	G
55	55	56	CDR-H2	D	S	S	D	D	D
56	56	57	CDR-H2	T	F	Y	T	T	T
57	57	58	CDR-H2	T	I	T	T	T	T
58	58	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
59	59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	60	61	CDR-H2	P	A	P	P	P	P
61	61	62	CDR-H2	D	D	D	D	D	D
62	62	63	CDR-H2	T	T	S	T	T	T
63	63	64	CDR-H2	V	V	V	V	V	V
64	64	65	CDR-H2	K	K	K	K	K	K
65	65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G	G
66	66	67	Fr3	R	R	R	R	R	R
67	67	68	Fr3	F	F	F	F	F	F

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабагу	Лінійний № залишку	FR або CDR	VH 14G8 миші (SEQ ID NO: 61)	Hu VH Acceptor Fr Acc № AAD30410.1 (SEQ ID NO: 63)	Hu VH Acceptor Fr Acc № AAX82494.1 (SEQ ID NO: 4)	Hu14G8 VHv1 (SEQ ID NO: 64)	Hu14G8 VHv2 (SEQ ID NO: 65)	Hu14G8 VHv3 (SEQ ID NO: 66)
68	68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T
69	69	70	Fr3	I	I	I	I	I	I
70	70	71	Fr3	S	S	S	S	S	S
71	71	72	Fr3	R	G	R	R	R	R
72	72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D
73	73	74	Fr3	N	N	N	N	N	N
74	74	75	Fr3	A	S	A	A	A	A
75	75	76	Fr3	K	K	K	K	K	K
76	76	77	Fr3	N	N	N	N	N	N
77	77	78	Fr3	T	T	T	T	T	T
78	78	79	Fr3	L	L	L	L	L	L
79	79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	80	81	Fr3	L	L	L	L	L	L
81	81	82	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q	Q
82	82	83	Fr3	M	M	M	M	M	M
82 A	82A	84	Fr3	S	N	S	S	S	N
82 B	82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S
82 C	82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L
83	83	87	Fr3	K	R	K	K	K	R
84	84	88	Fr3	S	A	S	S	S	A
85	85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E
86	86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D
87	87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T
88	88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A
89	89	93	Fr3	M	V	M	M	M	V
90	90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
92	92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C



№ залишку по Чотгіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VH 14G8 миші (SEQ ID NO: 61)	Hu VH Acceptor Fr Acc № AAD30410.1 (SEQ ID NO: 63)	Hu VH Acceptor Fr Acc № AAX82494.1 (SEQ ID NO: 4)	Hu14G8 VHv1 (SEQ ID NO: 64)	Hu14G8 VHv2 (SEQ ID NO: 65)	Hu14G8 VHv3 (SEQ ID NO: 66)
93	93	97	Fr3	A	A	A	A	A	A
94	94	98	Fr3	R	K	R	R	R	R
95	95	99	CDR-H3	H	D	L	H	H	H
96	96	100	CDR-H3	Y	R	Y	Y	Y	Y
97	97	101	CDR-H3	Y	G	Y	Y	Y	Y
98	98	102	CDR-H3	Y	I	G	Y	Y	Y
99	99	103	CDR-H3	G	D	Y	G	G	G
100	100	104	CDR-H3	G	A	R	G	G	G
100 A	100 A	105	CDR-H3	G	T	Y	G	G	G
100 B	100 B	106	CDR-H3	Y	A	Y	Y	Y	Y
100 C	100 C	107	CDR-H3	G	Q	F	G	G	G
100 D	100 D	108	CDR-H3	G	V	-	G	G	G
100 E	100E	109	CDR-H3	W	G	-	W	W	W
100 F	100F	110	CDR-H3	F	R	-	F	F	F
100 G	100 G	111	CDR-H3	F	F	-	F	F	F
101	101	112	CDR-H3	D	D	D	D	D	D
102	102	113	CDR-H3	V	P	Y	V	V	V
103	103	114	Fr4	W	W	W	W	W	W
104	104	115	Fr4	G	G	G	G	G	G
105	105	116	Fr4	T	Q	Q	T	Q	Q
106	106	117	Fr4	G	G	G	G	G	G
107	107	118	Fr4	T	T	T	T	T	T
108	108	119	Fr4	T	L	M	L	L	L
109	109	120	Fr4	V	V	V	V	V	V

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VH 14G8 миші (SEQ ID NO: 61)	Hu VH Acceptor Fr Acc № AAD30410.1 (SEQ ID NO: 63)	Hu VH Acceptor Fr Acc № AAX82494.1 (SEQ ID NO: 4)	Hu14G8 VHv1 (SEQ ID NO: 64)	Hu14G8 VHv2 (SEQ ID NO: 65)	Hu14G8 VHv3 (SEQ ID NO: 66)
110	110	121	Fr4	T	T	T	T	T	T
111	111	122	Fr4	V	V	V	V	V	V
112	112	123	Fr4	S	S	S	S	S	S
113	113	124	Fr4	S	S	S	S	S	S

Таблиця 14

## Гуманізовані області Vk 14G8

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VL 14G8 миші (SEQ ID NO: 70)	Hu VL Acceptor Fr Acc № ABA71374.1 (SEQ ID NO: 72)	Hu VL Acceptor Fr Acc № ABC66952.1 (SEQ ID NO: 73)	Hu14G8 VLv1 (SEQ ID NO: 74)	Hu14G8 VLv2 (SEQ ID NO: 75)	Hu14G8 VLv3 (SEQ ID NO: 76)
1	1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D
2	2	2	Fr1	I	I	I	I	I	I
3	3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V
4	4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M
5	5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T
6	6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	7	Fr1	A	T	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	A	P	P	A	P	P
9	9	9	Fr1	P	L	L	P	L	L
10	10	10	Fr1	S	S	S	S	S	S
11	11	11	Fr1	V	L	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	P	P	P	P	P	P
13	13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V
14	14	14	Fr1	T	T	T	T	T	T
15	15	15	Fr1	P	P	P	P	P	P
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	E	E	E	E	E	E
18	18	18	Fr1	S	S	P	S	P	P
19	19	19	Fr1	V	A	A	V	A	A
20	20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S
21	21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I
22	22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S
23	23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C
24	24	24	CDR-L1	R	R	R	R	R	R
25	25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
26	26	26	CDR-L1	N	S	N	N	N	S
27	27	27	CDR-L1	K	Q	Q	K	K	K
27A	27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27B	27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
27C	27C	30	CDR-L1	L	R	L	L	L	L

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VL 14G8 миші (SEQ ID NO: 70)	Hu VL Acceptor Fr Acc № ABA71374.1 (SEQ ID NO: 72)	Hu VL Acceptor Fr Acc № ABC66952.1 (SEQ ID NO: 73)	Hu14G8 VLv1 (SEQ ID NO: 74)	Hu14G8 VLv2 (SEQ ID NO: 75)	Hu14G8 VLv3 (SEQ ID NO: 76)
27D	27D	31	CDR-L1	H	H	Y	H	H	H
27E	27E	32	CDR-L1	S	Y	S	S	S	S
27F	27F	33	CDR-L1	N	S	N	N	N	N
28	28	34	CDR-L1	G	G	G	G	G	G
29	29	35	CDR-L1	N	Y	Y	N	N	N
30	30	36	CDR-L1	T	T	N	T	T	T
31	31	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
32	32	38	CDR-L1	L	I	L	L	L	L
33	33	39	CDR-L1	Y	D	D	Y	Y	Y
34	34		CDR-L1						
35	35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W
36	36	41	Fr2	F	Y	Y	F	F	F
37	37	42	Fr2	L	L	L	L	L	L
38	38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	39	44	Fr2	R	K	K	K	K	K
40	40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P
41	41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G
42	42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S
44	44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P
45	45	50	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
46	46	51	Fr2	L	V	L	L	L	L
47	47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L
48	48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I
49	49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
50	50	55	CDR-L2	R	L	S	R	R	R
51	51	56	CDR-L2	V	G	G	V	V	V
52	52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
53	53	58	CDR-L2	N	N	N	N	N	N
54	54	59	CDR-L2	L	R	R	L	L	L

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VL 14G8 миші (SEQ ID NO: 70)	Hu VL Acceptor Fr Acc № ABA71374.1 (SEQ ID NO: 72)	Hu VL Acceptor Fr Acc № ABC66952.1 (SEQ ID NO: 73)	Hu14G8 VLv1 (SEQ ID NO: 74)	Hu14G8 VLv2 (SEQ ID NO: 75)	Hu14G8 VLv3 (SEQ ID NO: 76)
55	55	60	CDR-L2	A	A	A	A	A	A
56	56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
57	57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G
58	58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V
59	59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P
60	60	65	Fr3	D	D	D	D	D	S
61	61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R
62	62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F
63	63	68	Fr3	S	S	S	S	S	S
64	64	69	Fr3	G	G	G	G	G	G
65	65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S
66	66	71	Fr3	G	G	G	G	G	G
67	67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S
68	68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G
69	69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T
70	70	75	Fr3	A	D	D	A	D	D
71	71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F
72	72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T
73	73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L
74	74	79	Fr3	R	K	K	K	K	K
75	75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I
76	76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S
77	77	82	Fr3	R	R	R	R	R	R
78	78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V
79	79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E
80	80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A
81	81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E
82	82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D
83	83	88	Fr3	V	V	V	V	V	V
84	84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G

№ залишку по Чотіа	№ залишку по Кабату	Лінійний № залишку	FR або CDR	VL 14G8 миші (SEQ ID NO: 70)	Hu VL Acceptor Fr Acc № ABA71374.1 (SEQ ID NO: 72)	Hu VL Acceptor Fr Acc № ABC66952.1 (SEQ ID NO: 73)	Hu14G8 VLv1 (SEQ ID NO: 74)	Hu14G8 VLv2 (SEQ ID NO: 75)	Hu14G8 VLv3 (SEQ ID NO: 76)
85	85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V
86	86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
87	87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
88	88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C
89	89	94	CDR-L3	M	M	M	M	M	M
90	90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q
91	91	96	CDR-L3	H	A	A	H	H	H
92	92	97	CDR-L3	L	L	L	L	L	L
93	93	98	CDR-L3	E	Q	Q	E	E	E
94	94	99	CDR-L3	Y	T	S	Y	Y	Y
95	95	100	CDR-L3	P	V	P	P	P	P
96	96	101	CDR-L3	L	C	Y	L	L	L
97	97	102	CDR-L3	T	S	T	T	T	T
98	98	103	Fr4	F	F	F	F	F	F
99	99	104	Fr4	G	G	G	G	G	G
100	100	105	Fr4	A	Q	Q	Q	Q	Q
101	101	106	Fr4	G	G	G	G	G	G
102	102	107	Fr4	T	T	T	T	T	T
103	103	108	Fr4	K	K	K	K	K	K
104	104	109	Fr4	L	L	L	L	L	L
105	105	110	Fr4	E	E	E	E	E	E
106	106	111	Fr4	L	I	I	I	I	I
106A	106A	112	Fr4	K	K	K	K	K	K
107	107	113	Fr4	R	R	R	R	R	R

Таблиця 15

Зворотні мутації та інші мутації  $V_H$ ,  $V_L$ 

Варіант $V_H$ або $V_L$	Послідовність екзона акцептора $V_H$ або $V_L$	Залишки каркаса донора	Залишки CDR по Кабату
Hu14G8VHv1 (SEQ ID NO: 64)	Ідентифікаційні номери NCBI AAD30410.1 і AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 і 4 відповідно)	H1, H3, H47, H105	-
Hu14G8VHv2 (SEQ ID NO: 65)	Ідентифікаційні номери NCBI AAD30410.1 і AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 і 4 відповідно)	H1, H47	-
Hu14G8VHv3 (SEQ ID NO: 66)	Ідентифікаційні номери NCBI AAD30410.1 і AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 і 4 відповідно)	H1, H47	-
Hu14G8VLv1 (SEQ ID NO: 74)	Ідентифікаційні номери NCBI ABA71374.1 і ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 і 73 відповідно)	L8, L9, L19, L36, L70	-
Hu14G8VLv2 (SEQ ID NO: 75)	Ідентифікаційні номери NCBI ABA71374.1 і ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 і 73 відповідно)	L36	-
Hu14G8VLv3 (SEQ ID NO: 76)	Ідентифікаційні номери NCBI ABA71374.1 і ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 і 73 відповідно)	L36, L60	L26

Таблиця 16

## Нумерація залишків каркаса і CDR по Кабату

для зворотних мутацій та інших мутацій в гуманізованих областях  $V_H$  антитіла 14G8

Залишок	AAD30410.1 Важкий ланцюг	AAX82494.1 Важкий ланцюг	14G8 миші	Hu14G8 VHv1	Hu14G8 VHv2	Hu14G8 VHv3
H1	Q	Q	E	E	E	E
H3	Q	Q	K	K	Q	Q
H47	W	W	L	L	L	L
H105	Q	Q	T	T	Q	Q

Таблиця 17

## Нумерація залишків каркаса і CDR по Кабату

для зворотних мутації та інших мутацій в гуманізованих областях VL антитіла 14G8

Залишок	ABA71374.1 Легкий ланцюг	ABC66952.1 Легкий ланцюг	14G8 миші	Hu14G8 VLv1	Hu14G8 VLv2	Hu14G8 VLv3
L8	P	P	A	A	P	P
L9	L	L	P	P	L	L
L19	A	A	V	V	A	A
L26	S	N	N	N	N	S
L36	Y	Y	F	F	F	F
L60	D	D	D	D	D	S
L70	D	D	A	A	D	D

[00396] Вирівнювання послідовності Vh 14G8 миші (SEQ ID NO: 61) з модельною послідовністю миші (1MQK\_H, SEQ ID NO: 62), послідовностями акцептора людини (AAD30410.1 і AAX82494.1; SEQ ID NO: 63 і 4, відповідно) і послідовностями Hu14G8VHv1, Hu14G8VHv2, і Hu14G8VHv3 (SEQ ID NO: 64-66, відповідно) показані на Фіг. 2A. Послідовності CDR, як визначено по Кабату, охоплені рамками, за винятком того, що перша охоплююча рамка являється поєднанням CDR-H1 по Чотіа і CDR-H1 по Кабату, з підкресленим і виділеним напівжирним шрифтом CDR-H1 по Кабату. Позиції, в яких канонічні, верніальні або інтерфейсні залишки розрізняються між послідовностями акцепторів миші і людини, є кандидатами на заміщення. Приклади верніальних/CDR-основних залишків включають залишки 2, 49, 69, 71, 75, 80 і 94 за нумерацією Кабата в Таблиці 13. Приклади традиційних/CDR-взаємодіючих залишків включають залишки 24, 48 і 73 за нумерацією Кабата в Таблиці 13. Приклади залишків інтерфейсу/упаковки (VH + VL) включають залишки 37, 39, 44, 47, 91, 93 і 103 за нумерацією Кабата в Таблиці 13.

[00397] Вирівнювання мишачого 9D5 Vk 14G8 (SEQ ID NO: 70) з модельною послідовністю миші (1MJU\_L, SEQ ID NO: 71), послідовностями акцептора людини (ABA71374.1 і ABC66952.1; SEQ ID NO: 72 і 73, відповідно), і послідовностями Hu14G8VLv1, Hu14G8VLv2, Hu14G8VLv3 (SEQ ID NO: 74-76, відповідно) показані на Фіг. 2B. Послідовності CDR, як визначено по Кабату, охоплені рамками, за винятком того, що перша охоплююча рамка являється поєднанням CDR-H1 по Чотіа і CDR-H1 по Кабату, з підкресленим і виділеним напівжирним шрифтом CDR-H1 по Кабату. Позиції, в яких канонічні, верніальні або інтерфейсні залишки розрізняються між послідовностями акцепторів миші і людини, є кандидатами на заміщення. Приклади верніальних/CDR-основних залишків включають залишки 4, 35, 46, 49, 66, 68 і 69 за нумерацією Кабата в Таблиці 14. Приклади традиційних/CDR-взаємодіючих залишків включають залишки 2, 48, 64 і 71 за нумерацією Кабата в Таблиці 14. Приклади залишків інтерфейсу/упаковки (VH + VL) включають залишки 36, 38, 44, 47, 87, і 98 за нумерацією Кабата в Таблиці 14.

[00398] Обґрунтування вибору позицій, вказаних в Таблицях 15 та 17, у варіабельній області легкого ланцюга в якості кандидатів для заміни, такі.

[00399] P8A: пролін має вирішальне значення для формування структури, а втрата або додавання проліну може впливати на структуру. Були розроблені зворотні мутації для того, щоб уникнути «додавання проліну». Проте, оскільки А в цій позиції рідко зустрічається в каркасах IgG людини, Р був включений в деякі варіанти.

[00400] L9P: пролін має вирішальне значення для формування структури, а втрата або додавання проліну може впливати на структуру. Були розроблені зворотні мутації для того, щоб уникнути «втрати проліну». Проте, оскільки Р в цій позиції рідко зустрічається в каркасах IgG людини, L був включений в деякі варіанти.

[00401] A19V: А і V мають аналогічні частоти в каркасах людини. Обидва залишки були включені в окремі варіанти.

[00402] N26S: L26 являє собою сайт N-глікозилювання в CDR1 легкого ланцюга. Мутація в S зменшує N-глікозилювання і дає більш гетерогенний продукт.



[00403] Y36F: Це інтерфейсний залишок. У деяких варіантах була зроблена заміна для того, щоб зберегти залишок миші в цьому залишку інтерфейсу.

[00404] D60S: D і S подібні за частотою в каркасах IgG людини. S застосовується більшістю комерційно доступних терапевтичних антитіл, тому D був замінений на S в деяких варіантах.

5 [00405] D70A: D зустрічається набагато частіше, ніж A в каркасах IgG людини. Проте D утворює іонний зв'язок з R24 в CDR1 легкого ланцюга, тому як A, так і D включені в окремі варіанти.

[00406] Обґрунтування вибору позицій, вказаних в Таблицях 15 і 16, у варіабельній області важкого ланцюга в якості кандидатів для заміни, такі.

10 [00407] Q1E: Перетворення глутамату (E) в піроглутамат (pE) відбувається повільніше, ніж з глютаміну (Q). Антитіла стають більш кислотними через втрату первинного аміну глютаміном при перетворенні в pE. Неповне перетворення створює гетерогенність в антитілі, яку можна спостерігати як множинні піки, використовуючи аналітичні методи на основі заряду. Відмінності в гетерогенності можуть вказувати на відсутність контролю процесу.

15 [00408] Q3K: Q частіше зустрічається в каркасах IgG людини. K рідше, але не є рідкісним. Обидва залишки були включені в окремі варіанти.

[00409] W47L: Це інтерфейсний залишок. У деяких варіантах була зроблена заміна для того, щоб зберегти залишок миші в цьому залишку інтерфейсу.

20 [00410] Q105T: T може утворювати водневий зв'язок з K3, тому T був включений в деякі варіанти для підтримки конформаційної структури VH.

[00411] Оскільки для гуманізації варіабельної області легкого ланцюга 14G8 використовувалися два акцепторних каркаса людини (ABA71374.1 і ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 і 73, відповідно)), існують певні позиції каркаса, які мають різні амінокислоти в двох акцепторних каркасах. Гуманізовані варіанти варіабельної області легкого ланцюга 14G8 можуть містити одну з двох таких амінокислот в цій позиції. Прикладом залишку, в якому ці два акцептора відрізняються, є позиція L18 (S або P) за нумерацією Кабата. Обґрунтування вибору однієї амінокислоти або іншої в цій позиції полягає в наступному.

[00412] L18 (S або P): P в цій позиції зустрічається рідше. Була випробувана мутація на S для того, щоб знизити викривлення петлі.

30 [00413] Оскільки для гуманізації варіабельної області зрілого важкого ланцюга 14G8 використовувалися два акцепторних каркаса людини (AAD30410.1 і AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 і 4, відповідно)), існують певні позиції каркаса, які мають різні амінокислоти в двох акцепторних каркасах. Гуманізовані варіанти варіабельної області важкого ланцюга 14G8 можуть містити будь-яку з таких амінокислот в цій позиції. Приклади залишків, в яких ці два акцептора розрізняються, включають позиції H82a (N або S), H83 (R або K), H84 (A або S) і H89 (V або M) за нумерацією Кабата. Обґрунтування вибору однієї амінокислоти або іншої в цих позиціях полягають в наступному.

[00414] H82a (N або S): N і S мають аналогічну частоту в 82a. Вони також є людськими залишками в двох шаблонах VH людини. S і N були включені в окремі варіанти.

40 [00415] H83 (R або K): K в каркасній області 3 знаходиться близько до поверхні області зв'язування CDR. Заміна його на R може перешкоджати розміщенню антигена. R зустрічається найбільш часто, і K є третім за частотою в людських каркасах в цій позиції. R і K були включені в окремі варіанти.

[00416] H84 (A або S): S і A присутні в двох розглянутих каркасах, тому кожний залишок був випробуваний в окремих випадках.

[00417] H89 (V або M): V і M присутні в двох розглянутих каркасах, тому кожний залишок був випробуваний в окремих випадках.

[00418] Три варіанти варіабельної області гуманізованого легкого ланцюга і три варіанти варіабельної області гуманізованого важкого ланцюга є наступними:

50 [00419] Hu14G8VL варіант 1 (P8A, L9P, A19V, Y36F, D70A заміни показані нижнім регістром):  
DIVMTQSAPSLPVTGPGEVSISCRSNKSLHNSNGNTYLYWfLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGVPDR  
FSGSGSGTaFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 74)

[00420] Hu14G8VL варіант 2 (заміна L36F показана нижнім регістром):

55 DIVMTQSPLSLPVTGPGEVASISCRSNKSLHNSNGNTYLYWfLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGVPDR  
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 75)

[00421] Hu14G8VL варіант 3 (заміни N26S, L36F і D60S показані нижнім регістром):

DIVMTQSPLSLPVTGPGEVASISCRSsKSLHNSNGNTYLYWfLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGVPsRF  
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 76)

[00422] Hu14G8VH варіант 1 (заміни Q1E, Q3K, W47L і Q105T показані нижнім регістром):

60 eVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSYTMWSVRQTPEKRLEIVAEINNSGDTTYYPDTVK

GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVGIGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64)

[00423] Hu14G8VH варіант 2 (заміни Q1E і W47L показані нижнім регістром):

eVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEIVAEINNSGDTTYYPDTVK  
5 GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 65)

[00424] Hu14G8VH варіант 3 (заміни Q1E і W47L показані нижнім регістром):

eVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEIVAEINNSGDTTYYPDTVK  
10 GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGGWFFDVGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 66)

Приклад 10. Кінетичний аналіз зв'язування гуманізованих антитіл 14G8

[00425] Кінетику зв'язування трьох гуманізованих варіантів 14G8 і 14G8 миші з рекомбінантним людським TTR F87M/L110M досліджували за допомогою Віасоре, як показано в Таблиці 18. Анти-людський (GE Healthcare) був іммобілізований на сенсорному чіпі C5 (без ланцюгів декстрану) через амінове з'єднання відповідно до інструкцій, представлених в анти-людському наборі GE Healthcare, а mAb були захоплені до рівня, щоб забезпечити максимальне зв'язування аналіту до 30-50 RU. Різні концентрації аналіту (рекомбінантний людський TTR F87M/L110M) пропускали через захоплений ліганд при 50мкл/хв в рухомому буфері (HBS + 0,05% P-20, 1 мг/мл БСА) в 3-кратних розведеннях. Для кожної концентрації реакція протікала впродовж часу, що дозволяє більш високим концентраціям аналіту досягти рівноваги під час асоціації, а також, щонайменше, 10% сигналу до розпаду під час дисоціації. Щонайменше одна концентрація (не найвища або найнижча) була проаналізована з дублюючої пробою. Діапазони концентрацій аналіту були обрані на основі попередніх експериментів, щоб охопити межі вимірювань щонайменше від в 10 разів вище  $K_D$  до в 10 разів нижче  $K_D$ .

25 [00426] В Таблиці 18 наведені швидкість асоціації ( $k_a$ ), швидкість дисоціації ( $k_d$ ) і константа афінності зв'язування ( $K_D$ ) мишачого 14G8, химерного 14G8, Hu14G8 H2L1, Hu14G8 H2L2, Hu14G8H2L3, і Hu14G8 H3L1 з рекомбінантним TTR F87M/L110M людини. Як показано в Таблиці 18, антитіла Hu14G8 і 14G8 миші мають подібні афінності зв'язування TTR.

**Таблиця 18**

**Афінність зв'язування антигену антитілами 14G8 до TTR людини (F87M/L110M)**

Антитіло	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$R_{max}$
14G8 миші	2,88E + 04	5,36E-04	1,86E-08	27,13
Химерне 14G8	2,51E + 05	3,46E-04	1,38E-09	51,06
Hu14G8 H2L1	3,07E + 05	6,93E-04	2,26E-09	42,03
Hu14G8 H2L2	3,26E + 05	6,83E-04	2,10E-09	51,43
Hu14G8 H2L3	2,52E + 05	3,18E-04	1,24E-09	42,41
Hu14G8 H3L1	3,86E + 05	6,77E-04	1,76E-09	44,05

30

[00427] 14G8 миші, химерне 14G8 та інша гуманізована версія 14G8 без змін в LCDR1 показали наявність додаткових легких ланцюгів на ДСН-ПААГ за відновлюючих умов. Аналіз послідовності показав, що в LCDR1 є сайт N-глікозилювання в залишку 26 за нумерацією Кабата. Цей сайт N-глікозилювання може викликати потенційні проблеми гетерогенності при виробництві. Мутація N в залишку L26 в Hu14G8VLv2 давала Hu14G8VLv3. Гуманізовані антитіла, які мають Hu14G8VLv3, показують лише один легкий ланцюг при ДСН-ПААГ в відновлюючих умовах, тим самим усуваючи потенційну проблему гетерогенності. Афінність зв'язування антигена антитілом Hu14G8 H2L3 аналогічна такій батьківського антитіла миші і химерного антитіла.

40

## Приклад 11. Матеріали та способи

## а. Протокол створення антитіл

[00428] Мишей імунізували щотижня антигенними пептидами TTR-MAP, TTR89-97-N-KLN або TTR89-97-C-KLN в ад'юванті RIBI, або щомісячно в ад'юванті TiterMax. За три-чотири дні до гібридизації, імунітет обраних мишей стимулювали четвертий раз імуногеном в фізіологічному розчині. Селезінку гомогенізували для отримання спленоцитів, і їх гібридизували з клітинами мієломи SP2/0 з використанням стандартного протоколу електрогібридизації. Гібридні клітини в селективному середовищі висівали в 96-лункові плашки і піддавали скринінгу через 7-10 днів.

## б. Протокол скринінгу антитіл

[00429] Відбір гібридами ґрунтувався на наступному скринінгу за допомогою ELISA: 96-лункові плашки ELISA покривали курячим анти-His, 1 мкг/мл ФСБ та інкубували впродовж 1 години. Плашки блокували 1% розчином БСА/ФСБ, 200 мкл/лунка впродовж 15 хвилин, потім додавали 0,5 мкг/мл pH4-TTR, 50 мкл/лунка та інкубували впродовж 1 години. pH4-TTR являє собою TTR який піддає дії низького pH (50 мМ ацетату натрію, pH 4,0) для того, щоб дисоціювати/агрегувати TTR з метою експонувати епітоп TTR89-97. Плашки двічі промивали TBS-T. Додавали супернатант з плашок гібридизації, 50 мкл/лунка та інкубували впродовж 1 години. Плашки двічі промивали TBS-T. Додавали антитіло виявлення, козяче-антимішиє (IgG1, 2a, 2b, 3 специфічне)-HRP, розбавлене 1:5000 в 0,5% БСА/ФСБ/TBS-T, 50 мкл/лунка, та інкубували впродовж 1 години. Нарешті, плашки промивали п'ять разів субстратом TBS-T і TMB, додавали 100 мкл/лунка. Через 15 хвилин прояв субстрату зупиняли 2N сірчаною кислотою, 50 мкл/лунка. Плашки зчитували при 450 нм. Були обрані лунки з OD>1,0, і клітини переносили в 24-лункову плашку. Через 3 дні вирощування клони піддавали вторинному (counter) скринінгу за допомогою вищевказаного аналізу для підтвердження зв'язування, і замінюючи нативний TTR на pH4-TTR в якості негативного вторинного скринінгу, що дозволяє вибирати клони, які продукують mAb до TTR, специфічні до ненативних форм TTR.

## с. Протоколи експресії антитіл

[00430] Плазмідні з легким ланцюгом і важким ланцюгом, під контролем CMV, які несуть гуманізовані послідовності моноклональних антитіл, трансфікували в клітини CHO-S1 (Life Technology). Був застосований подвійний відбір, щоб створити вибіркового пулу. Частково використані клітинами середовище аналізували за титром, зв'язували та аналізували з допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу/Вестерн-блоттингу. Вибрані пули використовували для створення клонів із застосуванням системи Clonепix (Molecular Devices). Клоні були ранжовані на основі титру антитіл. Вибрані клони були розмножені, і були створені їх стоки.

[00431] Найбільш високопродуктивний клон розмножували у струшуваних колбах, і культуру використовували для інокуляції 10-25-літрових одноразових біореакторів (WAVE Biotech). Суміш середовищ експресії FreeStyle-CHO, CD OptiCHO і FreeStyle F17, доповнених Glutamax (середовище і Glutamax від Life Technology), використовували в струшуваних колбах, а також для культур в одноразових біореакторах. Одноразову (batch) культуру отримували з використанням одноразового біореактора (GE Healthcare) при 37 ° C, 7% CO<sub>2</sub> при постійному перемішуванні. Зразки періодично відбирали для контролю кількості клітин, життєздатності та продукування антитіл. За необхідності вносили добавку Cell Boost (HyClone). Одноразову культуру збирали, коли життєздатність клітин починала ставати нижчою 90% (5-7 днів).

## д. Протокол очищення антитіл

[00432] Культуру клітин збирали після того, як спершу дозволяли клітинам в суспензії осідати на дно одноразового біореактора під дією сили тяжіння при 4 ° C. Зібране середовище очищували через поровий фільтр (Millistak Pod CONC, Millipore), концентрували 10-кратно за допомогою фільтрування тангенціальним потоком (Pelicon 2PLC 30K, Millipore) і стерильно фільтрували через фільтр 0,2 мкм (Opticap XL, Millipore). Концентроване, частково використане клітинами середовище потім завантажували в колонку Protein G Sepharose Fast Flow (GE Lifesciences), попередньо врівноважену в 1хФСБ, pH 7,4, використовуючи FPLC (Akta Avant, GE Lifesciences). Незв'язані білки змивали з колонки 5-10 об'ємами колонки 1хФСБ, pH 7,4 до досягнення OD<sub>280</sub> вихідного рівня. Зв'язане антитіло елюювали з колонки 2 об'ємами колонки IgG Elution Buffer (Thermo Scientific). Фракції елюата збирали, і робили pH нейтральним за допомогою 2М-ного Tris, pH 9,0 (60 мкл на 1 мл елюата).

[00433] Антитіловмістні фракції об'єднували і діалізували впродовж ночі при 4 ° C проти 1хФСБ, pH 7,4. Потім діалізований зразок стерилізували ультрафільтрацією через 0,2 мкм PES-фільтр і зберігали при 4 ° C. Кінцеву концентрацію білка визначали біцинхоніною кислотою (BCA - bicinchoninic) з використанням бичачого гамма-глобуліну в якості стандарту білка (Thermo Scientific).

## е. Протоколи експресії та очищення рекомбінантного TTR

[00434] Клітини *E. coli* (BL21-A1) трансформували плазмідом рЕТ21а(+), яка містить вставку TTR (Met-hTTR-(His)<sub>6</sub> або варіант TTR, який містить подвійну мутацію F87M/L110M. Клітини вирощували в бульйоні 2YT, який містить 100 мкг/мл ампіциліну. Експресію TTR індукували впродовж ночі при 20 °C в присутності 1 mM IPTG і 0,05% арабінози.

5 [00435] Клітини збирали центрифугуванням при 4000×g впродовж 10 хв. і зберігали при -80 °C до використання. Давали відтанути 10-15 г клітинних гранул і лізували їх в 50 мл буфера А (1×ФСБ, який містить 500 mM NaCl, 20 mM імідазолу) шляхом використання високошвидкісного приладу подрібнення LV-1 (Microfluidics, Inc.). Лізовані клітини центрифугували при 12,000 x g впродовж 15 хв, фільтрували через 0,2 мкм PES-фільтр перед очищенням на колонці His-Trap HP (GE Lifesciences). Після завантаження, колонку промивали 10 об'ємами колонки буфером А та елюювали буфером В (1×ФСБ 500 mM NaCl, 500 mM імідазол). Пікові фракції, які відповідали TTR, збирали, діалізували проти 1×ФСБ і зберігали при -80 °C до використання.

f. Приготування антигену TTR

15 [00436] Нативний антиген TTR готували шляхом розведення концентрованого стоку рекомбінантного TTR-6His до кінцевої концентрації 2,5 мкг/мл буфером 1×ФСБ. Оброблений рН4 TTR отримували шляхом інкубації рекомбінантного TTR в 50 mM ацетаті натрію в концентрації 0,2 мг/мл, рН 3,95, впродовж 72 годин при кімнатній температурі. В цих умовах TTR дисоціює на суміш мономерів і агрегованих форм TTR, які структурно відрізняються від нативного TTR. рН4-TTR потім розбавляли до кінцевої концентрації 2,5 мкг/мл в 1×ФСБ безпосередньо перед використанням в аналізі. 96-лункові плашки (Costar № 3690) покривали

20 курячим анти-his поліклональним антитілом при кімнатній температурі 50 мкл на лунку 1,0 мкг/мл (Abcam № Ab9107) в 1×PBS впродовж 1 години. Розчин для покриття відкидали і плашку блокували 250 мкл на об'єм лунки 1×БСА-вмістного блок-буфера, розведеного в 1×ФСБ (G-Biosciences № 786-193) впродовж 1 години.

25 g. Протокол ELISA

[00437] Покриті і блоковані 96-лункові плашки обробляли TTR-антигеном 50 мкл/лунка 2,5 мкг/мл (або нативний TTR, або рН4-TTR) впродовж 1 години при кімнатній температурі. Плашки потім двічі промивали 250 мкл/лунка промивного буфера (1×Тріс-буферний сольовий розчин, який містить 0,05% Tween-20). Потім промиті плашки обробляли 50 мкл/лунка відповідного

30 моноклонального антитіла проти TTR в концентраціях від 0,31 до 2,5 мкг/мл впродовж 1 години. [00438] Оброблені плашки промивали 3 рази 250 мкл/лунка промивного буфера. Після промивання, плашки обробляли впродовж 1 години 50 мкл/лунка детектуючого антитіла, яке містить розведене 1:5000 в 1×ФСБ пероксид-кон'юговане антитіло козел-анти-миша (Jackson ImmunoResearch № 115-035-164). Потім плашки промивали 3 рази перед додаванням 100 мкл субстрату ТМБ/лунка (Rockland). Реакції HRP дозволяли продовжуватись при кімнатній температурі впродовж 15 хв. до гасіння (quenching) 50 мкл 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> на об'єм лунки. Спектроскопічна абсорбція вимірювалася при довжині хвилі рівній 450 нм.

h. ДСН-ПААГ електрофорез

40 [00439] Електрофорез в ДСН-поліакриламідних гелях проводили наступним чином. 0,1-1 мкг TTR або рН 4,0-TTR в буфері для зразків 1×LDS (Life Technologies) завантажували на 10%-ий гель NusPage bis-tris і піддавали електрофорезу в буфері MES при постійних 90 В впродовж 105 хвилин. Після електрофорезу гель або фарбували в Instant Blue (Expedeon), або переносили на нітроцелюлозні фільтри для Вестерн-блоттингу.

i. Нативний ПААГ електрофорез

45 [00440] Електрофорез на нативних Тріс-гліциновому гелях проводили наступним чином. 0,1-1 мкг TTR або рН 4,0 TTR в 1×Тріс-гліциновому (Life Technologies) буфері для зразків завантажували в 10-20% Тріс-гліциновий-гель і проводили електрофорез в 1× нативному Тріс-гліциновому буфері пробігу при постійних 120В впродовж 105 хвилин. Після електрофорезу гель або фарбували в Instant Blue (Expedeon), або переносили на нітроцелюлозні фільтри для

50 Вестерн-блоттингу.

j. Вестерн-блоттинг

55 [00441] ДСН- або нативний ПААГ гелі були блоттовані на нітроцелюлозний фільтрувальний папір (iBlot, програма P7) і заблоковані буфером для блокування (Licor) впродовж 30 хвилин. Потім фільтри інкубували в 0,5 мкг/мл первинного антитіла в блокуючому буфері впродовж 1 години при кімнатній температурі (або впродовж ночі при 4 °C), а потім слідували три промивання 1×TBS, кожне по 10 хвилин. Фільтри поміщали в IRDye 800CW-кон'юговане коза-анти-миша вторинне антитіло, розбавлене 1:20000 в буфері для блокування. Після інкубації фільтрів в розчині вторинних антитіл впродовж 1 години при кімнатній температурі фільтри промивали і відображали на інфрачервоному тепловізорі Odyssey CLx (Licor).

60 k. Протокол аналізу формування фібрил TTR

[00442] Розчин 3,6 мкМ (0,2 мг/мл) TTR-Y78F в 50 мМ ацетаті натрію, pH 4,8, інкубували при 37 °C впродовж 72 годин в присутності 1,4 мкМ (0,2 мг/мл) антитіла до mis-TTR, або з ізотипним контролем. Після інкубації до суміші додавали 5X молярний надлишок тіофлавіна-Т і залишали зв'язуватися впродовж 30 хвилин. Флуорометричне вимірювання проводили при довжині хвилі випромінювання яка дорівнювала 480 нм з довжиною хвилі збудження, встановленої на 440 нм. Інгібування рівне 0% встановлювали, як інтенсивність флуоресценції в присутності ізотипних контрольного антитіла (83 д. о.) і точку 100%-вого інгібування встановлювали, як флуоресценцію за відсутності білка TTR-Y78F (38 д. о.).

[00443] Стоковий розчин TTR-V122I (близько 5 мг/мл) розбавляли в буфері з кінцевими концентраціями TTR 0,2 мг/мл, 30 мМ ацетату натрію, 5 мМ фосфату натрію, 100 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 0,02% азиду натрію, і різними концентраціями моноклонального антитіла при pH 7,2. Цей зразок діалізували проти того ж буфера при pH 4,5 впродовж 3 годин при кімнатній температурі. Зразки потім інкубували при 37 °C впродовж 72 годин. Після інкубації до суміші додавали 5X молярний надлишок тіофлавіна-Т і залишали зв'язуватися впродовж 30 хвилин. Спостереження флуоресценції тіофлавіна-Т здійснювали з використанням спектрофлуориметра Photon Technology International C60. Варіювали коефіцієнт посилення фотомножника, а ширину вхідної щілини збудження і випромінювання встановлювали в межах 2-4 нм, щоб максимізувати сигнал по відношенню до шуму. Вимірювання флуоресценції проводили з використанням 430 нм і 480 нм в якості довжин хвиль збудження і випромінювання, відповідно.

[00444]

l. Зразки серцевої тканини

[00445] Свіжозаморожені і оброблені парафіном блоки серцевої тканини з підтвердженими діагнозами мутацій ATTR були отримані від доктора Меррілл Бенсона в Університеті Індіани. Зразки включали вісім свіжих заморожених зразків і шість зразків FFPE, і для кожного зразка був поставлений діагноз ATTR або будь-який інший серцевий амілоїдоз. Діагноз для тканини був додатково підтверджений в Prothema за допомогою фарбування IHC антитілами до каппа і лямбда-легких ланцюгів і амілоїду А перед дослідженням антитіл до TTR.

m. Імуногістохімія

[00446] Імуногістохімія була виконана на злегка закріплених параформальдегідом, 10 мкм кріозрізах і на 5 мкм парафінових зрізах. Спосіб з імунопероксидазою був основною системою детектування, яке було виконано на Leica Bond Rx (Leica Biosystems, Буффало-Гроув, Іллінойс) з використанням набору для визначення Refine Bond Polymer Refine Detection Kit (DS980, Leica Biosystems). Первинні антитіла інкубували впродовж однієї години (відповідно до концентрацій в Таблиці 2) з подальшою інкубацією з кон'югатами антитіл анти-миша і анти-кролик з полімерним HRP-лінкером. Фарбування візуалізували за допомогою хромогену DAB, який продукував коричневий осад. Мікропрепарати дофарбовували гематоксиліном, зневоднювали у висхідній серії спиртів, очищали в ксилолах і накривали покривним склом CytoSeal 60 (Richard Allen Scientific, Каламазу, Мічиган). Негативний контроль полягав у проведенні всієї імуногістохімічної процедури на зрізах сусідніх ділянок тканини з неімунним ізотипним контролем IgG або за відсутності первинного антитіла.

n. Виявлення амілоїду: фарбування Congo Red і тіофлавіном-Т

[00447] Фарбування Congo red проводили для виявлення TTR амілоїду в тканині застосовуючи набір від American MasterTech (Лоді, Каліфорнія). Фарбування проводили відповідно до процедури рекомендованої виробником. Мікропрепарати фарбували розчином Congo Red впродовж 1 години з наступною диференціацією в 1% -вому гідроксиді натрію впродовж близько 15 секунд. Потім мікропрепарати ополіскували в проточній воді, зневоднювали за допомогою серії спиртів із зростаючими концентраціями, і очищали за допомогою трьох змін ксилолів, і накривали покривним склом CytoSeal 60.

[00448] Для визначення присутності TTR амілоїду в тканині використовували модифікований протокол фарбування тіофлавіном-Т (Schmidt et al., 1995). Якщо коротко, мікропрепарати дофарбовували за допомогою гематоксиліна Маєра, промивали проточною водою і фарбували відфільтрованим 0,015% розчином тіофлавіна-Т (T3516-25G, Sigma-Aldrich, Сент-Луїс, Міссурі) в 50% етанолі впродовж десяти хвилин. Потім мікропрепарати промивали в проточній воді і диференціювали в 1% (об./об.) оцтовій кислоті впродовж 10 хвилин і промивали три рази в воді. Мікропрепаратам дозволяли висохнути на повітрі до того, як вони були покриті ProLong Gold (Life Technologies).

o. Аналіз зображень

[00449] Мікропрепарати візуалізували або за допомогою мікроскопа Olympus BX61, або за допомогою цифрового сканера мікропрепаратів Hamamatsu Nanosizer 2.0HT, або спектральної конфокальної системи Leica SPE. Зображення збирали і зберігали у вигляді

файлів TIFF.

р. Аналіз зразків плазми людини за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу/Вестерн-блоттингу

[00450] Шість зразків плазми від пацієнтів, з підтвердженням V30M ATTR (зразок № 11, № 12, № 15, № 18, № 19, № 20) і шість зразків від звичайних суб'єктів (№ 21, № 22, № 23, № 24, № 25, № 27) були отримані від М. Сарайва (Університет Порту, Португалія). Зразок № С6 був звичайним зразком людської сироватки, отриманим з комерційного джерела (BioreclamationIVT). Ці зразки плазми розділяли за допомогою ДСН-ПААГ електрофорезу, і проводили Вестерн-блоттинг з 9D5 або 5A1 наступним чином. Об'єм плазми рівний 1,4 мкл розбавляли 1:8 в 1xLDS буфера для зразка за відсутності відновника (Life Technologies). Зразки розділяли за допомогою ДСН-ПААГ електрофорезу, і Вестерн-блоттингу з використанням 0,5 мкг/мл 9D5 або 5A1, як описано раніше.

q. Аналіз зразків плазми людини за допомогою плашкового аналізу MesoScale Discovery (MSD)

[00451] 96-лункові плашки MSD покривали моноклональним антитілом 6C1 в концентрації 4 мкг/мл в ФCB та інкубували впродовж 2 годин при кімнатній температурі зі струшуванням, або впродовж ночі при 4 °C. Плашки промивали три рази 1xTBST перед блокуванням 3% розчином MSD Blocker A, 150 мкл/лунка впродовж 1 години струшування. До заблокованих плашок MSD додавали 30 мкл на об'єм лунки зразків людської плазми, розведених 1:10 в буфері для зразків, що складається з 0,6% бичачого сироваткового альбуміну без глобулінів, 1,5 мМ одноосновного фосфату натрію, 8 мМ двоосновного фосфату натрію, 145 мМ хлориду натрію, 0,05% Triton X-405 і 0,05% тімеросала, на 1 годину. Плашки промивали 3 рази 1xTBST. На 1 годину додавали 50 мкл на об'єм лунки 1 мкг/мл сульфоміченого детектуючого антитіла (або антитіло 8C3 до всіх TTR, або поліклональне антитіло Dako) в буфері для зразків при кімнатній температурі зі струшуванням. Плашки промивали три рази 1xTBST з подальшим додаванням 150 мкл/лунка розчину 1X Read Buffer T (Meso Scale Discovery). Плашки потім зчитували пристроєм візуалізації MSD Sector.

г. Побудова стандартної кривої MSD

[00452] Для того, щоб кількісно визначити кількість ненативного 6C1-реакційноздатного TTR-білка, присутнього в зразках плазми людини, стандартну криву MSD будували з використанням рекомбінантного TTR-F87M/L110M як 6C1-реакційноздатного стандарту TTR. Цей варіант TTR містить дві амінокислотні заміни, які перешкоджають утворенню тетрамерів і утримують білок в мономерному стані (Jiang et al. (2001) Biochemistry 40, 11442-11452). Таким чином, цей варіант TTR розпізнається усіма mAb до mis-TTR і тому добре підходить для використання в якості еталонного стандарту в аналізі MSD.

[00453] Для того, щоб отримати стандартну криву 96-лункові плашки MSD покривали mis-TTR антитілом 6C1 в концентрації 4 мкг/мл в ФCB та інкубували впродовж 2 годин при кімнатній температурі зі струшуванням, або впродовж ночі при 4 °C. Плашки промивали три рази 1xTBST перед блокуванням 3% розчином MSD Blocker A, 150 мкл/лунка впродовж 1 години струшування. Заблоковані плашки потім обробляли впродовж 1 години 50 мкл/лунка 25 мкг/мл TTR-F87M/L110M, серійно розведеного 1:5, причому останнє розведення було буферним контролем. Плашки промивали 3 рази 1xTBST перед додаванням 50 мкл/об'єм лунки 1 мкг/мл антитіла SulfoTag-виявлення (8C3-SulfoTag або Dako pAb-SulfoTag) впродовж 1 години при кімнатній температурі при струшуванні. Як mAb 8C3, так і Dako були з приєднаною SulfoTag, і могли бути використані в якості детектуючого антитіла, оскільки вони зв'язуються з будь-яким TTR і не є конформаційно специфічними.

[00454] Після обробки детектуючим антитілом плашки тричі промивали 150 мкл 1xTBST на об'єм лунки, з подальшим додаванням 150 мкл/лунка 1x Read Buffer T (MSD). Плашки зчитували в засобі візуалізації зображень MSD, і будували калібрувальну криву TTR F87M/L110M.

s. Аналіз фагоцитозу

[00455] 1 мг/мл зразка TTR-F87M/L110M, нативного TTR або агрегованого низьким pH TTR-V30M, зв'язували через амін з барвником pHrodo впродовж 15 хв при 37°C у співвідношенні білок:барвник близько 15:4 відповідно до специфікації виробника (Thermo Scientific). Надлишок pHrodo-мітки видаляли діалізацією в спін-концентраторі з відсіканням по молекулярній масі 10K (Pierce Thermo), і pHrodo-TTR ресуспендували в 1xФCB.

[00456] Моноцити людини THP-1 культивували в середовищі для культивування клітин (RMPI, 10%-ва сироватка IgG, пеніцилін/стрептоміцин). Аліквота 20 мкг/мл міченого pHrodo TTR була окремо попередньо проінкубована з 40 мкг/мл антитіла при 37 °C в клітинному культуральному середовищі впродовж 30 хв перед додаванням 5E+04 THP-1 клітин в 1:1 об'ємному співвідношенні. Після інкубації тканинної культури (3 години) клітини промивали

середовищем для культивування клітин три рази, інкубували в середовищі впродовж 10 хв, потім двічі промивали і ресуспендували в FACS-буфері (1% ФБС (фетальна бичача сироватка) в ФБС). Інтенсивність флуоресценції червоного pHrodo детектували з використанням фільтрів червоного каналу Texas Red. Епіфлуоресцентна мікроскопія була виконана аналогічним чином.

5 Після аналізу FACS, переносили клітини які залишилися на предметне скло з лунками, і

візуалізували за допомогою інвертованої мікроскопії. Середня інтенсивність флуоресценції автоматично розраховувалася шляхом усереднення відносних інтенсивностей флуоресценції кожної окремої клітини.

Приклад 12. Антитіло-залежне поглинання TTR клітинами THP-1

10 [00457] TTR-F87M/L110M ковалентно маркували флуоресцентним pH-чутливим барвником pHrodo. Мітка pHrodo має мінімальну флуоресценцію при фізіологічному pH, але флуоресценція посилюється при поглинанні в середовищах з низьким pH ендочитарних везикул і, таким чином, позначає клітинне поглинання мічених частинок. Моноцити THP-1 додавали до pHrodo-міченого

15 TTR (нативний або ненативний, TTR-F87M/L110M) після обробки або 14G8, або ізотипним контрольним антитілом. Низькі рівні флуоресценції спостерігалися з кожним антитілом, яке інкубували з нативним TTR, і після інкубації контрольного антитіла з ненативним TTR. Проте, флуоресценція була збільшена після інкубації 14G8 з ненативним TTR (Фіг. 7A), що вказує на те, що ненативний TTR не фагоцитується ефективно в базових умовах, проте додавання антитіл до mis-TTR специфічно викликає фагоцитоз ненативного TTR.

20 [00458] Також був продемонстрований дозозалежний фагоцитоз великих, мічених pHrodo, агрегованих фібрилярних частинок TTR для кожного з mAb до mis-TTR (Фіг. 7B). Максимальне антитіло-залежне поглинання відрізнялося для кожного mAb до mis-TTR (6C1>9D5≈14G8>5A1),

25 досягаючи плато при концентраціях mAb між 5-10 мкг/мл. Різні можливості антитіл можуть відображати ізотипні відмінності і пов'язані з ними зміни в ефекторній функції між чотирма mAb до mis-TTR. Контролі, включаючи необроблені клітини або ті, які були оброблені ізотипним контрольним IgG1, не демонстрували спостережуваної або посиленої флуоресценції, відповідно.

Приклад 13. Оцінка антитіл до mis-TTR в моделі трансгенних мишей

30 [00459] Дослідження in vivo проводяться на модельній гуманізованій трансгенній миші V30M hTTR (Inoue et al., (2008) Specific pathogen free conditions prevent transthyretin amyloidosis in mouse models. Transgenic Research 17:817-826) для оцінки ефективності зв'язування і видалення агрегованого hTTR анти-TTR-антитілами.

[00460] Трансгенних мишей розводять з використанням стандартних процедур, і рівні їх циркулюючого hTTR оцінюють за допомогою ELISA. Для подальших досліджень ефективності використовують мишей з кількістю hTTR в сироватці рівною 200-400 мкг/мл. У першому блоці досліджень вивчають природне відкладення hTTR у трансгенних мишей. Виявлення відкладень hTTR починають у віці 12 місяців і повторюють кожні 3-6 місяців після цього. Дослідження ефективності починають коли у трансгенних мишей спостерігається прийнятна кількість агрегатів. Тварин ділять на три групи лікування (n=10/група) і обробляють щотижня впродовж

40 чотирьох тижнів внутрішньочеревною дозою переносника, контрольного антитіла (ізотипний контроль, 10 мг/кг тіла) або антитіла проти hTTR (10 мг/кг тіла). Через тиждень після останньої обробки мишей піддають евтаназії, тканини збирають і обробляють, а потім забарвлюють для того, щоб оцінити кількість і розмір відкладень TTR які залишилися. Використовують кількісні методи і статистику для визначення рівня кліренсу, що спостерігається між групами.

45 [00461] В альтернативному підході агрегати hTTR готують in vitro і потім вводять в нирку трансгенних мишей для затравки відкладення нових агрегатів. Заявник визначив, що ін'єкція цих препаратів може прискорити відкладення нових агрегатів передбачуваним чином. Ґрунтуючись на цих висновках, тварин присипляють, оголюють ліву нирку, і вводять в кіркову речовину нирки попередньо агрегований hTTR-матеріал. Після відповідного періоду відновлення, мишей ділять

50 на три групи лікування (n=10/група), і обробляють щотижня впродовж чотирьох-восьми тижнів внутрішньочеревною дозою переносника, контрольного антитіла (ізотипний контроль, 10 мг/кг тіла) або антитіла проти hTTR (10 мг/кг тіла). Через тиждень після останньої обробки мишей піддають евтаназії, нирки збирають і обробляють, а потім забарвлюють для того, щоб оцінити кількість і розмір відкладень TTR. Застосовують кількісні методи і статистику для визначення

55 рівня змін, що спостерігаються між групами.

Приклад 14. Оцінювання антитіл до mis-TTR в моделі імплантату Matrigel

[00462] Заявник визначив, що попередньо агрегований hTTR може бути суспендований в Matrigel (BD Bioscience, каталожний № 354263), якому дають можливість затвердіти, і який потім можна помістити підшкірно мишам. Через чотири тижні після імплантації, імплантат Matrigel

60 зберіг свою структуру, і агрегований hTTR все ще був присутній в імплантаті. Крім того,

імплантат добре переносився мишами, і антитіла проти hTTR були здатні проникати і зв'язуватися з агрегатами, суспендованими в Matrigel. Виходячи з цих відомостей, проводиться дослідження ефективності антитіл. Тварин присипляють, і імплантат, який містить попередньо агрегований hTTR, суспендований в Matrigel, підшкірно поміщають мишам. Після відповідного періоду відновлення, мишей ділять на три групи лікування (n=10/група), і обробляють щотижня впродовж від двох до чотирьох тижнів внутрішньочеревною дозою переносника, контрольного антитіла (ізотипний контроль, 10 мг/кг тіла) або антитіла проти hTTR (10 мг/кг тіла). Після останньої обробки, мишей піддають евтаназії, шкіру, яка містить імплантат, збирають і обробляють, а потім кількість відкладень TTR яка залишилась оцінюють за допомогою гістологічних та/або біохімічних методів. Використовують кількісний аналіз і статистику для визначення рівня кліренсу, що спостерігається між групами.

# ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> лю, юе  
 15 НІДЖДЖАР, Тарлохан С.  
 ЧАКРАБАРТІ, Авіджіт  
 ХІГАКІ, Джеффі Н.  
 <120> АНТИТІЛА ДО ТРАНСТИРЕТИНУ

20 <130> 057450/473373  
 <150> 62/109,002  
 <151> 2015-01-28  
 <150> 62/266,556  
 <151> 2015-12-11  
 25 <160> 118  
 <170> FastSEQ для windows версії 4.0  
 <210> 1  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 30 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> m9D5VH  
 <400> 1  
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 35 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val  
 35 40 45  
 40 Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 45 Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp  
 100 105 110  
 Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

50 <210> 2  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 55 <220>  
 <223> 1SEQ\_H  
 <400> 2  
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 60 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met Ser Trp Ala Arg Gln Thr Pro Glu Lys Lys Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 65 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys



					85					90					95	
	Ala	Arg	Gly	Ala	Met	Phe	Gly	Asn	Asp	Phe	Lys	Tyr	Pro	Met	Asp	Arg
				100					105					110		
5	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
			115					120								
	<210> 3															
	<211> 124															
	<212> PRT															
10	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
	<223> BAC02114															
	<400> 3															
15	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
	Glu	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
20	Ser	Tyr	Ile	Thr	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
	65					70				75					80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
25					85				90					95		
	Ala	Arg	Gly	Gly	Gln	Gly	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp
				100					105					110		
	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
			115					120								
30	<210> 4															
	<211> 120															
	<212> PRT															
	<213> Штучна послідовність															
35	<220>															
	<223> AAX82494															
	<400> 4															
40	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Asp	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
45	Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val
		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70				75					80	
	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95		
50	Ala	Arg	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115					120								
55	<210> 5															
	<211> 124															
	<212> PRT															
	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
60	<223> Hu9D5VHV1															
	<400> 5															
65	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Leu	Val
			35					40					45			
	Ala	Glu	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val
		50					55					60				
70	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr

```

65      70      75      80
Leu Gln Ser Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85
5  Ala Arg His Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
10 <211> 124
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> Hu9D5VHV2
15 <400> 6
    Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
    1      5      10      15
    Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
    20      25      30
    Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
    35      40      45
    Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
    50      55      60
    Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
25 65      70      75      80
    Leu Gln Ser Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
    85      90      95
    Ala Arg His Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
    100 105 110
30 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    115 120

<210> 7
35 <211> 124
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> Hu9D5VHV2b
    <400> 7
40 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
    1      5      10      15
    Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
    20      25      30
    Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
45 35      40      45
    Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
    50      55      60
    Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
    65      70      75      80
50 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
    85      90      95
    Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
    100 105 110
55 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    115 120

<210> 8
60 <211> 124
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> Hu9D5VHV3
    <400> 8
65 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
    1      5      10      15
    Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
    20      25      30
    Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
    35      40      45
70 Ser Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

```

50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Ser Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 5 Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp  
 100 105 110  
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 10  
 <210> 9  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 15  
 <220>  
 <223> Hu9D5VHV3b  
 <400> 9  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 20 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr  
 20 25 30 35 40 45  
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Leu Val  
 35 40 45 50 55 60  
 Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60 65 70 75 80  
 25 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80 85 90 95  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95 100 105 110  
 30 Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp  
 100 105 110  
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 35  
 <210> 10  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 40  
 <223> Hu9D5VHV4  
 <400> 10  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr  
 20 25 30 35 40 45  
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45 50 55 60  
 Ser Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60 65 70 75 80  
 50 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80 85 90 95  
 Leu Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95 100 105 110  
 55 Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp  
 100 105 110  
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 60  
 <210> 11  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 65  
 <223> Hu9D5VHV4b  
 <400> 11  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 70 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr  
 20 25 30 35 40 45  
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Leu Val

35 40 45  
 Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp  
 100 105 110  
 10 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
  
 <210> 12  
 <211> 124  
 15 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu9D5VHV5  
 <400> 12  
 20 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val  
 35 40 45  
 25 Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 30 Leu Gln Met Asn Leu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp  
 100 105 110  
 35 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
  
 <210> 13  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 40 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> 9D5 CDRH1 - Кабат  
 <400> 13  
 Ser Tyr Thr Met Ser  
 1 5  
 45  
  
 <210> 14  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 50 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> 9D5 CDRH2 - Кабат  
 <400> 14  
 55 Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
  
 <210> 15  
 60 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> 9D5 CDRH3 - Кабат  
 65 <400> 15  
 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp Val  
 1 5 10 15  
  
 <210> 16  
 70 <211> 112

```

<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> m9D5VL
5 <400> 16
  Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
   1           5           10           15
  Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
   20           25           30           35
10 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
   35           40           45           50
  Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
   55           60           65           70
15 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
   65           70           75           80
  Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
   85           90           95           100
  Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
   100          105          110

20 <210> 17
    <211> 112
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
25 <220>
    <223> 1MJU_L
    <400> 17
  Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
   1           5           10           15
30 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
   20           25           30           35
  Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
   35           40           45           50
  Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
   50           55           60           65
35 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
   65           70           75           80
  Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His
   85           90           95           100
40 Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
   100          105          110

    <210> 18
    <211> 112
45 <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> ABC66952
    <400> 18
50 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
   1           5           10           15
  Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
   20           25           30           35
55 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
   35           40           45           50
  Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
   50           55           60           65
  Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
   65           70           75           80
60 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
   85           90           95           100
  Leu Gln Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
   100          105          110

65 <210> 19
    <211> 112
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
70 <223> Hu9D5VLv1

```

<400> 19  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 5 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 10 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 15 Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 20  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 20 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu9D5VLv2  
 <400> 20  
 25 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 30 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 35 Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 21  
 40 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu9D5VLv3  
 45 <400> 21  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 50 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 55 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 60 Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 22  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 65 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu9D5VLv4  
 <400> 22  
 70 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Pro Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
			35					40					45			
5	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Val	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
		50					55					60				
	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile
		65				70					75				80	
	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His
					85					90					95	
10	Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
				100					105					110		
	<210> 23															
	<211> 112															
15	<212> PRT															
	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
	<223> Hu9D5VLv5															
	<400> 23															
20	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Ala	Pro	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
	1				5					10					15	
	Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser
				20					25					30		
25	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
			35					40					45			
	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Val	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
		50					55					60				
	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile
		65				70					75				80	
30	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His
					85					90					95	
	Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
				100					105					110		
	<210> 24															
35	<211> 16															
	<212> PRT															
	<213> Штучна послідовність															
	<220															

<400> 27  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr  
 5 20 25 30  
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 10 65 70 75 80  
 Leu Gln Ser Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp  
 15 100 105 110  
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 115 120 125  
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 130 135 140  
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 20 145 150 155 160  
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 165 170 175  
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 25 180 185 190  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 195 200 205  
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 210 215 220  
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 30 225 230 235 240  
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 245 250 255  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 35 260 265 270  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 275 280 285  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 290 295 300  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 40 305 310 315 320  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 325 330 335  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 45 340 345 350  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 355 360 365  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 370 375 380  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 50 385 390 395 400  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 405 410 415  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 55 420 425 430  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 435 440 445  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450  
 60  
 <210> 28  
 <211> 454  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність  
 65 <220>  
 <223> nu9D5 H2 важкий ланцюг  
 <400> 28  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 70 20 25 30



			20				25					30				
	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Leu	Val
			35					40					45			
5	Ala	Glu	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val
		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
		65				70				75					80	
	Leu	Gln	Ser	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
10	Ala	Arg	His	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Trp	Phe	Phe	Asp	
			100					105					110			
	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
			115					120					125			
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
15		130					135					140				
	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
		145				150					155				160	
	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
				165					170					175		
20	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
			180						185					190		
	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
			195					200					205			
	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro
25		210					215					220				
	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
		225				230				235					240	
	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
				245					250					255		
30	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
			260						265					270		
	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
			275					280					285			
	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
35		290					295					300				
	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
		305				310					315				320	
	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
				325						330					335	
40	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
			340						345					350		
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
			355					360					365			
	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
45		370					375					380				
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
		385				390				395					400	
	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
				405					410					415		
50	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	
			420						425				430			
	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
			435					440					445			
	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
55		450														
	<210> 29															
	<211> 454															
	<212> PRT															
60	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
	<223> Hu9D5 H2b важкий ланцюг															
	<400> 29															
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
65					5				10						15	
	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20				25					30			
	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Leu	Val
			35					40					45			
70	Ala	Glu	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val

		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70					75					80
5	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
	Ala	Arg	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Trp	Phe	Phe	Asp
				100					105					110		
	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
			115					120					125			
10	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
							135					140				
	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
	145					150					155				160	
15	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
					165					170					175	
	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
				180					185					190		
	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
			195					200					205			
20	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro
							215					220				
	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
	225					230					235				240	
25	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
					245					250					255	
	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				260					265					270		
	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
			275					280					285			
30	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
		290					295					300				
	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
	305					310					315				320	
35	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
					325					330					335	
	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
				340					345					350		
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
			355					360					365			
40	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
		370					375					380				
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
	385					390					395				400	
45	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
					405					410					415	
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
				420					425					430		
	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
			435					440					445			
50	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
		450														
	<210> 30															
	<211> 454															
55	<212> PRT															
	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
	<223> Hu9D5 H3 важкий ланцюг															
	<400> 30															
60	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
65	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
	Ser	Glu	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val
		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
	65					70					75				80	
70	Leu	Gln	Ser	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys

				85				90					95			
	Ala	Arg	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Trp	Phe	Phe	Asp
				100				105					110			
5	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
			115					120					125			
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
			130					135					140			
	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
			145					150					155			160
10	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
					165										175	
	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
					180										190	
15	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
					195											
	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro
	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
																240
20	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
																255
	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
25	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
	Val	Glu	Val	His	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
																320
30	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
																335
	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
35	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
																400
40	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
45	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
50	<210>	31														
	<211>	454														
	<212>	PRT														
	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															
	<223>	hu9D5 H3b важкий ланцюг														
55	<400>	31														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
60	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Arg	Leu	Glu	Leu	Val
	Ala	Glu	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val
65	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
																80
	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
	Ala	Arg	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Trp	Phe	Phe	Asp
70	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys

			115					120					125			
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
		130					135					140				
5	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
	145					150					155				160	
	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
					165					170					175	
10	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
				180					185					190		
	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
			195					200					205			
15	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro
		210					215					220				
	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
	225					230				235					240	
20	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
					245					250					255	
	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
			260						265					270		
25	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
			275					280					285			
	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
		290					295					300				
30	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
					310						315				320	
	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
				325						330					335	
35	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
				340					345					350		
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
			355					360					365			
40	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
		370					375					380				
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
					390						395				400	
45	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
					405				410					415		
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	
			420						425				430			
50	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
			435					440					445			
	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
		450														
45	<210> 32															
	<211> 454															
	<212> PRT															
	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
50	<223> Hu9D5 H4 важкий ланцюг															
	<400> 32															
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5				10					15		
55	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25				30			
	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
60	Ser	Glu	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val
		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
					70						75				80	
65	Leu	Gln	Ser	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85				90				95			
	Ala	Arg	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Trp	Phe	Phe	Asp
			100						105				110			
70	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
			115					120					125			
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
		130				135						140				
70	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro

	145	Val	Thr	Val	Ser	Trp	150	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	155	Thr	Ser	Gly	Val	His	160	Thr
						165						170						175		
5		Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	185	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	190	Ser	Val	
					180												195			
		Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	200	Thr	Gln	Thr	Tyr	205	Ile	Cys	Asn	
				195																
		Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	220	Arg	Val	Glu	Pro		
			210					215												
10		Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	235	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu		
							230													
		Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	255	Asp		
						245					250									
15		Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Gly		
					260															
		Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly			
				275																
		Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn			
				290				295												
20		Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp			
						310														
		Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro			
						325					330									
25		Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu			
					340						345									
		Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn			
				355					360											
		Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile			
				370				375												
30		Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr			
						390						395								
		Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys			
						405					410									
35		Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys			
					420					425					430					
		Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu			
				435					440					445						
		Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys													
				450																
40																				
		<210>	33																	
		<211>	454																	
		<212>	PRT																	
		<213>	Штучна послідовність																	
45		<220>																		
		<223>	Hu9D5 H4b важкий ланцюг																	
		<400>	33																	
		Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
		1				5					10					15				
50		Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	25	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Tyr			
					20											30				
		Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	40	Gly	Lys	Arg	Leu	Glu	Leu	Val		
				35											45					
55		Ala	Glu	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val			
				50				55						60						
		Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr			
							70					75					80			
		Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys			
						85					90					95				
60		Ala	Arg	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Trp	Phe	Phe	Asp			
					100						105				110					
		Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys			
				115							120				125					
65		Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly			
								135					140							
		Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro			
							150					155								
		Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr			
						165					170					175				
70		Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val			

				180					185				190			
	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
			195					200					205			
5	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro
		210					215					220				
	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
						230					235					240
	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
					245					250					255	
10	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				260					265					270		
	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
			275					280					285			
15	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
		290					295					300				
	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
					310						315					320
	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
					325					330					335	
20	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
				340					345					350		
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
			355					360					365			
25	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
		370					375					380				
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
		385					390				395					400
	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
					405					410					415	
30	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
				420					425					430		
	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
			435					440					445			
35	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
		450														
	<210> 34															
	<211> 454															
	<212> PRT															
40	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
	<223> Hu9D5 H5 важкий ланцюг															
	<400> 34															
45	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Leu	Val
			35					40					45			
50	Ala	Glu	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val
		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
					70					75						80
55	Leu	Gln	Met	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90				95		
	Ala	Arg	His	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Trp	Phe	Phe	Asp	
				100				105					110			
	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
			115					120					125			
60	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
		130					135					140				
	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
		145				150					155					160
65	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
					165					170					175	
	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
				180					185					190		
	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
			195					200					205			
70	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro

```

      210      215      220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
5  Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
    245 250 255
    Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
      260 265 270
    Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
      275 280 285
10  Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
    290 295 300
    Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
    305 310 315 320
15  Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
    325 330 335
    Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
      340 345 350
    Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
      355 360 365
20  Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
    370 375 380
    Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
    385 390 395 400
25  Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
    405 410 415
    Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
      420 425 430
    Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
      435 440 445
30  Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450

```

```

<210> 35
<211> 219
35 <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> Hu9D5 L1 легкий ланцюг
    <400> 35
40 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
    1 5 10 15
    Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
      20 25 30
45 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
    35 40 45
    Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
      50 55 60
    Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
    65 70 75 80
50 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
      85 90 95
    Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100 105 110
    Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
      115 120 125
55 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130 135 140
    Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
    145 150 155 160
60 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
      165 170 175
    Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
      180 185 190
65 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
    195 200 205
    Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210 215

```

```

<210> 36
70 <211> 219

```

```

<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Hu9D5 L2 легкий ланцюг
5 <400> 36
  Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
    1           5           10           15
  Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
    20           25           30           35
10 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
    40           45           50           55
  Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
    60           65           70           75
15 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
    80           85           90           95
  Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
   100           105           110           115
  Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
   120           125           130           135
20 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
   140           145           150           155
  Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
   160           165           170           175
  Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
   180           185           190           195
25 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
   200           205           210           215
  Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
   220           225           230           235
30 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
   240           245           250           255
  Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
   260           265           270           275

35 <210> 37
    <211> 219
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> Hu9D5 L3 легкий ланцюг
40 <400> 37
  Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
    1           5           10           15
  Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
    20           25           30           35
45 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
    40           45           50           55
  Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
    60           65           70           75
50 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
    80           85           90           95
  Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
   100           105           110           115
  Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
   120           125           130           135
55 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
   140           145           150           155
  Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
   160           165           170           175
60 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
   180           185           190           195
  Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
   200           205           210           215
  Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
   220           225           230           235
65 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
   240           245           250           255
  Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
   260           265           270           275

70

```



<210> 38  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 5 <220>  
 <223> Hu9D5 L4 легкий ланцюг  
 <400> 38  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Pro Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 10 Glu Pro Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 15 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 65 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile  
 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 20 Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125  
 25 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175  
 30 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 180 185 190  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215  
 35  
  
 <210> 39  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 40 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu9D5 L5 легкий ланцюг  
 <400> 39  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Pro Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 45 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 50 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 65 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile  
 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 55 Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125  
 60 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175  
 65 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 180 185 190  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 70 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 40  
 <211> 429  
 5 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> m9D5VN з сигнальним пептидом  
 <400> 40

```

10 atggactttg ggctcagctt gatttttcctt gtccttggtt taaaagggtgt cctgtgtgaa 60
   gtgaagctgg tggagtctgg gggagggtta gtgcagcctg gaggggtccct gaaactctcc 120
   tgtgcagcct ctggattcac ttccagtagc tataccatgt cttgggttcg ccagactcca 180
   gaaaagaggc tggagttggc cgcagaaatt agtaatagtg gtgataccac ctactatcca 240
   gacactgtaa agggccgatt caccttctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
15 caaatgagca gtctgaagtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag acattattac 360
   tatgggtggg gctacggggg gtggttcttc gatgtctggg gcacagggac cacgggtcac 420
   gtctcctcg                                     429
  
```

<210> 41  
 <211> 143  
 20 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> m9D5VN з сигнальним пептидом  
 <400> 41

```

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

<210> 42  
 45 <211> 396  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> m9D5VL з сигнальним пептидом  
 <400> 42

```

50 atgaggtgcc tagctgagtt cctggggctg cttgtgctct ggatccctgg agccattggg 60
   gatattgtga tgactcaggc tgcaccctct gtacctgtca ctcctggaga gtcagtatcc 120
   atctcctgca ggtctagtaa gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgtattgg 180
   ttctgcaga ggccaggcca gtctcctcaa ctcctgatat atcggggtgc caaccttgcc 240
55 tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 300
   agtagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgta tgcaacattt agaatatccg 360
   ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 396
  
```

<210> 43  
 <211> 132  
 60 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> m9D5VL з сигнальним пептидом  
 <400> 43

```

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

Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg  
 50 55 60  
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala  
 65 70 75 80  
 5 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe  
 85 90 95  
 Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
 100 105 110  
 10 Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys  
 115 120 125  
 Leu Glu Leu Lys  
 130

<210> 44  
 <211> 372  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu9D5VHV1  
 <400> 44

20 gaggtgcagc tgggtggagtc cggcgggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgcgcctg 60  
 tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcctacacca tgccttgggt gcgccaggcc 120  
 cccggcaagg gcctggagct ggtggccgag atctccaact ccggcgacac cacctactac 180  
 cccgacaccg tgaagggccg cttcaccttc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240  
 25 ctgcagtcca actccctgaa ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgccactac 300  
 tactacggcg gcggctacgg cggctggttc ttcgacgtgt ggggccaggg caccaccgtg 360  
 accgtgtcct ca 372

<210> 45  
 <211> 372  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu9D5VHV2  
 <400> 45

30 gaggtgcagc tgggtggagtc cggcgggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgcgcctg 60  
 tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcctacacca tgccttgggt gcgccaggcc 120  
 cccggcaagg gcctggagct ggtggccgag atctccaact ccggcgacac cacctactac 180  
 cccgacaccg tgaagggccg cttcaccttc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240  
 35 ctgcagtcca acctgctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgccactac 300  
 tactacggcg gcggctacgg cggctggttc ttcgacgtgt ggggccaggg caccaccgtg 360  
 accgtgtcct ca 372

<210> 46  
 <211> 372  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu9D5VHV2b  
 <400> 46

40 gaggtgcaac tgggtggagtc tggcgggcggc ttggtgcaac ctggcggctc cctgaagctg 60  
 tcctgtgccg cctccggctt caccttcagc agctatacca tgccttgggt gcgccaacc 120  
 cccgagaaga ggctggagtt ggtggctgag attagtaata gcggcgatac cacctactat 180  
 cccgataccg tgaagggccg cttcaccatt tccagagata atgctaagaa taccctgtat 240  
 45 ctgcaaatga gtagcctgaa gtctgaggat accgctatgt attattgtgc tagacattat 300  
 tattatggcg gcggctatgg cggctggttc ttcgatgtgt ggggccaagg caccctggtc 360  
 accgtgtcct ca 372

<210> 47  
 <211> 372  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu9D5VHV3  
 <400> 47

50 gaggtgcagc tgggtggagtc cggcgggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgcgcctg 60  
 tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcctacacca tgccttgggt gcgccaggcc 120  
 cccggcaagg gcctggagtg ggtgtccgag atctccaact ccggcgacac cacctactac 180  
 cccgacaccg tgaagggccg cttcaccttc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240  
 55 ctgcagtcca acctgctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgccactac 300  
 tactacggcg gcggctacgg cggctggttc ttcgacgtgt ggggccaggg caccaccgtg 360  
 accgtgtcct ca 372

<210> 48

<211> 372  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 5 <223> Hu9D5VHV3b  
 <400> 48  
 gaggtgcaac tgggtggagtc tggcggcggc ttggtgcaac ctggcggctc cctgaagctg 60  
 tcctgtgccg cctccggctt caccttcagc agctatacca tgtcttgggt gcgccaacc 120  
 cccgggaaga ggctggagtt ggtggctgag attagtaata gcggcgatac cacctactat 180  
 10 cccgataaccg tgaagggccg cttcaccatt tccagagata atgctaagaa taccctgtat 240  
 ctgcaaatga gtagcctgaa gtctgaggat accgctatgt attattgtgc tagacattat 300  
 tattatggcg gcggctatgg cggctggttc ttcgatgtgt ggggccaagg caccctggtc 360  
 accgtgtcct ca 372  
 <210> 49  
 15 <211> 372  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu9D5VHV4  
 20 <400> 49  
 gaggtgcagc tgggtggagtc cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgcgcttg 60  
 tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcctacacca tgtcttgggt gcgccaaggcc 120  
 cccggcaagg gcctggagtg ggtgtccgag atctccaact ccggcgacac cacctactac 180  
 cccgacaccg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240  
 25 ctgcagtcca acctgctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgccaactac 300  
 tactacggcg gcggctacgg cggctggttc ttcgacgtgt ggggccaagg caccaccgtg 360  
 accgtgtcct ca 372  
 <210> 50  
 <211> 372  
 30 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu9D5VHV4b  
 <400> 50  
 35 gaggtgcaac tgggtggagtc tggcggcggc ttggtgcaac ctggcggctc cctgaagctg 60  
 tcctgtgccg cctccggctt caccttcagc agctatacca tgtcttgggt gcgccaaggcc 120  
 cccgggaaga ggctggagtt ggtggctgag attagtaata gcggcgatac cacctactat 180  
 cccgataaccg tgaagggccg cttcaccatt tccagagata atgctaagaa taccctgtat 240  
 ctgcaaatga gtagcctgaa gtctgaggat accgctatgt attattgtgc tagacattat 300  
 40 tattatggcg gcggctatgg cggctggttc ttcgatgtgt ggggccaagg caccctggtc 360  
 accgtgtcct ca 372  
 <210> 51  
 <211> 372  
 <212> ДНК  
 45 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu9D5VHV5  
 <400> 51  
 gaggtgcagc tgggtggagtc cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgcgcttg 60  
 50 tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcctacacca tgtcttgggt gcgccaaggcc 120  
 cccgagaagc gcctggagct ggtggccgag atctccaact ccggcgacac cacctactac 180  
 cccgacaccg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa caccctgtac 240  
 ctgcagatga acctgctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgccaactac 300  
 tactacggcg gcggctacgg cggctggttc ttcgacgtgt ggggccaagg caccaccgtg 360  
 55 accgtgtcct ca 372  
 <210> 52  
 <211> 336  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 60 <220>  
 <223> Hu9D5VLv1  
 <400> 52  
 gacatcgtga tgacccagtc ccccctgtcc ctgcccgtga cccccggcga gcccgcctcc 60  
 atctcctgcc gctcctccaa gtccctgctg cactccaacg gcaacaccta cctgtactgg 120  
 65 ttcttgacaga agccccggcca gtccccccag ctgctgatct accgcgtgtc caacctggcc 180  
 tccggcgtgc ccgaccgctt ctccggctcc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240  
 tcccgcgtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagcacct ggagtagccc 300  
 ctgaccttcg gccagggcac caagctggag atcaaaa 336  
 <210> 53  
 70 <211> 336

```

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Hu9D5VLv2
5 <400> 53
gacatcgtga tgacccagtc cccctgtgcc ctgcccgtga ccccggcga gcccgcctcc 60
atctcctgcc gctcctccaa gtccctgctg cactccaacg gcaacaccta cctgtactgg 120
tacctgcaga agcccgcca gtccccccag ctgctgatct accgcgtgtc caacctggcc 180
tccggcgtgc ccgaccgctt ctccggctcc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
10 tcccgcgtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagcacct ggagtacccc 300
ctgaccttcg gccagggcac caagctggag atcaaaa 336
<210> 54
<211> 336
<212> ДНК
15 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> Hu9D5VLv3
<400> 54
gacatcgtga tgacccagtc cccctgtgcc ctgcccgtga ccccggcga gcccgcctcc 60
atctcctgcc gctcctccaa gtccctgctg cactccaacg gcaacaccta cctgtactgg 120
20 tacctgcaga agcccgcca gtccccccag ctgctgatct accgcgtgtc caacctggcc 180
tccggcgtgc cctcccgctt ctccggctcc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
tcccgcgtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagcacct ggagtacccc 300
ctgaccttcg gccagggcac caagctggag atcaaaa 336
25 <210> 55
<211> 336
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
30 <223> Hu9D5VLv4
<400> 55
gacatcgtga tgacccagtc cccccctccc ctgcccgtga ccccggcga gcccgtgtcc 60
atctcctgcc gctcctccaa gtccctgctg cactccaacg gcaacaccta cctgtactgg 120
ttcctgcagc gccccggcca gtccccccag ctgctgatct accgcgtgtc caacctggcc 180
35 tccggcgtgc cctcccgctt ctccggctcc ggctccggca ccgccttcac cctgcgcatc 240
tcccgcgtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagcacct ggagtacccc 300
ctgaccttcg gccaaggcac caagctggag atcaaaa 336
<210> 56
<211> 336
40 <212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Hu9D5VLv5
<400> 56
45 gacatcgtga tgacccagtc cccccctccc ctgcccgtga ccccggcga gtccgtgtcc 60
atctcctgcc gctcctccaa gtccctgctg cactccaacg gcaacaccta cctgtactgg 120
ttcctgcagc gccccggcca gtccccccag ctgctgatct accgcgtgtc caacctggcc 180
tccggcgtgc cctcccgctt ctccggctcc ggctccggca ccgccttcac cctgcgcatc 240
tcccgcgtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagcacct ggagtacccc 300
50 ctgaccttcg gccaaggcac caagctggag atcaaaa 336
<210> 57
<211> 19
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
55 <220>
<223> 9D5VN Сигнальний пептид
<400> 57
Met Asp Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15
60 Val Leu Cys

<210> 58
<211> 57
65 <212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> 9D5VN Сигнальний пептид
<400> 58
70 atggactttg ggctcagctt gatttttcctt gtccttgttt taaaagggtgt cctgtgt 57

```

<210> 59  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 5 <220>  
 <223> 9D5VL Сигнальний пептид  
 <400> 59  
 Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro  
 1 5 10 15  
 10 Gly Ala Ile Gly  
 20  
  
 <210> 60  
 <211> 60  
 15 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> 9D5VL Сигнальний пептид  
 <400> 60  
 20 atgaggtgcc tagctgagtt cctggggctg cttgtgctct ggatccctgg agccattggg 60  
  
 <210> 61  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 25 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> m14G8VH  
 <400> 61  
 30 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val  
 35 35 40 45  
 Ala Glu Ile Asn Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 40 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp  
 100 105 110  
 Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 45  
 <210> 62  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 50 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> 1MQK\_H  
 <400> 62  
 55 Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Ser Ile Asn Asn Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 60 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 65 Val Arg His Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 70 <210> 63

<211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 5 <223> AAD30410  
 <400> 63  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10  
 Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Ser Thr Asp Gly Ser Phe Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val  
 50 55 60  
 15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 20 Ala Lys Asp Arg Gly Ile Asp Ala Thr Ala Gln Val Gly Arg Phe Asp  
 100 105 110  
 Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 64  
 25 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu14G8VHV1  
 30 <400> 64  
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 35 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Asn Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 40 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp  
 100 105 110  
 45 Val Trp Gly Thr Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 65  
 50 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu14G8VHV2  
 <400> 65  
 55 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 60 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Asn Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 65 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp  
 100 105 110  
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 70

<210> 66  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 5 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu14G8VHV3  
 <400> 66  
 10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val  
 15 Ala Glu Ile Asn Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Asp  
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 25 <210> 67  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 30 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> 14G8 CDRH1 - Кабат  
 <400> 67  
 Ser Tyr Thr Met Ser  
 35 1 5  
 <210> 68  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 40 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> 14G8 CDRH2 - Кабат  
 <400> 68  
 Glu Ile Asn Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys  
 45 1 5 10 15  
 Gly  
 <210> 69  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 50 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> 14G8 CDRH3 - Кабат  
 <400> 69  
 55 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp Val  
 1 5 10 15  
 <210> 70  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 60 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> m14G8VL  
 <400> 70  
 65 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 70 35 40 45



Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60  
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile  
65 70 75 80  
5 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
85 90 95  
Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110  
Arg

10

<210> 71  
<211> 113  
<212> PRT  
15 <213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> MJU\_L  
<400> 71

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

25 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60  
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile  
65 70 75 80  
30 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His  
85 90 95  
Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110  
Arg

35

<210> 72  
<211> 113  
<212> PRT  
40 <213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> ABA71374  
<400> 72

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

50 Pro Gln Val Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60  
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80  
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
85 90 95  
55 Leu Gln Thr Val Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110  
Arg

60

<210> 73  
<211> 113  
<212> PRT  
65 <213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> ABC66952  
<400> 73

70 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
20 25 30

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

<210> 74  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu14G8VLv1  
 20 <400> 74  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Pro Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 25 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 30 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 35 Arg

<210> 75  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu14G8VLv2  
 40 <400> 75  
 45 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 50 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 55 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 Arg  
 60

<210> 76  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu14G8VLv3  
 65 <400> 76  
 70 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 5 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 10 Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 Arg  
 15  
 <210> 77  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 20  
 <220>  
 <223> 14G8 CDRL1 (миша, HuVLv1, HuVLv2) - Кабат  
 <400> 77  
 Arg Ser Asn Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 25  
 <210> 78  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 30  
 <220>  
 <223> 14G8 CDRL2 - Кабат  
 <400> 78  
 Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser  
 1 5  
 35  
 <210> 79  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 40  
 <220>  
 <223> 14G8 CDRL3 - Кабат  
 <400> 79  
 Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr  
 1 5  
 45  
 <210> 80  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 50  
 <220>  
 <223> 14G8 CDRL1 (HuVLv3) - Кабат  
 <400> 80  
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 55  
 <210> 81  
 <211> 454  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 60  
 <220>  
 <223> Hu14G8 H1 важкий ланцюг  
 <400> 81  
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 65 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Asn Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 70

	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70					75					80
	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
5	Ala	Arg	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Trp	Phe	Phe	Asp
				100					105					110		
	Val	Trp	Gly	Thr	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
			115					120					125			
10	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
		130					135					140				
	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
	145					150					155					160
	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
					165					170					175	
15	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
				180					185					190		
	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
			195					200					205			
20	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro
		210					215					220				
	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
	225					230					235					240
	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
					245				250					255		
25	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				260					265					270		
	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
			275					280					285			
30	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
		290					295					300				
	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
	305				310						315				320	
	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
					325					330					335	
35	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
				340					345					350		
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
			355					360					365			
40	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
		370					375					380				
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
	385					390				395						400
	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
				405					410					415		
45	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	
				420					425				430			
	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
			435					440					445			
50	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
	450															
	<210>	82														
	<211>	454														
	<212>	PRT														
55	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															
	<223>	Hu14G8 H2 важкий ланцюг														
	<400>	82														
60	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5				10						15	
	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Leu	Val
			35					40					45			
65	Ala	Glu	Ile	Asn	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val
		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70					75					80
70	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	

	Ala	Arg	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Trp	Phe	Phe	Asp
	Val	Trp	Gly	100	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	105	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	110
			115					120					125		Ser	Thr
5	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
		130					135					140				
	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
	145					150					155				160	
10	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
					165					170					175	
	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
				180					185					190		
	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
			195					200					205			
15	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro
		210					215					220				
	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
	225					230				235					240	
20	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
					245					250					255	
	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				260					265					270		
	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
			275					280					285			
25	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
		290					295					300				
	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
	305				310						315					320
30	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
					325					330					335	
	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
				340					345					350		
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
			355					360					365			
35	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
		370					375					380				
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
	385					390					395				400	
40	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
					405					410					415	
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
				420					425					430		
	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
			435					440					445			
45	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
		450														
	<210> 83															
	<211> 454															
50	<212> PRT															
	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
	<223> Hu14G8 H3 важкий ланцюг															
	<400> 83															
55	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
60	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Leu	Val
			35					40					45			
	Ala	Glu	Ile	Asn	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val
		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70					75				80	
65	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90				95		
	Ala	Arg	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Trp	Phe	Phe	Asp
				100					105					110		
70	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
			115					120					125			

	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
	130						135					140				
	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
	145					150				155						160
5	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
					165					170					175	
	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
				180					185					190		
10	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
			195					200					205			
	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro
		210					215					220				
	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
	225					230				235						240
15	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
					245					250					255	
	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				260					265					270		
20	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
			275					280					285			
	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
		290					295					300				
	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
	305				310						315					320
25	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
					325					330					335	
	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
				340					345					350		
30	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
			355					360					365			
	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
		370					375					380				
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
	385					390					395					400
35	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
					405					410					415	
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
				420					425					430		
40	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
			435					440					445			
	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
		450														
	<210> 84															
45	<211> 219															
	<212> PRT															
	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
	<223> Hu14G8 L1 легкий ланцюг															
50	<400> 84															
	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Ala	Pro	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
	1				5					10					15	
	Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Asn	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser
				20					25					30		
55	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
			35					40					45			
	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Val	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
		50					55					60				
60	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
	65				70						75				80	
	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His
				85						90				95		
	Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
				100					105					110		
65	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
			115					120					125			
	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
		130					135					140				
70	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
	145					150					155					160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 5 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

10 <210> 85  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>

15 <223> Hu14G8 L2 легкий ланцюг  
 <400> 85  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 25 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 30 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140  
 35 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175  
 40 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 180 185 190  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

45 <210> 86  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>

50 <223> Hu14G8 L3 легкий ланцюг  
 <400> 86  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 55 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 60 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 65 Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140

70

```

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145      150      155      160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
      165      170      175
5  Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
      180      185      190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
      195      200      205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
10      210      215

<210> 87
<211> 429
<212> ДНК
15 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> m14G8VN з сигнальним пептидом
<400> 87
atgaatttcg ggctcagctt gatttttcctt gtccttgctt taaaagggtgt cctgtgtgaa 60
20 gtgaagctgg tggagtctgg gggagggtta gtgcagcctg gaggggtccct gaaactctcc 120
tgtgcagcct ccggattcac ttccagtagc tataccatgt ctggggttcg ccagactcca 180
gaaaagaggc tggagtgggt cgcagaaaatt aataatagtg gtgataccac ctactatcca 240
gacactgtaa agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
caaatgagca gtctgaagtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag acattattac 360
25 tatgggtggg gctacggggg gtggttcttc gatgtctggg gcacagggac cacgggtcacc 420
gtctcctca
<210> 88
<211> 143
<212> PRT
30 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> m14G8VN з сигнальним пептидом
<400> 88
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
35 1 5 10 15
Val Leu Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
40 Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60
Glu Leu Val Ala Glu Ile Asn Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro
65 70 75 80
45 Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp
115 120 125
50 Phe Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 89
<211> 399
55 <212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> m14G8VL з сигнальним пептидом
<400> 89
atgaggtgcc tagctgagtt cctggggctg cttgtgctct ggatccctgg agccattggg 60
gatattgtga tgactcaggc tgcaccctct gtacctgtca ctccctggaga gtcagtatcc 120
atctcctgca ggtctaataa gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgtattgg 180
ttcctgcaga ggccaggcca gtctcctcaa ctccctgat atcggtgtgc caaccttgcc 240
tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 300
65 agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgta tgcaacattt agaatatccg 360
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacgt 399
<210> 90
<211> 133
<212> PRT
70 <213> Штучна послідовність

```



<220>  
 <223> m14G8VL з сигнальним пептидом  
 <400> 90

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

<210> 91  
 <211> 372  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu14G8VHV1  
 <400> 91

gaggtgaagc tgggtggagtc tggcgggcggc ttggtgcaac ctggcggctc cctgaagctg 60  
 tcctgtgccg cctccggctt caccttcagc agctatacca tgtcttgggt gcgccaacc 120  
 cccgagaaga ggctggagtt ggtggctgag attaataata gcggcgatac cacctactat 180  
 cccgataacc tgaagggccg cttcaccatt tccagagata atgctaagaa taccctgtat 240  
 ctgcaaatga gtagcctgaa gtctgaggat accgctatgt attattgtgc tagacattat 300  
 tattatggcg gcggctatgg cggctggttc ttcgatgtgt ggggcaccgg caccctggtc 360  
 accgtgtcct ca 372

<210> 92  
 <211> 372  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu14G8VHV2  
 <400> 92

gaggtgcaac tgggtggagtc tggcgggcggc ttggtgcaac ctggcggctc cctgaagctg 60  
 tcctgtgccg cctccggctt caccttcagc agctatacca tgtcttgggt gcgccaacc 120  
 cccgagaaga ggctggagtt ggtggctgag attaataata gcggcgatac cacctactat 180  
 cccgataacc tgaagggccg cttcaccatt tccagagata atgctaagaa taccctgtat 240  
 ctgcaaatga gtagcctgaa gtctgaggat accgctatgt attattgtgc tagacattat 300  
 tattatggcg gcggctatgg cggctggttc ttcgatgtgt ggggccaagg caccctggtc 360  
 accgtgtcct ca 372

<210> 93  
 <211> 372  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu14G8VHV3  
 <400> 93

gaggtgcaac tgggtggagtc tggcgggcggc ttggtgcaac ctggcggctc cctgaagctg 60  
 tcctgtgccg cctccggctt caccttcagc agctatacca tgtcttgggt gcgccaacc 120  
 cccgagaaga ggctggagtt ggtggctgag attaataata gcggcgatac cacctactat 180  
 cccgataacc tgaagggccg cttcaccatt tccagagata atgctaagaa taccctgtat 240  
 ctgcaaatga atagcctgag ggctgaggat accgctgtgt attattgtgc tagacattat 300  
 tattatggcg gcggctatgg cggctggttc ttcgatgtgt ggggccaagg caccctggtc 360  
 accgtgtcct ca 372

<210> 94  
 <211> 339  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu14G8VLV1

<400> 94  
 gatatcgtga tgacccagtc tgccccctcc ctgcctgtga cccctggcga gtccgtgtcc 60  
 atctcctgcc ggtccaacaa gagcctgctg cacagcaacg gcaacaccta cctgtactgg 120  
 5 ttcttgcaaa agcccggcca atccccctcaa ctgctgatct accgggtgtc caacctggcc 180  
 tccggcgtgc ccgatatggtt ctccggaagc ggctccggca ccgatttcac cctgaagatt 240  
 agtagagtcg aggccgagga tgtgggctgt tactactgta tgcaacactt ggagtacccc 300  
 ctgacgttcg gccaaggcac caagctggag atcaagcgt 339  
 <210> 95  
 <211> 339  
 10 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Hu14G8VLv2  
 <400> 95  
 15 gatatcgtga tgacccagtc tccccctgtcc ctgcctgtga cccctggcga gcccgcctcc 60  
 atctcctgcc ggtccaacaa gagcctgctg cacagcaacg gcaacaccta cctgtactgg 120  
 ttcttgcaaa agcccggcca atccccctcaa ctgctgatct accgggtgtc caacctggcc 180  
 tccggcgtgc ccgatatggtt ctccggaagc ggctccggca ccgatttcac cctgaagatt 240  
 agtagagtcg aggccgagga tgtgggctgt tactactgta tgcaacactt ggagtacccc 300  
 20 ctgacgttcg gccaaggcac caagctggag atcaagcgt 339  
 <210> 96  
 <211> 339  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 25 <220>  
 <223> Hu14G8VLv3  
 <400> 96  
 gatatcgtga tgacccagtc tccccctgtcc ctgcctgtga cccctggcga gcccgcctcc 60  
 atctcctgcc ggtccagcaa gagcctgctg cacagcaacg gcaacaccta cctgtactgg 120  
 30 ttcttgcaaa agcccggcca atccccctcaa ctgctgatct accgggtgtc caacctggcc 180  
 tccggcgtgc ccagtaggtt ctccggaagc ggctccggca ccgatttcac cctgaagatt 240  
 agtagagtcg aggccgagga tgtgggctgt tactactgta tgcaacactt ggagtacccc 300  
 ctgacgttcg gccaaggcac caagctggag atcaagcgt 339  
 <210> 97  
 35 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Сигнальний пептид 14G8VH  
 40 <400> 97  
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Val Leu Cys  
 45  
 <210> 98  
 <211> 57  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 50 <220>  
 <223> Сигнальний пептид 14G8VH  
 <400> 98  
 atgaatttcg gcctgagctt gattttcctg gtgctggtgt tgaagggcgt gctgtgt 57  
 <210> 99  
 55 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Сигнальний пептид 14G8VL  
 60 <400> 99  
 Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Ala Ile Gly  
 20  
 65  
 <210> 100  
 <211> 60  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 70 <220>

<223> Сигнальний пептид 14G8VL

<400> 100

atgagggtgcc tggccgagtt cctgggcctg ctggtgctgt ggatccctgg cgccatcggc 60

5 <210> 101

<211> 330

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

10 <223> Константна область важкого ланцюга IgG1 людини

<400> 101

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

15 Phe Pro Glu 20 Val Thr Val Ser 25 Asn Ser Gly 30 Ala Leu Thr Ser

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

20 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser 75 Leu Gly Thr Gln Thr

65 80

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

Arg Val Glu Pro 100 Lys Ser Cys Asp Lys 105 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

25 Pro Ala Pro 115 Glu Leu Leu Gly Gly 120 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

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

Val Val Val Asp Val Ser 150 His Glu Asp Pro 155 Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 160

Tyr Val Asp Gly Val 165 Glu Val His Asn Val 170 Lys Thr Lys Pro Arg Glu

Glu Gln Tyr Asn 180 Ser Thr Tyr Arg Val 185 Val Ser Val Leu Thr Val Leu

35 His Gln Asp Trp 195 Leu Asn Gly Lys 200 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

Lys Ala Leu Pro Ala Pro 210 Ile Glu Lys Thr Ile Ser 220 Lys Ala Lys Gly

Gln Pro Arg Glu Pro 230 Gln Val Tyr Thr Leu Pro 235 Pro Ser Arg Glu Glu

225 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys 250 Leu Val Lys Gly Phe Tyr

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

45 Asn Tyr Lys 275 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

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

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

305 320

Gln Lys Ser Leu Ser 325 Leu Ser Pro Gly Lys 330

55 <210> 102

<211> 330

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

60 <223> Константна область важкого ланцюга IgG1 людини аллотипу G1m3 IgG1

<400> 102

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

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

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

70

	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	
5	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
				100					105					110		
	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115					120					125			
10	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
		130					135					140				
	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	
15	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	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			
20	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
		210					215					220				
	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	
25	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
				260					265					270		
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
			275					280					285			
30	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
		290				295					300					
	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	Lys						
				325						330						
35																
	<210>	103														
	<211>	330														
	<212>	PRT														
	<213>	Штучна послідовність														
40	<220>															
	<223>	Константна область важкого ланцюга IgG1 людини аллотипу G1m3 IgG1														
	<400>	103														
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
	1				5				10						15	
45	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					40					45			
50	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50				55						60				
	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	
55	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			
60	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
		130					135					140				
	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	
65	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			
70	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
		210					215					220				

```

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
5  Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260      265      270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275      280      285
10 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290      295      300
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 Lys
325      330

15  <210> 104
    <211> 107
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
20  <220>
    <223> Константна область каппа легкого ланцюга людини
    <400> 104
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1      5      10      15
25  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
30  Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50      55      60
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
35  Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100      105

    <210> 105
    <211> 106
40  <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> Константна область каппа легкого ланцюга людини
    <400> 105
45  Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1      5      10      15
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20      25      30
50  Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35      40      45
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50      55      60
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65      70      75      80
55  His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85      90      95
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100      105

60  <210> 106
    <211> 990
    <212> ДНК
    <213> Штучна послідовність
    <220>
65  <223> Константна область важкого ланцюга IgG1 людини аллотипу G1m3 IgG1
    <400> 106
gcctccacca aggggtccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
70  ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagagacc 240

```

```

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc cctgccccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagctc tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
5  tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 720
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
10 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa 990
<210> 107
15 <211> 321
    <212> ДНК
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> Константна область каппа легкого ланцюга людини
20 <400> 107
    cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
    ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
    tggaagggtg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
    agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
25 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
    agcttcaaca ggggagagtg t
    <210> 108
    <211> 318
    <212> ДНК
30 <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> Константна область каппа легкого ланцюга людини
    <400> 108
    actgtggctg caccatctgt cttcatcttc cgcctatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
35 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
    aaggtggata acgcccctca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
    aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
    cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 300
    ttcaacaggg gagagtgt
    <210> 109
40 <211> 147
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 109
45 Met Ala Ser His Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gly Leu Val Phe
    1 5 10 15
    Val Ser Glu Ala Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu
    20 25 30
    Met Val Lys Val Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val
    35 40 45
50 Ala Val His Val Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe
    50 55 60
    Ala Ser Gly Lys Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr
    65 70 75 80
55 Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys
    85 90 95
    Ser Tyr Trp Lys Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu
    100 105 110
    Val Val Phe Thr Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Thr Ile Ala
    115 120 125
60 Ala Leu Leu Ser Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val Val Thr Asn
    130 135 140
    Pro Lys Glu
    145
65 <210> 110
    <211> 127
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
70 <400> 110

```

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

<210> 111  
 <211> 127  
 20 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 111  
 Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu Met Val Lys Val  
 1 5 10 15  
 25 Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val Ala Val His Val  
 20 25 30  
 Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe Ala Ser Gly Lys  
 35 40 45  
 Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr Glu Glu Gln Phe  
 50 55 60  
 30 Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys Ser Tyr Trp Lys  
 65 70 75 80  
 Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr  
 85 90 95  
 35 Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Thr Ile Ala Ala Leu Leu Ser  
 100 105 110  
 Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val Val Thr Asn Pro Lys Glu  
 115 120 125

40 <210> 112  
 <211> 138  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 112  
 45 Met Ala Ser His Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gly Leu Val Phe  
 1 5 10 15  
 Val Ser Glu Ala Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu  
 20 25 30  
 Met Val Lys Val Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val  
 35 40 45  
 50 Ala Val His Val Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe  
 50 55 60  
 Ala Ser Gly Lys Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr  
 65 70 75 80  
 55 Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys  
 85 90 95  
 Ser Tyr Trp Lys Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu  
 100 105 110  
 60 Val Val Phe Thr Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Ser Tyr Ser  
 115 120 125  
 Thr Thr Ala Val Val Thr Asn Pro Lys Glu  
 130 135

65 <210> 113  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Залишки транстиретина 89-97  
 70 <400> 113

Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala  
 1 5  
 <210> 114  
 5 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> потенціальний імуноген транстиретина  
 10 <400> 114  
 Gly Gly Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala Gly Gly Lys Gly  
 1 5 10 15  
 <210> 115  
 15 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> потенціальний імуноген транстиретина  
 20 <400> 115  
 Cys Gly Gly Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala  
 1 5 10  
 <210> 116  
 25 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> потенціальний імуноген транстиретина  
 30 <400> 116  
 Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala Cys Gly Gly  
 1 5 10  
 <210> 117  
 35 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> комбінована CDRH1 по Чотіа-Кабату антитіла 9D5  
 40 <400> 117  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser  
 1 5 10  
 <210> 118  
 45 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> комбінована CDRH1 по Чотіа-Кабату антитіла 14G8  
 50 <400> 118  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser  
 1 5 10

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 55 1. Антитіло, яке зв'язується з транстиретином і містить три CDR важкого ланцюга SEQ ID NO: 61 і три CDR легкого ланцюга SEQ ID NO: 70, за винятком того, що кожна позиція H52 і L26 є незалежно N або S.
- 60 2. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що воно містить три CDR важкого ланцюга по Кабату SEQ ID NO: 67-69, відповідно, і три CDR легкого ланцюга по Кабату SEQ ID NO: 77-79, відповідно, антитіла 14G8, за винятком того, що кожна позиція H52 і L26 є незалежно N або S.
3. Антитіло за п. 1 або 2, яке **відрізняється** тим, що CDR-H1 являє собою комбіновану CDR по Кабату-Чотіа антитіла 14G8.
- 65 4. Антитіло за п. 1 або 2, яке **відрізняється** тим, що воно містить три CDR важкого ланцюга по Кабату SEQ ID NO: 13-15, відповідно, антитіла 9D5.
5. Антитіло за пп. 1, 2 або 4, яке **відрізняється** тим, що CDR-H1 являє собою комбіновану CDR по Кабату-Чотіа антитіла 9D5.



6. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що воно являє собою химерне, гуманізоване, веніроване або людське антитіло.

7. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що воно має ізотип IgG1 людини.

5 8. Антитіло за будь-яким з пп. 1-6, яке **відрізняється** тим, що воно має ізотип IgG2 або IgG4 людини.

9. Гуманізоване антитіло за будь-яким з пп. 6-8, яке **відрізняється** тим, що воно містить варіабельну область гуманізованого зрілого важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше на 90 % ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 5-12, і варіабельну область гуманізованого зрілого легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше на 90 % ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 19-23, за винятком того, що позиція H19 являє собою R або K, позиція H40 являє собою A або T, позиція H44 являє собою G або R, позиція H49 являє собою S або A, позиція H77 являє собою S або T, позиція H82a являє собою N або S, позиція H83 являє собою R або K, позиція H84 являє собою A або S і позиція H89 являє собою V або M.

10. Гуманізоване антитіло за п. 9, яке **відрізняється** тим, що всі з наступних позицій зайняті амінокислотою, як зазначено: в позиції H47 знаходиться L, в позиції H108 знаходиться L.

11. Гуманізоване антитіло за п. 9, яке **відрізняється** тим, що воно містить варіабельну область зрілого важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше на 98 % ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 5-12, і варіабельну область зрілого легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше на 98 % ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 19-23, за винятком того, що позиція H19 являє собою R або K, позиція H40 являє собою A або T, позиція H44 являє собою G або R, позиція H49 являє собою S або A, позиція H77 являє собою S або T, позиція H82a являє собою N або S, позиція H83 являє собою R або K, позиція H84 являє собою A або S і позиція H89 являє собою V або M.

12. Гуманізоване антитіло за п. 11, яке **відрізняється** тим, що варіабельна область зрілого важкого ланцюга має амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 5-12, а варіабельна область зрілого легкого ланцюга має амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 19-23.

13. Гуманізоване антитіло за п. 12, яке **відрізняється** тим, що варіабельна область зрілого важкого ланцюга має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, а варіабельна область зрілого легкого ланцюга має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19.

14. Гуманізоване антитіло за будь-яким з пп. 6-8, яке **відрізняється** тим, що воно містить варіабельну область гуманізованого зрілого важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше на 90 % ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 64-66, і варіабельну область гуманізованого зрілого легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше на 90 % ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 74-76, за винятком того, що позиція H82a являє собою N або S, позиція H83 являє собою R або K, позиція H84 являє собою A або S, позиція H89 являє собою V або M і позиція L18 являє собою S або P.

15. Гуманізоване антитіло за п. 14, яке **відрізняється** тим, що всі з наступних позицій зайняті вказаною амінокислотою: в позиції H1 знаходиться E, в позиції H47 знаходиться L, в позиції L26 знаходиться S, в позиції L36 знаходиться F, а в позиції L60 знаходиться S.

16. Гуманізоване антитіло за п. 14, яке **відрізняється** тим, що воно містить варіабельну область зрілого важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше на 98 % ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 64-66, і варіабельну область зрілого легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність, щонайменше на 98 % ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 74-76, за винятком того, що позиція H82a являє собою N або S, позиція H83 являє собою R або K, позиція H84 являє собою A або S, позиція H89 являє собою V або M і позиція L18 являє собою S або P.

17. Гуманізоване антитіло за п. 16, яке **відрізняється** тим, що варіабельна область зрілого важкого ланцюга має амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 64-66, а варіабельна область зрілого легкого ланцюга має амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 74-76.

18. Гуманізоване антитіло за п. 17, яке **відрізняється** тим, що варіабельна область зрілого важкого ланцюга має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 65, а варіабельна область зрілого легкого ланцюга має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76.

19. Антитіло за будь-яким з пп. 1-18, яке **відрізняється** тим, що воно являє собою зв'язуючий фрагмент.

20. Антитіло за п. 19, яке **відрізняється** тим, що зв'язуючий фрагмент являє собою одноланцюгове антитіло, Fab або Fab'-фрагмент.

21. Гуманізоване антитіло за будь-яким з пп. 6-18, яке **відрізняється** тим, що варіабельна область зрілого легкого ланцюга злита з константною областю легкого ланцюга, а варіабельна область зрілого важкого ланцюга злита з константною областю важкого ланцюга.

22. Гуманізоване антитіло за п. 21, яке **відрізняється** тим, що константна область важкого ланцюга являє собою мутантну форму природної константної області важкого ланцюга людини, яка має ослаблене зв'язування з рецептором Fcγ в порівнянні з природною константною областю важкого ланцюга людини.
- 5 23. Гуманізоване антитіло за п. 21 або 22, яке **відрізняється** тим, що константна область важкого ланцюга є такою ізотипу IgG1.
24. Гуманізоване антитіло за п. 21, яке **відрізняється** тим, що варіабельна область зрілого важкого ланцюга злита з константною областю важкого ланцюга, що має послідовність SEQ ID NO: 103 з або без С-кінцевого лізину, та/або варіабельна область зрілого легкого ланцюга злита
- 10 з константною областю легкого ланцюга, що має послідовність SEQ ID NO: 104 або 105.
25. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло за будь-яким з попередніх пунктів і фармацевтично прийнятний носій.
26. Нуклеїнова кислота, яка кодує важкий ланцюг і/або легкий ланцюг антитіла за будь-яким з пп. 1-24.
- 15 27. Рекombінантний вектор експресії, який містить нуклеїнову кислоту за п. 26.
28. Клітина-хазяїн, трансформована рекombінантним вектором експресії за п. 27.
29. Спосіб гуманізації антитіла, який включає:
  - а) вибір одного або більше акцепторних антитіл;
  - б) ідентифікацію амінокислотних залишків мишачого антитіла, які підлягають збереженню;
  - 20 в) синтез нуклеїнової кислоти, яка кодує гуманізований важкий ланцюг, який містить CDR важкого ланцюга антитіла миші, і нуклеїнової кислоти, яка кодує гуманізований легкий ланцюг, який містить CDR легкого ланцюга антитіла миші; і
  - г) експресію нуклеїнових кислот в клітині-хазяїні для продукування гуманізованого антитіла;
- 25 причому антитіло миші являє собою 9D5 або 14G8, при цьому 9D5 характеризується варіабельною областю зрілого важкого ланцюга SEQ ID NO: 1 і варіабельною областю зрілого легкого ланцюга SEQ ID NO: 16, а 14G8 характеризується варіабельною областю зрілого важкого ланцюга SEQ ID NO: 61 і варіабельною областю зрілого легкого ланцюга SEQ ID NO: 70.
- 30 30. Спосіб інгібування або зниження агрегації транстиретину, інгібування або зниження формування фібрил-транстиретину, зменшення кількості відкладень транстиретину, усунення агрегатів транстиретину, стабілізації нетоксичної форми транстиретину, лікування або здійснення профілактики транстиретин-опосередкованого амілоїдозу, або затримки початку прояву симптомів транстиретин-опосередкованого амілоїдозу у суб'єкта, який має транстиретин-опосередкований амілоїдоз або знаходиться під ризиком його розвитку, що
- 35 включає введення суб'єкту антитіла за будь-яким з пп. 1-24 ефективною схемою, тим самим пригнічуючи або зменшуючи агрегацію транстиретину, пригнічуючи або зменшуючи накопичення транстиретину в суб'єкта, зменшуючи кількість відкладень транстиретину в суб'єкта, усуваючи агрегати транстиретину у суб'єкта в порівнянні з суб'єктом, який має транстиретин-опосередкований амілоїдоз або перебуває під ризиком його розвитку, який не отримувал
- 40 антитіла, або стабілізуючи нетоксичну форму транстиретину у суб'єкта.
31. Спосіб діагностування транстиретин-опосередкованого амілоїдозу у суб'єкта, що включає приведення в контакт біологічного зразка з суб'єкта за ефективною кількістю антитіла за будь-яким з пп. 1-24.
32. Спосіб за п. 31, який **відрізняється** тим, що біологічний зразок являє собою кров, сироватку,
- 45 плазму або тверду тканину.
33. Спосіб за п. 32, який **відрізняється** тим, що тверда тканина являє собою тканину з серця, периферичної нервової системи, вегетативної нервової системи, нирок, очей або шлунково-кишкового тракту.

	10	20	30	40	
m9D5VH	EVKL	VESGGGLVQ	PGGSLKL	SCAASGFTFSSYTMS	WVRQTPE 42
Мишина модель 1SEQ_H	EVKL	VESGGGLVQ	PGGSLKL	SCAASGFTFSSYTMS	WARQTPE 42
Мишина модель 1MQK_H	EVKL	QESGGDLVQ	PGGSLKL	SCAASGFTFSSYTMS	WVRQTPE 42
Людський акцептор BAC02114	EVQL	VESGGGLVQ	PGGSLRL	SCAASGFTFSSYEMN	WVRQAPG 42
Людський акцептор AAX82494	QVQL	QESGGGLVQ	PGGSLKL	SCAASGFTFSSYGMN	WVRQTPE 42
Hu9D5VHv1	EVQL	VESGGGLVQ	PGGSLRL	SCAASGFTFSSYTMS	WVRQAPG 42
Hu9D5VHv2	EVQL	VESGGGLVQ	PGGSLRL	SCAASGFTFSSYTMS	WVRQAPG 42
Hu9D5VHv2b	EVQL	VESGGGLVQ	PGGSLKL	SCAASGFTFSSYTMS	WVRQTPE 42
Hu9D5VHv3	EVQL	VESGGGLVQ	PGGSLRL	SCAASGFTFSSYTMS	WVRQAPG 42
Hu9D5VHv3b	EVQL	VESGGGLVQ	PGGSLKL	SCAASGFTFSSYTMS	WVRQTPE 42
Hu9D5VHv4	EVQL	VESGGGLVQ	PGGSLRL	SCAASGFTFSSYTMS	WVRQAPG 42
Hu9D5VHv4b	EVQL	VESGGGLVQ	PGGSLKL	SCAASGFTFSSYTMS	WVRQAPG 42
Hu9D5VHv5	EVQL	VESGGGLVQ	PGGSLRL	SCAASGFTFSSYTMS	WVRQTPE 42
	50	60	70	80	
m9D5VH	KRLELVAE	ISNSGDTT	YYPDTV	KGRFTFSRDNAKNTLYLQMS	84
Мишина модель 1SEQ_H	KKLEWVA	YISKGGG	STYYPD	TVKGRFTISRDNKNTLYLQMS	84
Мишина модель 1MQK_H	KRLEWVA	SINNGGR	TYYPD	TVKGRFTISRDNKNTLYLQMS	84
Людський акцептор BAC02114	KGLEWVS	YITSSG	STIYYAD	SVKGRFTISRDNKNTLYLQMN	84
Людський акцептор AAX82494	KRLEWVA	TISSGG	SYTYP	PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMS	84
Hu9D5VHv1	KGLELVAE	ISNSGDTT	YYPDTV	KGRFTFSRDNAKNTLYLQSN	84
Hu9D5VHv2	KGLELVAE	ISNSGDTT	YYPDTV	KGRFTFSRDNAKNTLYLQSN	84
Hu9D5VHv2b	KRLELVAE	ISNSGDTT	YYPDTV	KGRFTISRDNKNTLYLQMS	84
Hu9D5VHv3	KGLEWVS	EISNSG	DTTYYPD	TVKGRFTFSRDNAKNTLYLQSN	84
Hu9D5VHv3b	KRLELVAE	ISNSGDTT	YYPDTV	KGRFTISRDNKNTLYLQMS	84
Hu9D5VHv4	KGLEWVS	EISNSG	DTTYYPD	TVKGRFTISRDNKNTLYLQSN	84
Hu9D5VHv4b	KRLELVAE	ISNSGDTT	YYPDTV	KGRFTISRDNKNTLYLQMS	84
Hu9D5VHv5	KRLELVAE	ISNSGDTT	YYPDTV	KGRFTISRDNKNTLYLQMN	84

Фиг. 1A.1

	90	100	110	120	
m9D5VH	SLKSEDTAMYYCAR	HYYYGGGYGGWFFDV	WGTGTTVT	VSS	124 (SEQ ID NO.1)
Мишина модель 1SEQ_H	SLKSEDTALYYCAR	-GAMFGNDFKYPMDRW	QGQTSVT	VSS	123 (SEQ ID NO.2)
Мишина модель 1MQK_H	SLKSEDTAMYYCVR	HEYY-----YAMDY	WGQTTVT	VSS	118 (SEQ ID NO.62)
Людський акцептор BAC02114	SLRAEDTAVYYCAR	GGQGSRYYYGMDV	WGQTTVT	VSS	124 (SEQ ID NO.3)
Людський акцептор AAX82494	SLKSEDTAMYYCAR	LYYGYRYF-----DY	WGQTMVT	VSS	120 (SEQ ID NO.4)
Hu9D5VHv1	SLKAEDTAVYYCAR	HYYYGGGYGGWFFDV	WGQTTVT	VSS	124 (SEQ ID NO.5)
Hu9D5VHv2	LLRAEDTAVYYCAR	HYYYGGGYGGWFFDV	WGQTTVT	VSS	124 (SEQ ID NO.6)
Hu9D5VHv2b	SLKSEDTAMYYCAR	HYYYGGGYGGWFFDV	WGQTLVT	VSS	124 (SEQ ID NO.7)
Hu9D5VHv3	LLRAEDTAVYYCAR	HYYYGGGYGGWFFDV	WGQTTVT	VSS	124 (SEQ ID NO.8)
Hu9D5VHv3b	SLKSEDTAMYYCAR	HYYYGGGYGGWFFDV	WGQTLVT	VSS	124 (SEQ ID NO.9)
Hu9D5VHv4	LLRAEDTAVYYCAR	HYYYGGGYGGWFFDV	WGQTTVT	VSS	124 (SEQ ID NO.10)
Hu9D5VHv4b	SLKSEDTAMYYCAR	HYYYGGGYGGWFFDV	WGQTLVT	VSS	124 (SEQ ID NO.11)
Hu9D5VHv5	LLRAEDTAVYYCAR	HYYYGGGYGGWFFDV	WGQTTVT	VSS	124 (SEQ ID NO.12)

Фиг. 1A.2



	10	20	30	40	
m9D5VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLLSNGNTYLYW				40
Мишина модель 1MJU_L	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLLSNGNTYLYW				40
Людський акцептор ABC66952	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSNQSLLSNGNYLDW				40
Hu9D5VLv1	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLSNGNTYLYW				40
Hu9D5VLv2	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLSNGNTYLYW				40
Hu9D5VLv3	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLSNGNTYLYW				40
Hu9D5VLv4	DIVMTQSAPSLPVTGPGEVVSISCRSSKSLLSNGNTYLYW				40
Hu9D5VLv5	DIVMTQSAPSLPVTGPGEVVSISCRSSKSLLSNGNTYLYW				40
	50	60	70	80	
m9D5VL	FLQRPQGSPQLLIYRVSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRI				80
Мишина модель 1MJU_L	FLQRPQGSPQLLIYRVSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRI				80
Людський акцептор ABC66952	YLQKPGQSPQLLIYSGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI				80
Hu9D5VLv1	FLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI				80
Hu9D5VLv2	YLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI				80
Hu9D5VLv3	YLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI				80
Hu9D5VLv4	FLQRPQGSPQLLIYRVSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRI				80
Hu9D5VLv5	FLQRPQGSPQLLIYRVSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRI				80
	90	100	110		
m9D5VL	SRVEAEDVGVIYCMQHLEYPLTFGAGTKLELK				112 (SEQ ID NO.16)
Мишина модель 1MJU_L	SRVEAEDVGVIYCMQHLEYPLTFGAGTKLELK				112 (SEQ ID NO.17)
Людський акцептор ABC66952	SRVEAEDVGVIYCMQALQSPYTFGQGTKEIK				112 (SEQ ID NO.18)
Hu9D5VLv1	SRVEAEDVGVIYCMQHLEYPLTFGQGTKEIK				112 (SEQ ID NO.19)
Hu9D5VLv2	SRVEAEDVGVIYCMQHLEYPLTFGQGTKEIK				112 (SEQ ID NO.20)
Hu9D5VLv3	SRVEAEDVGVIYCMQHLEYPLTFGQGTKEIK				112 (SEQ ID NO.21)
Hu9D5VLv4	SRVEAEDVGVIYCMQHLEYPLTFGQGTKEIK				112 (SEQ ID NO.22)
Hu9D5VLv5	SRVEAEDVGVIYCMQHLEYPLTFGQGTKEIK				112 (SEQ ID NO.23)

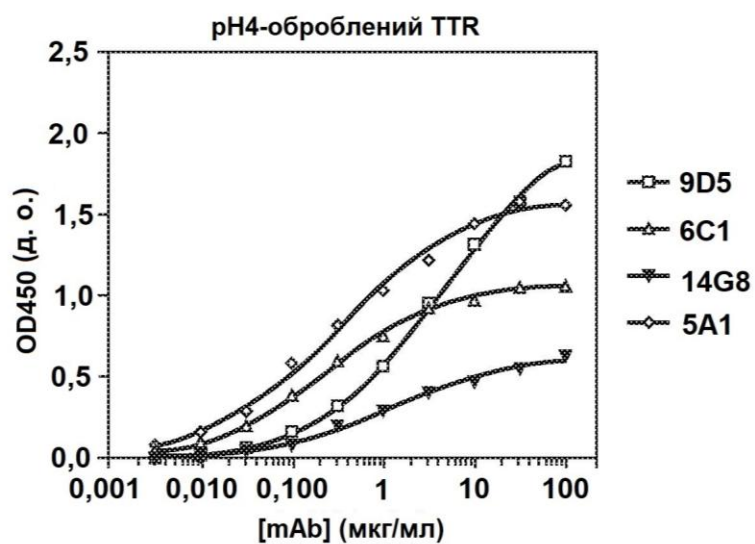
Fig. 1B

	10	20	30	40	
m14G8VH	EVKLVESSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSSWVRQTPE				42
Мишина модель 1MQK_H	EVKLVESSGGDLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSSWVRQTPE				42
Людський акцептор AAD30410	QVQLVQSGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSYAMSSWVRQTPE				42
Людський акцептор AAX82494	QVQLVQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSSWVRQTPD				42
Hu14G8VHv1	EVKLVESSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSSWVRQTPE				42
Hu14G8VHv2	EVQLVESSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSSWVRQTPE				42
Hu14G8VHv3	EVQLVESSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSSWVRQTPE				42
	50	60	70	80	
m14G8VH	KRLELVAEINNSGDTTYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMS				84
Мишина модель 1MQK_H	KRLEWVASINNGGRTYYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMS				84
Людський акцептор AAD30410	KRLEWVAISTDGSFIYYADTVKGRFTISGDNSKNTLYLQMN				84
Людський акцептор AAX82494	KRLEWVAITSSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMS				84
Hu14G8VHv1	KRLELVAEINNSGDTTYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMS				84
Hu14G8VHv2	KRLELVAEINNSGDTTYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMS				84
Hu14G8VHv3	KRLELVAEINNSGDTTYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMN				84
	90	100	110	120	
m14G8VH	SLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGQGTTLTVTVSS				124 (SEQ ID NO.61)
Мишина модель 1MQK_H	SLKSEDTAMYYCVRHEYY-----YAMDYWGQGTTLTVTVSS				118 (SEQ ID NO.62)
Людський акцептор AAD30410	SLRAEDTAVYYCAKDRGIDATAQVGRFDPWGQGTTLTVTVSS				124 (SEQ ID NO.63)
Людський акцептор AAX82494	SLKSEDTAMYYCARLYGYRYFYF-----DYWGQGTMTVTVSS				120 (SEQ ID NO.64)
Hu14G8VHv1	SLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGQGTTLTVTVSS				124 (SEQ ID NO.65)
Hu14G8VHv2	SLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGQGTTLTVTVSS				124 (SEQ ID NO.66)
Hu14G8VHv3	SLRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGQGTTLTVTVSS				124 (SEQ ID NO.66)

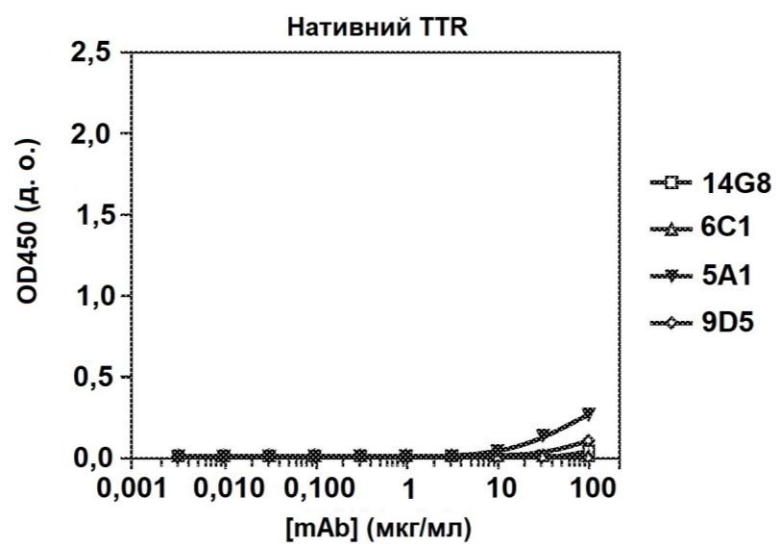
Fig. 2A

	10	20	30	40	
m14G8VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCR	SNKSLLSHNGNTYLYW	40		
Мишина модель 1MJU_L	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCR	SSKSLLSHNGNTYLYW	40		
Людський акцептор ABA71374	DIVMTQTPLSLPVTGPESASISCR	SSQSLRHYSGYTYIDW	40		
Людський акцептор ABC66952	DIVMTQSPLSLPVTGPESASISCR	SNQSLLSHNGNTYLYW	40		
Hu14G8VLv1	DIVMTQSAPSLPVTGPESVSISCR	SNKSLLSHNGNTYLYW	40		
Hu14G8VLv2	DIVMTQSPLSLPVTGPESASISCR	SNKSLLSHNGNTYLYW	40		
Hu14G8VLv3	DIVMTQSPLSLPVTGPESASISCR	SSKSLLSHNGNTYLYW	40		
	50	60	70	80	
m14G8VL	FLQRPQGSPQLLIYRVSNLAS	GVPDRFSGSGSGTAFTLRI	80		
Мишина модель 1MJU_L	FLQRPQGSPQLLIYRMSNLAS	GVPDRFSGSGSGTAFTLRI	80		
Людський акцептор ABA71374	YLQKPGQSPQVLIYLGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKI	80		
Людський акцептор ABC66952	YLQKPGQSPQLLIYSGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKI	80		
Hu14G8VLv1	FLQKPGQSPQLLIYRVSNLAS	GVPDRFSGSGSGTAFTLKI	80		
Hu14G8VLv2	FLQKPGQSPQLLIYRVSNLAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKI	80		
Hu14G8VLv3	FLQKPGQSPQLLIYRVSNLAS	GVPSRFSGSGSGTDFTLKI	80		
	90	100	110		
m14G8VL	SRVEAEDVGVIYCMQHLEYPLT	FGAGTKLELKR	113	(SEQ ID NO.70)	
Мишина модель 1MJU_L	SRVEAEDVGVIYCLQHLEYPFT	FGAGTKLELKR	113	(SEQ ID NO.71)	
Людський акцептор ABA71374	SRVEAEDVGVIYCMQALQTVCS	FGQGTKLEIKR	113	(SEQ ID NO.72)	
Людський акцептор ABC66952	SRVEAEDVGVIYCMQALQSPYT	FGQGTKLEIKR	113	(SEQ ID NO.73)	
Hu14G8VLv1	SRVEAEDVGVIYCMQHLEYPLT	FGQGTKLEIKR	113	(SEQ ID NO.74)	
Hu14G8VLv2	SRVEAEDVGVIYCMQHLEYPLT	FGQGTKLEIKR	113	(SEQ ID NO.75)	
Hu14G8VLv3	SRVEAEDVGVIYCMQHLEYPLT	FGQGTKLEIKR	113	(SEQ ID NO.76)	

Fig. 2B

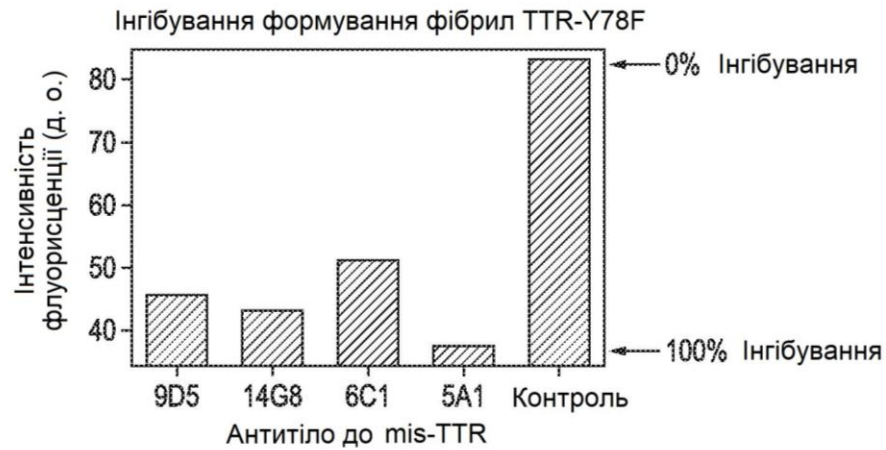
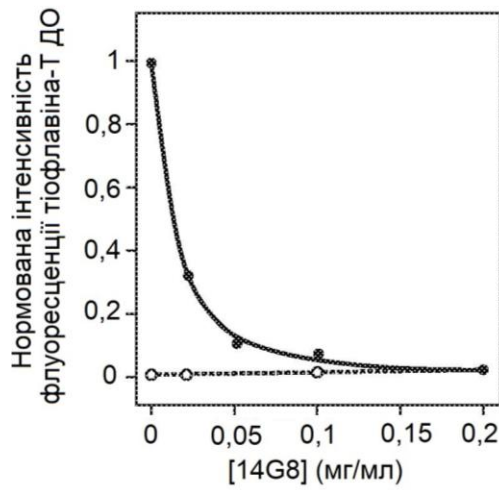
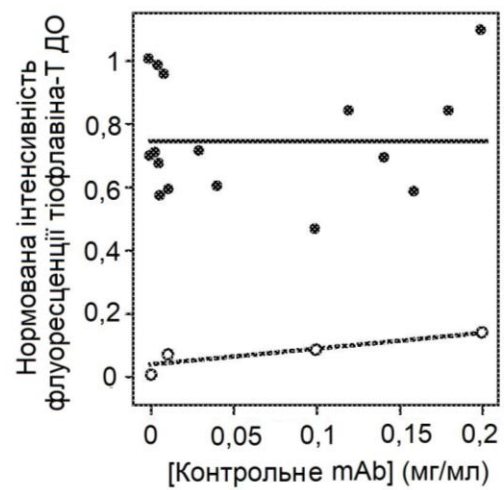
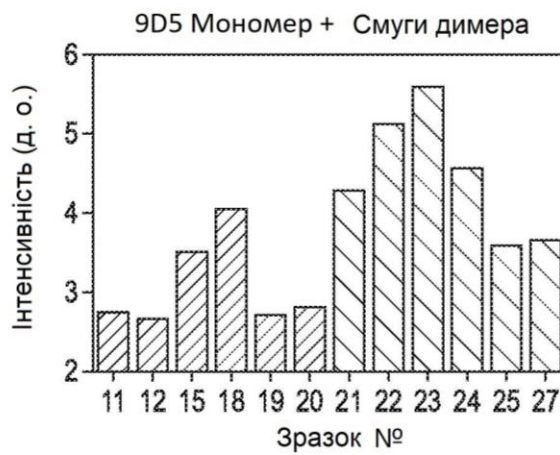
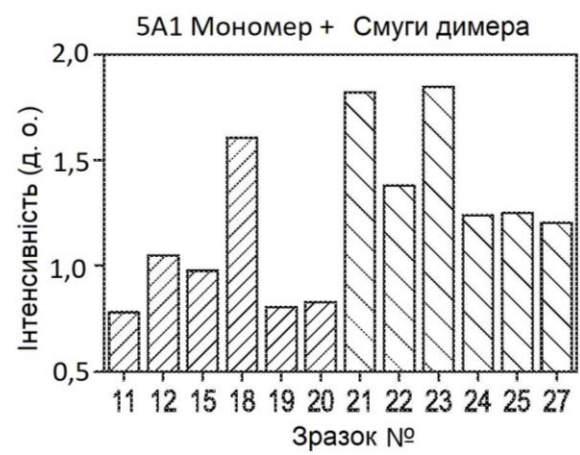


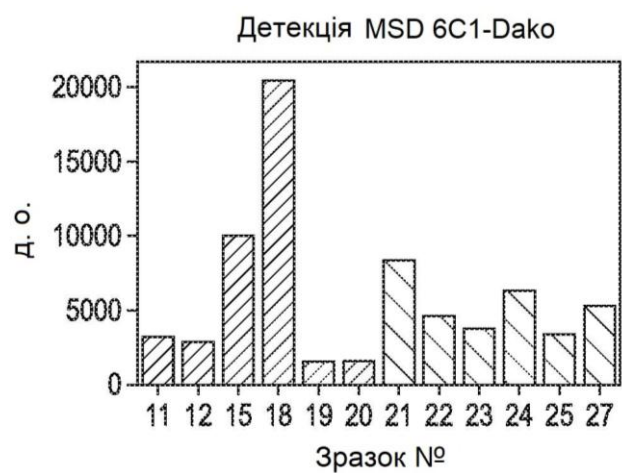
**Фіг. 3А**



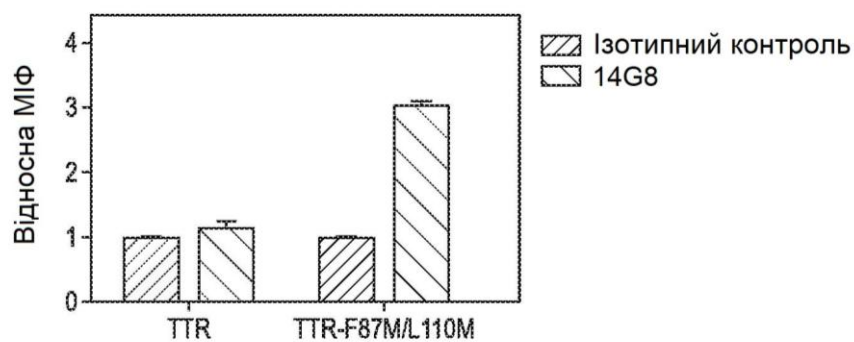
**Фіг. 3В**



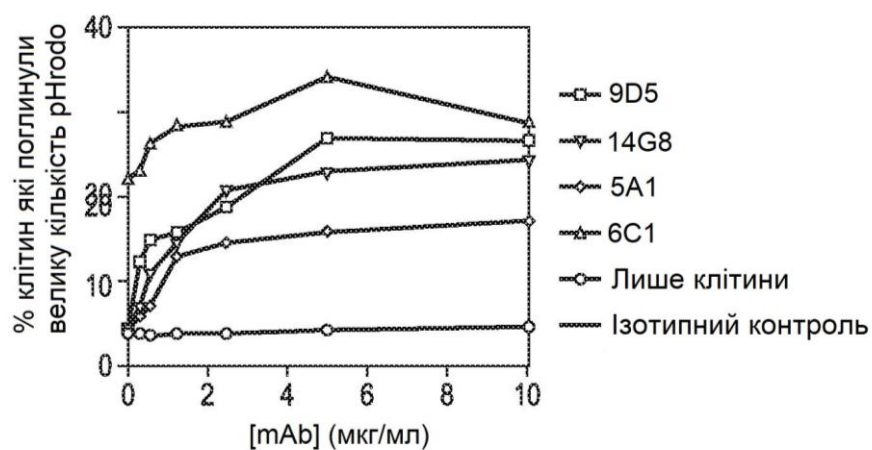

**Фіг. 4А**

**Фіг. 4В**

**Фіг. 4С**

**Фіг. 5А**

**Фіг. 5В**



Фіг. 6



Фіг. 7А



Фіг. 7В

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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