



(51) МПК  
*C07K 16/18* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 25/28* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*C07K 16/18* (2019.02); *A61P 25/28* (2019.02); *C07K 2317/33* (2019.02); *C07K 2317/565* (2019.02); *C07K 2317/567* (2019.02); *A61K 2039/505* (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2018110064, 15.10.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
15.10.2013

Дата регистрации:  
28.05.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
15.10.2012 US 61/713,996

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,  
из которой данная заявка выделена:  
2015118180 15.10.2012

(43) Дата публикации заявки: 28.02.2019 Бюл. № 7

(45) Опубликовано: 28.05.2019 Бюл. № 16

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО  
 "Юридическая фирма Городисский и  
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

**ГРОУВЗ Мария (GB),  
 ГУСТАВССОН Сьюзанн (SE),  
 ХЁГЛУНД Кина (SE),  
 ЛОУН Дэвид (GB),  
 ЛЛОЙД Крис (GB),  
 НИКСОН Эдриан (GB),  
 НИВА Камилла (SE),  
 САЙМОН Сильвия (SE)**

(73) Патентообладатель(и):

**МЕДИММЬОН ЛИМИТЕД (GB)**

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: EP 1160256 A2, 05.12.2001. WO 03/  
 015691 A2, 27.02.2003. EP 1717250 A1,  
 02.11.2006. LEVITES Y. et al. "Anti-A $\beta$ 42- and  
 anti-A $\beta$ 40-specific mAbs attenuate amyloid  
 deposition in an Alzheimer disease mouse  
 model." *Journal of Clinical Investigation*, 2006,  
 116(1): 193-201. HARTMANN T. et al. "Distinct  
 sites of intracellular production for Alzheimer's  
 (см. прод.)"

(54) АНТИТЕЛА К БЕТА-АМИЛОИДУ

(57) Реферат:

Данное изобретение относится к иммунологии.  
 Предложено антитело против человеческого бета-  
 амилоида и его антиген-связывающий фрагмент.  
 Кроме того, представлен способ лечения человека  
 или животного. Антитело по настоящему  
 изобретению и его антигенсвязывающий  
 фрагмент селективно связывают бета-  
 амилоидный 1-42 пептид (A $\beta$ 1-42) человека, но  
 не бета-амилоидный 1-40 пептид (A $\beta$ 1-40)

человека. В этой связи они могут найти  
 применение в качестве терапевтических средств  
 для лечения состояний, ассоциированных с  
 амилоидозом, таких как болезнь Альцгеймера,  
 макулярная дегенерация, или для улучшения  
 когнитивного состояния или замедления  
 когнитивного ухудшения при болезни  
 Альцгеймера или болезни Дауна. 2 н. и 9 з.п. ф-  
 лы, 19 ил., 16 табл., 7 пр.

(56) (продолжение):

disease A $\beta$ 40/42 amyloid peptides." *Nature medicine*, 1997, 3(9): 1016-1020. RU 2009/104769 A, 27.08.2010.

RU 2 689 674 C2

RU 2 689 674 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 16/18* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 25/28* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07K 16/18 (2019.02); A61P 25/28 (2019.02); C07K 2317/33 (2019.02); C07K 2317/565 (2019.02); C07K 2317/567 (2019.02); A61K 2039/505 (2019.02)*

(21)(22) Application: **2018110064, 15.10.2013**

(24) Effective date for property rights:  
**15.10.2013**

Registration date:  
**28.05.2019**

Priority:

(30) Convention priority:  
**15.10.2012 US 61/713,996**

Number and date of priority of the initial application,  
from which the given application is allocated:  
**2015118180 15.10.2012**

(43) Application published: **28.02.2019 Bull. № 7**

(45) Date of publication: **28.05.2019 Bull. № 16**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO  
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**GROVES, Maria (GB),  
GUSTAVSSON, Suzanne (SE),  
HOGLUND, Kina (SE),  
LOWNE, David (GB),  
LLOYD, Chris (GB),  
NICKSON, Adrian (GB),  
NIVA, Camilla (SE),  
SIMON, Sylvia (SE)**

(73) Proprietor(s):

**MEDIMMUNE LIMITED (GB)**

(54) **BETA-AMYLOID ANTIBODIES**

(57) Abstract:

FIELD: immunology.

SUBSTANCE: this invention relates to immunology. What is presented is an anti-human beta-amyloid antibody and its antigen-binding fragment. What is also presented is a method of treating a human or an animal. Antibody of the present invention and its antigen-binding fragment selectively bind beta-amyloid 1-42 peptide (A $\beta$ 1-42) human, but not beta-amyloid 1-

40 peptide (A $\beta$ 1-40) of a human being. In this regard, they can be used as therapeutic agents for treating conditions associated with amyloidosis, such as Alzheimer's disease, macular degeneration, or to improve cognitive state or delay cognitive impairment in Alzheimer's disease or Down's disease.

EFFECT: antibodies to beta-amyloid are offered.

11 cl, 19 dwg, 16 tbl, 7 ex

C 2 4 7 6 9 6 2 6 8 9 6 7 4 R U

R U 2 6 8 9 6 7 4 C 2

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом и его N-терминальными усечениями, совместно называемыми A $\beta$ n-42 пептиды, где n равно 1-29. Оно относится к антителам, которые являются селективными в отношении связывания с бета-амилоидным n-42 пептидом по сравнению с бета-амилоидным 1-40 пептидом. Настоящее изобретение также относится к применению антител к A $\beta$ n-42 для лечения состояний, ассоциированных с амилоидозом, в том числе болезни Альцгеймера.

### Предпосылки изобретения

Болезнь Альцгеймера (AD) характеризуется нарастанием когнитивных нарушений, поражением памяти, что наносит ущерб социальной активности и профессиональной деятельности пациента. Дегенеративное заболевание вызывает утрату нервных клеток в головном мозге, что обуславливает когнитивные затруднения, связанные с речью и высшими функциями, такими как способность к логическому рассуждению, планированию, организации и мышлению, что, в конечном итоге, может приводить к изменениям личности. Конечные стадии заболевания характеризуются полной утратой способности к независимой деятельности.

Гистологически, AD (спорадическая и семейная) определяют по присутствию внутриклеточных нейрофибриллярных клубков (NFT) и внеклеточных бляшек. Бляшки представляют собой скопления  $\beta$ -амилоидного пептида (A $\beta$ ), образованного в результате неправильного расщепления белка-предшественника амилоида (APP), трансмембранного белка, обнаруженного в нейронах и астроцитах в головном мозге. Отложения A $\beta$  также обнаруживают в кровеносных сосудах пациентов, страдающих AD.

При AD особенно уязвимы холинергические нейроны, и последующее снижение количества нейромедиаторов негативно воздействует на другие нейромедиаторные системы. Другие симптомы заболевания включают оксидативный стресс, воспаление и апоптоз нейронов (запрограммированную клеточную смерть). У пациента, страдающего AD, широкомасштабная гибель нейронов приводит к снижению когнитивных способностей и, в конечном итоге, к смерти пациента. (Younkin, 1995; Borchelt *et al.*, 1996; Selkoe, 1999).

Современные способы лечения являются только симптоматическими и представляются минимально эффективными с незначительными облегчениями симптомов на протяжении ограниченного периода времени. Однако, как полагают, сверхвыработка или изменения в уровнях A $\beta$  являются ключевыми событиями в патогенезе спорадической и ранней AD. По этой причине, A $\beta$  стал главной мишенью для разработки лекарственных средств, предназначенных для снижения его образования (Vassar *et al.*, 1999) или для активации механизмов, которые ускоряют его клиренс из головного мозга.

Гипотеза амилоидного каскада предполагает, что выработка A $\beta$  пептида негативно воздействует на функцию нейронов, тем самым приводя к гибели нейронов и деменции при AD. A $\beta$  вырабатывается из белка-предшественника амилоида (APP), который расщепляется последовательно секретазами с образованием молекул с разными длинами. Основным компонентом бляшек является изоформа из 42 аминокислот, A $\beta$ 1-42, которая вовлечена в формирование нейротоксических олигомеров и формирование бляшек при патогенезе AD. Ряд изоформ A $\beta$ , в том числе A $\beta$ 1-42, pGluA $\beta$ 3-42, A $\beta$ 3-42 и 4-42, преобладает при AD головного мозга, из которых A $\beta$ 1-42 и A $\beta$ 4-42 являются основными формами в гиппокампе и коре при семейной и спорадической AD (Portelius *et al.*, 2010).

A $\beta$ , заканчивающийся остатком 42, является немногочисленным компонентом

молекул Аβ, образуемых при процессинге APP. Другие формы включают Аβ1-40 и N-терминальные усечения Аβn-40. Однако Аβ, заканчивающийся остатком 42, наиболее склонен к агрегации и приводит к отложению в амилоидных бляшках. В дополнение к наибольшей склонности к агрегации, Аβ1-42 пептид формирует растворимые полимеры с небольшим числом звеньев (или олигомеры), которые, как было показано, являются токсическими для нейронов в культуре. В отличие от крупных видимых отложений фибрилл, олигомеры не выявляются при типичных анализах на патологию. Олигомеры, характеризующиеся аналогичными свойствами, были выделены из головного мозга, больных AD, и они более тесно ассоциированы с прогрессированием заболевания, чем бляшки (Younkin, 1998; Walsh *et al.*, 2005a; Walsh *et al.*, 2005b).

Экспериментально полученные олигомеры, применяемые к срезам головного мозга или инъеклируемые *in vivo*, вызывают прекращение долговременной потенциации (LTP) в гиппокампе, которая представляет собой форму хранения синаптической информации, хорошо известной как парадигма механизмов памяти (Lambert *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002). Растворимые олигомеры были вовлечены в физическую дегенерацию синапсов (Mucke *et al.*, 2000). Реверсия нарушения памяти при помощи антител на мышинных моделях подтвердила развивающуюся концепцию, что олигомеры играют главную роль в синаптической недостаточности.

Генетические доказательства позволяют предположить, что повышенные количества Аβ1-42 и его N-терминальных усечений (Аβn-42) вырабатываются при многих, или даже при всех, генетических состояниях, которые вызывают семейную AD (Borchelt *et al.*, 1996; Duff *et al.*, 1996; Scheuner *et al.*, 1996; Citron *et al.*, 1998), что указывает на вероятность, что формирование амилоида может быть вызвано либо повышенным образованием Аβn-42, либо уменьшенным распадом или обоими процессами (Glabe, 2000). В частности, при семейной AD, вызывающей генетические мутации в гене APP и/или в гене, кодирующем компонент комплекса γ-секретазы, пресенилин, повышается выработка Аβ1-42 относительно Аβ1-40. Также было высказано предположение, что абсолютное количество пептидов, вырабатываемых в головном мозге, может быть менее важным, чем соотношение Аβ пептидов (отраженное в изменении соотношения Аβ1-42 к Аβ1-40), в отношении образования токсических молекул Аβ (De Strooper, 2007; Kuperstein *et al.*, 2010). В дополнение, при помощи животных моделей отложения амилоида, как на мышах, так и на *Drosophila*, можно предположить, что для образования отложений амилоида требуется Аβ1-42 (Greene *et al.*, 2004; Iijima *et al.*, 2004; McGowan *et al.*, 2005).

Результаты исследования вакцинации в 2000 подсказали возможные новые стратегии лечения AD. У трансгенной мыши PDAPP, в которой происходит сверхэкспрессия мутантного человеческого APP (в котором аминокислота в положении 717 представляет собой фенилаланин вместо валина, встречающегося в норме), постепенно развивается множество нейропатологических признаков AD в зависимости от возраста и области головного мозга. Трансгенных животных иммунизировали пептидом Аβ1-42 либо перед появлением нейропатологий по типу AD (в возрасте 6 недель) или в старом возрасте (11 месяцев), когда отложение Аβ и некоторые последующие нейропатологические изменения хорошо сформировались. Иммунизация молодых животных фактически предупреждала развитие образования бляшек, дистрофии нейритов и астроглиоза. Лечение более старых животных также заметно снижало степень и прогрессирование этих AD-подобных нейропатологий. Было показано, что иммунизация Аβ1-42 приводила к образованию антител к Аβ и что Аβ-иммунореактивные моноцитные/микроглиальные клетки появлялись в области оставшихся бляшек (Schenk *et al.*, 1999; Schenk *et al.*, 2000). Однако при применении на людях метод активной иммунизации привел к нескольким

случаям менингоэнцефалита, наиболее вероятно, вследствие Т-клеточного ответа, и был прерван, хотя первоначальные результаты по эффективности действия были перспективными (Orgogozo *et al.*, 2003; Gilman *et al.*, 2005; Pride *et al.*, 2008).

Вследствие этого, было исследовано несколько стратегий пассивной вакцинации.

5 Периферического введения антител против А $\beta$  было достаточно для снижения амилоидных бляшек (Bard *et al.*, 2000). Несмотря на относительно небольшие сывороточные уровни антител, достигнутые в этих экспериментах, пассивно введенные антитела были способны проходить через гематоэнцефалический барьер и попадать в центральную нервную систему, покрывать бляшки и индуцировать клиренс уже  
10 существующего амилоида. При сравнении А $\beta$ 1-40-специфичного антитела, А $\beta$ 1-42-специфичного антитела и антитела, направленного против остатков 1-16 А $\beta$  было показано, что все антитела снижали накопление А $\beta$  в головном мозге мыши (Levites *et al.*, 2006).

Позднее, было высказано предположение, что прохождение в ЦНС является наиболее  
15 вероятным путем проникновения для эффективного клиренса А $\beta$  для пассивно вводимых антител (Golde *et al.*, 2009). Однако, в дополнение к антителам, способным проходить через гематоэнцефалический барьер, в качестве возможного механизма действия была предложена гипотеза стока.

Гипотеза стока утверждает, что А $\beta$  может удаляться из ЦНС непрямым образом,  
20 при помощи снижения концентрации пептида в плазме. В экспериментах, описывающих это, применяли антитело, которое связывает А $\beta$  в плазме и, тем самым, удаляет А $\beta$  из ЦНС. Это достигалось, поскольку антитело предупреждает приток А $\beta$  из плазмы в ЦНС и/или меняет равновесие между плазмой и ЦНС вследствие снижения концентрации свободного А $\beta$  в плазме (DeMattos *et al.*, 2001). Также было показано, что средства  
25 связывания амилоида, не родственные антителам, являются эффективными в удалении А $\beta$  из ЦНС в результате связывания в плазме. Было показано, что два средства связывания А $\beta$ , гельзолин и GM1, которые удаляют А $\beta$  плазмы, снижают или предупреждают амилоидоз головного мозга (Matsuoka *et al.*, 2003).

Что касается безопасности, одним из признаков патогенеза при АД является  
30 церебральная амилоидная ангиопатия (САА), при этом происходит замещение гладкомышечных клеток сосудов на А $\beta$ , главным образом А $\beta$ 1-40, в стенках мозговых артерий (Weller *et al.*, 2003). Как было показано, лечение пациентов, страдающих АД, при помощи антител ко всем А $\beta$  приводит к микрокровоизлияниям, отражающим удаление А $\beta$  из стенки сосуда (Wilcock *et al.*, 2009), что может неблагоприятно влиять  
35 на пациентов. Одним путем для избежания этого была разработка дегликозилированных антител, которые могут снижать механизмы клиренса, приводящие к микрокровоизлияниям и/или снижать скорость, с которой А $\beta$  выводится из отложений в сосудах, предупреждая насыщение путей оттока (Wilcock *et al.*, 2006).

Нацеленное воздействие на молекулы n-42 $\beta$  пептида при помощи А $\beta$ 42-специфичного  
40 антитела будет нацеливать на молекулу, которая представляет собой ключевую пептидную составляющую при АД головного мозга и является движущей силой образования бляшек. Антитело с первичной специфичностью в отношении молекул n-42-мономера и олигомера с небольшим числом звеньев, будет не только истощать эти молекулы, но также может предупреждать накопление других олигомерных молекул,  
45 которые, как было показано, токсичны для нейронов.

#### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к полностью человеческим антителам, которые являются специфичными в отношении А $\beta$ 1-42 и его N-терминальных усечений и

связываются с эпитопом между аминокислотами 29-42 A $\beta$ 42 пептида. Антитела по настоящему изобретению можно применять для профилактического и/или терапевтического лечения состояний, ассоциированных с бета-амилоидом, таких как AD, в том числе умеренных когнитивных нарушений (MCI) вследствие AD и синдрома Дауна.

Настоящее изобретение касается применения полностью человеческих антител для подавления изоформ A $\beta$  пептида (n-42) в плазме, головном мозге и спинномозговой жидкости (CSF) для предупреждения накопления или способствовать устранению отложения A $\beta$  n-42 изоформ в головном мозге и сосудистой системе головного мозга и для улучшения когнитивной деятельности.

В данном документе описано получение полностью человеческих антител к A $\beta$  n-42 пептидам, которые распознают мономерные формы и олигомерные формы с небольшим числом звеньев (вплоть до и включая пентамер) A $\beta$  n-42 и которые эпитопно картированы к области, охватывающей аминокислоты 17-42 на A $\beta$ 42 пептиде, более конкретно, к области, охватывающей аминокислоты 29-42 на A $\beta$ 42 пептиде.

Антитела согласно настоящему изобретению являются специфичными в отношении молекулы A $\beta$  n-42 (где n является целым числом в диапазоне от 1 до 29) и, таким образом, можно ожидать селективно снижают ключевую движущую силу прогрессирования AD. Антитела согласно настоящему изобретению являются эффективными в связывании A $\beta$ 42 (а не A $\beta$ 40) в плазме, головном мозге и спинномозговой жидкости (CSF) человека, что приводит к повышенному клиренсу A $\beta$  n-42 изоформ из головного мозга. Антитела согласно настоящему изобретению также эффективны в снижении связывания растворимых агрегатов A $\beta$ 42 с нейронами и, таким образом, часть антител, которая попадает в головной мозг, будет оказывать воздействие на здоровье нейронов.

В данном документе описаны сильные, высокоаффинные антитела, в том числе антитело с KD 320 пМ в отношении мономера. Такая высокая аффинность может обеспечивать эффективное подавление A $\beta$  n-42 до уровней, обеспечивая профилактику и модификацию заболевания AD.

Уровни растворимых молекул A $\beta$ 42 и A $\beta$ 40 можно выявлять в головном мозге, CSF и крови при помощи стандартизированных анализов с применением антител, направленных против эпитопов на A $\beta$  пептиде. Как показано на PK:PD крысы, описанной в данном документе, дозозависимое подавление свободного A $\beta$ 42 наблюдали в CSF крыс после периферического введения антитела. Также показано дозозависимое повышение общего A $\beta$ 42 в головном мозге крыс с несущественным воздействием на A $\beta$ 40 пептид.

Таким образом, в данном документе описаны антитела, которые характеризуются способностью проникать в головной мозг (0,1% общего периферического введения в CSF) и специфично подавлять ключевую токсическую молекулу A $\beta$ 42 (а не A $\beta$ 40) в CSF.

Специфичность и механизм действия антител согласно настоящему изобретению могут обеспечивать как профилактическое, так и терапевтическое лечение ряда заболеваний, связанных с накоплением амилоида, который накапливается в органах тела, в том числе различных стадий патогенеза заболевания AD: продромальной, легкой и умеренной AD, синдрома Дауна, а также макулярной дегенерации.

Антитела согласно настоящему изобретению могут обладать способностью обращать снижение когнитивных способностей, лечить снижение когнитивных способностей и предупреждать снижение когнитивных способностей у субъектов с диагнозом продромальная AD, от легкой до умеренной AD и синдром Дауна.

Соответственно, первый аспект настоящего изобретения относится к связывающим

элементам в отношении человеческого Аβ1-42, особенно молекул антител.

Связывающие элементы, например молекулы антител, согласно настоящему изобретению могут характеризоваться каким-либо или всеми из следующих свойств.

5 Связывание с растворимым мономерным человеческим Аβ1-42 и/или олигомерным Аβ1-42.

10 Селективность в связывании Аβ1-42 по сравнению с Аβ1-40. Они могут не проявлять связывания с Аβ1-40 или связывание может быть несущественным. К примеру, молекулы антител согласно настоящему изобретению могут связывать мономерный Аβ1-42 с константой диссоциации (Kd), составляющей 500 пМ или меньше. Они могут не связывать Аβ1-40, или могут связывать Аβ1-40 с Kd больше 1 мМ.

Связывание с человеческим Аβ17-42. Соответственно, молекула антитела может распознавать эпитоп между аминокислотами 17-42 Аβ1-42 пептида, более конкретно, молекула антитела может распознавать эпитоп между аминокислотами 29-42 Аβ1-42 пептида.

15 Связывание с растворимым мономерным человеческим 3-пиро-42 (пироглутамат 3) и 11-пиро-42 (пироглутамат 11).

Связывание с человеческим Аβ1-43 и перекрестная реактивность с мышинным Аβ1-42.

20 Связывающий элемент может содержать набор HCDR и/или набор LCDR молекулы антитела, которая описана в данном документе. Примеры молекул антител согласно настоящему изобретению содержат VH-домен, содержащий набор HCDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и VL-домен, содержащий набор LCDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где HCDR и LCDR представляют собой HCDR и LCDR, соответственно, любого из антител Abet0380, Abet0007, Abet0144, Abet0319, Abet0321b, Abet0322b, Abet0323b,  
25 Abet0328, Abet0329, Abet0332, Abet0342, Abet0343, Abet0344, Abet0368, Abet0369, Abet0370, Abet0371, Abet0372, Abet0373, Abet0374, Abet0377, Abet0378, Abet0379, Abet0381, Abet0382 и Abet0383 или их GL-версии, последовательности которых показаны в прилагаемом перечне последовательностей. Соответствие между молекулами антител и идентификаторами последовательностей в перечне последовательностей обозначено  
30 в таблице 16.

Молекула антитела для человеческого Аβ1-42 может содержать

(i) VH-домен, содержащий набор HCDR: HCDR1, HCDR2 и HCDR3, расположенные между каркасными областями, где аминокислотные последовательности набора HCDR являются такими, которые показаны в таблице 16 для любого из антител Abet0380,  
35 Abet0007, Abet0144, Abet0319, Abet0321b, Abet0322b, Abet0323b, Abet0328, Abet0329, Abet0332, Abet0342, Abet0343, Abet0344, Abet0368, Abet0369, Abet0370, Abet0371, Abet0372, Abet0373, Abet0374, Abet0377, Abet0378, Abet0379, Abet0381, Abet0382 и Abet0383 или их GL-версии,

40 или может содержать такой набор HCDR с одной или двумя аминокислотными мутациями; и

(ii) VL-домен, содержащий набор LCDR: LCDR1, LCDR2 и LCDR3, расположенные между каркасными областями, где аминокислотные последовательности набора LCDR являются такими, которые показаны в таблице 16 для любого из антител Abet0380,  
45 Abet0007, Abet0144, Abet0319, Abet0321b, Abet0322b, Abet0323b, Abet0328, Abet0329, Abet0332, Abet0342, Abet0343, Abet0344, Abet0368, Abet0369, Abet0370, Abet0371, Abet0372, Abet0373, Abet0374, Abet0377, Abet0378, Abet0379, Abet0381, Abet0382 и Abet0383 или их GL-версии,

или может содержать такой набор LCDR с одной или двумя аминокислотными

мутациями.

Молекула антитела согласно настоящему изобретению может содержать

(i) VH-домен, содержащий набор HCDR из Abet0380 или Abet0380 GL, где аминокислотные последовательности HCDR Abet0380 представляют собой

5	HCDR1	SEQ ID NO: 525,
	HCDR2	SEQ ID NO: 526 и
	HCDR3	SEQ ID NO: 527,

или может содержать набор HCDR из Abet0380 или Abet0380 GL с одной или двумя аминокислотными мутациями и

(ii) VL-домен, содержащий набор LCDR из Abet0380 или Abet0380 GL, где аминокислотные последовательности LCDR Abet0380 представляют собой

15	LCDR1	SEQ ID NO: 534,
	LCDR2	SEQ ID NO: 535 и
	LCDR3	SEQ ID NO: 536,

или может содержать набор LCDR из Abet0380 или Abet0380 GL с одной или двумя аминокислотными мутациями.

Молекула антитела может содержать

(i) VH-домен, содержащий набор HCDR: HCDR1, HCDR2 и HCDR3, расположенные между каркасными областями, где аминокислотные последовательности HCDR представляют собой

25	HCDR1	SEQ ID NO: 525,
	HCDR2	SEQ ID NO: 526 и
	HCDR3	SEQ ID NO: 527,

или может содержать такой набор HCDR с одной или несколькими аминокислотными заменами, где одна или несколько замен выбраны из показанных в таблице 12 или таблице 14;

и

(ii) VL-домен, содержащий набор LCDR: LCDR1, LCDR2 и LCDR3, расположенные между каркасными областями, где аминокислотные последовательности LCDR представляют собой

35	LCDR1	SEQ ID NO: 534,
	LCDR2	SEQ ID NO: 535 и
	LCDR3	SEQ ID NO: 536,

или может содержать такой набор LCDR с одной или несколькими аминокислотными заменами, где одна или несколько замен выбраны из показанных в таблице 13 или таблице 15;

VH-домен молекулы антитела может содержать область FW1, в которой аминокислотные остатки в положениях 26-30 по Kabat выбраны из показанных в таблице 14.

VH-домен молекулы антитела может содержать каркасные области тяжелой цепи FW1, FW2, FW3 и FW4, где аминокислотные последовательности каркасных областей тяжелой цепи представляют собой

45	FW1	SEQ ID NO: 528,
	FW2	SEQ ID NO: 529,
	FW3	SEQ ID NO: 530 и
	FW4	SEQ ID NO: 531,



или где FW1 включает SEQ ID NO: 528 с одной или несколькими аминокислотными заменами, где одна или несколько замен в FW1 выбраны из показанных в таблице 12 или таблице 14.

5 VL-домен молекулы антитела может содержать каркасные области легкой цепи FW1, FW2, FW3 и FW4, где аминокислотные последовательности каркасных областей легкой цепи представляют собой

FW1	SEQ ID NO: 537,
FW2	SEQ ID NO: 538,
FW3	SEQ ID NO: 539 и
10 FW4	SEQ ID NO: 540.

Молекула антитела согласно настоящему изобретению может содержать

(i) аминокислотную последовательность VH-домена, показанную в таблице 16 для любого из Abet0380, Abet0343, Abet0369, Abet0377 и Abet0382 или их GL-версии, или может содержать аминокислотную последовательность с одной или двумя  
15 аминокислотными мутациями; и

(ii) аминокислотную последовательность VL-домена, показанную в таблице 16 для любого из Abet0380, Abet0343, Abet0369, Abet0377 и Abet0382 или их GL-версии, или может содержать такую аминокислотную последовательность с одной или двумя  
20 аминокислотными мутациями.

Молекула антитела согласно настоящему изобретению может содержать VH-домен с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична SEQ ID NO: 524, и VL-домен с аминокислотной последовательностью, которая по  
25 меньшей мере на 85% идентична SEQ ID NO: 533, где в VH-домене:

аминокислота 26 представляет собой M, G или S;  
25 аминокислота 27 представляет собой G, F или D;  
аминокислота 28 представляет собой N, T, D или H;  
аминокислота 29 представляет собой F;  
аминокислота 30 представляет собой N, S, K или P;  
30 аминокислота 31 представляет собой Y, V, R, E или T;  
аминокислота 32 представляет собой Q, Y, D, S или E;  
аминокислота 33 представляет собой T, P, I или V;  
аминокислота 34 представляет собой M;  
аминокислота 35 представляет собой W;  
35 аминокислота 50 представляет собой V;  
аминокислота 51 представляет собой I;  
аминокислота 52 представляет собой G;  
аминокислота 52a представляет собой K, S или A;  
аминокислота 53 представляет собой T, S, N, D, G или Q;  
40 аминокислота 54 представляет собой N, G, T или P;  
аминокислота 55 представляет собой E, G, N, K или T;  
аминокислота 56 представляет собой N, T, R или K;  
аминокислота 57 представляет собой I, T, K или V;  
аминокислота 58 представляет собой A, V или T;  
45 аминокислота 59 представляет собой Y;  
аминокислота 60 представляет собой A;  
аминокислота 61 представляет собой D;  
аминокислота 62 представляет собой S;  
аминокислота 63 представляет собой V;

аминокислота 64 представляет собой K;  
аминокислота 65 представляет собой G;  
аминокислота 95 представляет собой E;  
аминокислота 96 представляет собой W;  
5 аминокислота 97 представляет собой M;  
аминокислота 98 представляет собой D;  
аминокислота 99 представляет собой H;  
аминокислота 100 представляет собой S;  
аминокислота 100a представляет собой R;  
10 аминокислота 100b представляет собой P;  
аминокислота 100c представляет собой Y;  
аминокислота 100d представляет собой Y;  
аминокислота 100e представляет собой Y;  
аминокислота 100f представляет собой Y;  
15 аминокислота 100g представляет собой G;  
аминокислота 100h представляет собой M;  
аминокислота 101 представляет собой D;  
аминокислота 102 представляет собой V;  
и где в VL-домене:  
20 аминокислота 24 представляет собой S;  
аминокислота 25 представляет собой G;  
аминокислота 26 представляет собой H;  
аминокислота 27 представляет собой N;  
аминокислота 28 представляет собой L или I;  
25 аминокислота 29 представляет собой E или G;  
аминокислота 30 представляет собой D;  
аминокислота 31 представляет собой K;  
аминокислота 32 представляет собой F или W;  
аминокислота 33 представляет собой A или V;  
30 аминокислота 34 представляет собой S;  
аминокислота 50 представляет собой R;  
аминокислота 51 представляет собой D;  
аминокислота 52 представляет собой D;  
аминокислота 53 представляет собой K;  
35 аминокислота 54 представляет собой R;  
аминокислота 55 представляет собой P;  
аминокислота 56 представляет собой S;  
аминокислота 89 представляет собой S или Q;  
аминокислота 90 представляет собой S или A;  
40 аминокислота 91 представляет собой Q;  
аминокислота 92 представляет собой D;  
аминокислота 93 представляет собой T или S;  
аминокислота 94 представляет собой V или T;  
аминокислота 95 представляет собой T;  
45 аминокислота 96 представляет собой R;  
аминокислота 97 представляет собой V.

Молекула антитела согласно настоящему изобретению может содержать VH-домен с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична

SEQ ID NO: 524, и VL-домен с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична SEQ ID NO: 533, где в VH-домене:

- аминокислота 26 представляет собой M, G, S, V, A, N, T или H;
  - аминокислота 27 представляет собой G, F, S, Y, E, D или P;
  - 5 аминокислота 28 представляет собой N, Q, H, V, E, T, A, S, D, M или P;
  - аминокислота 29 представляет собой F, I, Y, S, L или W;
  - аминокислота 30 представляет собой N, S, T, Q, K, H, R, G, P, E, K, A или D;
  - аминокислота 31 представляет собой Y, H, K, E, N, T, R, V, P, M, F, I, D или W;
  - аминокислота 32 представляет собой Q, Y, D, N, S, E или T;
  - 10 аминокислота 33 представляет собой T, P, I или V;
  - аминокислота 34 представляет собой M или L;
  - аминокислота 35 представляет собой W;
  - аминокислота 50 представляет собой V;
  - аминокислота 51 представляет собой I;
  - 15 аминокислота 52 представляет собой G;
  - аминокислота 52a представляет собой K, S, P, A, N, G, E, D, V или T;
  - аминокислота 53 представляет собой T, S, N, H, Q, D, G или E;
  - аминокислота 54 представляет собой N, G, P, T, Q, E, M, K или A;
  - аминокислота 55 представляет собой E, G, K, N, Q, T, H, D или A;
  - 20 аминокислота 56 представляет собой N, T, A, R или K;
  - аминокислота 57 представляет собой I, T, N, S, K, F, Q, V или L;
  - аминокислота 58 представляет собой A, V, S, T или N;
  - аминокислота 59 представляет собой Y;
  - аминокислота 60 представляет собой A;
  - 25 аминокислота 61 представляет собой D;
  - аминокислота 62 представляет собой S, A или T;
  - аминокислота 63 представляет собой V;
  - аминокислота 64 представляет собой K;
  - аминокислота 65 представляет собой G;
  - 30 аминокислота 95 представляет собой E;
  - аминокислота 96 представляет собой W;
  - аминокислота 97 представляет собой M;
  - аминокислота 98 представляет собой D или G;
  - аминокислота 99 представляет собой H или R;
  - 35 аминокислота 100 представляет собой S;
  - аминокислота 100a представляет собой R;
  - аминокислота 100b представляет собой P;
  - аминокислота 100c представляет собой Y;
  - аминокислота 100d представляет собой Y;
  - 40 аминокислота 100e представляет собой Y;
  - аминокислота 100f представляет собой Y;
  - аминокислота 100g представляет собой G;
  - аминокислота 100h представляет собой M или I;
  - аминокислота 101 представляет собой D;
  - 45 аминокислота 102 представляет собой V или A;
- и где в VL-домене:
- аминокислота 24 представляет собой S или T;
  - аминокислота 25 представляет собой G или T;

- аминокислота 26 представляет собой H, R или P;  
 аминокислота 27 представляет собой N или H;  
 аминокислота 28 представляет собой L, I, V, F или T;  
 аминокислота 29 представляет собой E, M, G, S или N;  
 5 аминокислота 30 представляет собой D, A, S, G или H;  
 аминокислота 31 представляет собой K или S;  
 аминокислота 32 представляет собой F или W;  
 аминокислота 33 представляет собой A, V, M, T или I;  
 аминокислота 34 представляет собой S, T или A;  
 10 аминокислота 50 представляет собой R;  
 аминокислота 51 представляет собой D;  
 аминокислота 52 представляет собой D;  
 аминокислота 53 представляет собой K;  
 аминокислота 54 представляет собой R;  
 15 аминокислота 55 представляет собой P;  
 аминокислота 56 представляет собой S;  
 аминокислота 89 представляет собой S, Q или A;  
 аминокислота 90 представляет собой S, A или T;  
 аминокислота 91 представляет собой Q;  
 20 аминокислота 92 представляет собой D или G;  
 аминокислота 93 представляет собой T, Q, S, N или K;  
 аминокислота 94 представляет собой V, T или F;  
 аминокислота 95 представляет собой T;  
 аминокислота 96 представляет собой R;  
 25 аминокислота 97 представляет собой V, S или A.

Молекула антитела согласно настоящему изобретению может содержать:

- (i) VH-домен с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности VH-домена, показанной в таблице 16 для любого из Abet0380, Abet0343, Abet0369, Abet0377 и Abet0382 или их GL-версии;  
 30 и

(ii) VL-домен с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности VL-домена, показанной в таблице 16 для любого из Abet0380, Abet0343, Abet0369, Abet0377 и Abet0382 или их GL-версии.

- Молекула антитела может содержать VH-домен и VL-домен, которые по меньшей мере на 90% идентичны VH-домену и VL-домену, соответственно, любого из Abet0380, Abet0343, Abet0369, Abet0377 и Abet0382 или их GL-версии.  
 35

Указанная процентная доля идентичности VH- и/или VL-домена может составлять по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

- Молекула антитела может содержать VH-домен и VL-домен любого из Abet0380, Abet0343, Abet0369, Abet0377 и Abet0382 или их GL-версии.  
 40

К примеру, молекула антитела может содержать аминокислотную последовательность VH-домена Abet0380-GL под SEQ ID NO: 524 и аминокислотную последовательность VL-домена Abet0380-GL под SEQ ID NO: 533.

- Молекула антитела согласно настоящему изобретению может представлять собой антитело, которое конкурирует за связывание с A $\beta$ 1-42 с:  
 45

(i) молекулой антитела, содержащей аминокислотную последовательность VH-домена под SEQ ID NO: 524 и аминокислотную последовательность VL-домена под SEQ ID NO: 533,

(ii) молекулой антитела, кодируемой нуклеиновой кислотой, депонированной под номером доступа NCIMB 41890, 41891 или 41892.

Молекула антитела может содержать VH-домен и VL-домен, кодируемые:

(i) последовательностью нуклеиновой кислоты Abet0380-GL, депонированной под номером доступа 41890;

(ii) последовательностью нуклеиновой кислоты Abet0144-GL, депонированной под номером доступа 41891; или

(iii) последовательностью нуклеиновой кислоты Abet0377-GL, депонированной под номером доступа 41892.

Молекула антитела может содержать VH-домен и VL-домен, содержащие HCDR и LCDR, соответственно, депонированного антитела, указанного выше. Молекула антитела может представлять собой антитело, кодируемое депонированной нуклеиновой кислотой, указанной выше.

Также в данном документе описаны молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие связывающие элементы согласно настоящему изобретению, клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту, и способы получения связывающих элементов при помощи экспрессии нуклеиновой кислоты и выделения связывающего элемента.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения связаны с композициями, включающими молекулу антитела по любому из предыдущих пунктов, и один или несколько дополнительных компонентов, таких как фармацевтически приемлемый наполнитель, и с такими композициями для медицинского применения. Композиции, включающие связывающие элементы по настоящему изобретению, могут предусматриваться для применения в способе лечения организма человека или животного.

Связывающиеся элементы, которые описаны в данном документе, могут применяться в способах диагностики или лечения субъектов-людей или животных, например людей. Связывающие элементы по настоящему изобретению могут применяться для понижения уровней A $\beta$ 1-42 у индивидуума и/или для снижения амилоидоза. Связывающие элементы могут применяться для снижения амилоидоза и для лечения, снижения или предупреждения состояния, ассоциированного с амилоидозом. Состояния и заболевания, которые можно лечить, включают болезнь Альцгеймера, такую как продромальная, легкая или умеренная AD. AD, подвергаемая лечению при помощи настоящего изобретения, может представлять собой семейную или спорадическую AD. Настоящее изобретение можно применять для предупреждения, снижения или обращения умеренных когнитивных нарушений (MCI), ассоциированных с AD. Когнитивную деятельность можно улучшать и/или снижение когнитивных способностей можно ослаблять у пациентов, страдающих AD, или пациентов, страдающих синдромом Дауна. Настоящее изобретение также можно применять для лечения или предупреждения макулярной дегенерации, которая связана с бета-амилоидом (Ding *et al.* PNAS 108(28):E279-287 2011).

Соответственно, в дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ снижения амилоидоза, лечения болезни Альцгеймера, улучшения когнитивной деятельности или замедление снижения когнитивных способностей при болезни Альцгеймера или синдроме Дауна и/или лечения макулярной дегенерации у индивидуума, включающий введение индивидууму связывающего элемента по настоящему изобретению.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения описаны более подробно ниже.

Краткое описание графических материалов

На фигуре 1 показаны результаты HTRF™-анализа прямого связывания очищенного

Fab Abet0007 и серии бета-амилоидных пептидов. Клон Abet0007 (■) проявляет связывание с человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом (фигура 1A) и мышинным бета-амилоидным 1-42 пептидом (фигура 1C), но демонстрирует отсутствие связывания с человеческим бета-амилоидным 1-40 пептидом (фигура 1B) или скремблированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом (фигура 1D). Антитело положительного контроля (●) и антитело отрицательного контроля (▲) применяли для проверки надежности данного анализа.

На фигуре 2 показано ингибирование образования комплекса из биотинилированного человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида и IgG2 Abet0007 при повышении концентраций конкурирующих пептидов. Образование комплекса ингибируют человеческие бета-амилоидные 1-42 (●), 11-42 (▲), 17-42 (▼) и 1-43 (◆) пептиды. Его не ингибируют человеческий бета-амилоидный 1-40 пептид (■) или пептид отрицательного контроля (○).

На фигуре 3 показаны кривые поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore) для связывания человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида с иммобилизованным IgG2 Abet0007 при концентрации пептида, составляющей 100 нМ (верхняя кривая), 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,2 нМ и 3,1 нМ (нижняя кривая). Каждую кривую подгоняют к модели Ленгмюра 1:1.

На фигуре 4 показаны фотографии образца *in vitro* иммуногистохимического окрашивания IgG2 Abet0007. (A) Антитело положительного контроля проявляет сильное распознавание бляшек (балл = 4) на срезах головного мозга человека, страдающего AD (генотип ApoE 3/3; стадия по Braak 6; концентрация антитела 20 мкг/мл). (B) Лидерный клон IgG2 Abet0007 проявляет отсутствие распознавания бляшек (балл = 0) на смежном срезе головного мозга (20 мкг/мл). (C) То же самое антитело положительного контроля проявляет сильное распознавание бляшек (балл = 4) на срезах головного мозга мыши Tg2576 (мышь возрастом 18 месяцев; концентрация антитела 20 мкг/мл). (D) Лидерный клон IgG2 Abet0007 проявляет отсутствие распознавания бляшек (балл = 0) на смежном срезе головного мозга мыши (20 мкг/мл).

На фигуре 5 показано ингибирование образования комплекса из человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида и IgG Abet0042 при повышении концентрации scFv Abet0007 (●) и scFv Abet0144 (▲). В этом анализе клон Abet0144 является значительно более сильным, чем исходный клон Abet0007. Антитело отрицательного контроля (■) включают для сравнения.

На фигуре 6 показаны кривые поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore) для связывания очищенного scFv Abet0144 с иммобилизованным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом при концентрации scFv, составляющей 400 нМ (верхняя кривая), 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ и 12,5 нМ (нижняя кривая). Каждую кривую подгоняют к модели Ленгмюра 1:1.

На фигуре 7 показаны кривые поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore) для связывания человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида с иммобилизованным антителом IgG1-ТМ Abet0144-GL при концентрации пептида, составляющей 50 нМ (верхняя кривая), 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ, 3,13 нМ и 1,56 нМ (нижняя кривая). Каждую кривую подгоняют к модели Ленгмюра 1:1.

На фигуре 8 показаны кривые поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore) для связывания серии бета-амилоидных пептидов при концентрации 400 нМ с иммобилизованным антителом IgG1-ТМ Abet0144-GL. Отмечается явное связывание с биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом (верхняя кривая)

и немеченным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом (вторая кривая). Отсутствует заметное связывание со скремблированным биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом, биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-40 пептидом, немеченным человеческим бета-амилоидным 1-40 пептидом или биотинилированным-инсулином (плоские линии).

На фигуре 9 показано определение профиля специфичности IgG1-ТМ Abet0144-GL с применением биохимического анализа конкуренции за эпитоп, в котором измеряют ингибирование образования комплекса между биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом и IgG1-ТМ Abet0144-GL при повышении концентрации конкурирующих пептидов. Образование комплекса ингибировали человеческий бета-амилоидный 1-42 пептид (●), пептиды пиро-3-42 (◆) и пиро-11-42 (○). Не наблюдали значительного ингибирования в случае человеческого бета-амилоидного 1-40 пептида (■), 1-16 (▲) и 12-28 (▼) пептидных усечений или в случае пептида отрицательного контроля (□).

На фигуре 10 показаны фотографии образца *in vitro* иммуногистохимического окрашивания IgG1-ТМ Abet0144-GL. (А) Антитело положительного контроля проявляет сильное распознавание бляшек (балл = 4) на срезах головного мозга человека, страдающего AD (генотип ApoE 3/3; концентрация антитела 20 мкг/мл). (В) Лидерный клон IgG1-ТМ Abet0144-GL проявляет некоторое распознавание бляшек (балл = 1,5) на смежном срезе головного мозга (20 мкг/мл). (С) То же самое антитело положительного контроля проявляет сильное распознавание бляшек (балл = 4) на срезах головного мозга мыши Tg2576 (мышь возрастом 18 месяцев; концентрация антитела 20 мкг/мл). (D) Лидерный клон IgG1-ТМ Abet0144-GL проявляет некоторое распознавание бляшек (балл = 1) на смежном срезе головного мозга мыши (20 мкг/мл).

На фигуре 11 показано ингибирование образования комплекса из человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида и IgG1-ТМ Abet0144-GL при повышении концентрации очищенного конкурирующего scFv (●). Все четыре самых сильных клонa scFv, Abet0369 (фигура 11А), Abet0377 (фигура 11В), Abet0380 (фигура 11С) и Abet0382 (фигура 11D), проявляют значительное усиление активности по сравнению с исходной последовательностью scFv Abet0144-GL (■).

На фигуре 12 показаны кривые поверхностного плазмонного резонанса (ВІАcore) для связывания человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида с иммобилизованным антителом IgG1-ТМ Abet0380-GL при концентрации пептида от 1024 нМ (верхняя кривая) до 63 пМ (нижняя кривая). Каждую кривую подгоняют к модели Ленгмюра 1:1.

На фигуре 13 показаны кривые поверхностного плазмонного резонанса (ВІАcore) для связывания серии бета-амилоидных пептидов с иммобилизованным антителом IgG1-ТМ Abet0380-GL. Отмечается явное связывание с биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом (верхняя кривая) и немеченным мышинным бета-амилоидным 1-42 пептидом (вторая кривая). Отсутствует заметное связывание с биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-40 пептидом или немеченным мышинным бета-амилоидным 1-40 пептидом (плоские линии).

На фигуре 14 показаны фотографии образца *in vitro* иммуногистохимического окрашивания IgG1-ТМ Abet0380-GL. (А) Антитело положительного контроля проявляет сильное распознавание бляшек (балл = 4) на срезах головного мозга человека, страдающего AD (генотип ApoE 3/3, стадия по Braak 6; концентрация антитела 5 мкг/мл). (В) Лидерный клон IgG1-ТМ Abet0380-GL проявляет сильное распознавание бляшек (балл = 3) на смежном срезе головного мозга (10 мкг/мл). (С) The same positive control antibody shows strong plaque recognition (score = 4) on Tg2576 mouse brain sections (22 month

old mice; 20 µg/ml antibody). (D) Лидерный клон IgG1-ТМ Abet0380-GL проявляет сильное распознавание бляшек (балл = 4) на смежном срезе головного мозга мыши (20 мкг/мл).

Figure 15 shows Western Blot analysis of Abeta 42 aggregate preparation and detection using the Abet0380-GL IgG1ТМ. (А) Выявление с помощью IgG1ТМ Abet0380-GL агрегата Аβ42, не подвергнутого фотосшиванию (не-PIСUP). (В) Выявление с помощью IgG1ТМ Abet0380-GL агрегата Аβ42, подвергнутого фотосшиванию (PIСUP). Здесь нами показано, что IgG1ТМ Abet0380-GL специфично распознает молекулы мономера Аβ1-42 и олигомера с небольшим числом звеньев вплоть до и в том числе пентамера.

На фигуре 16 показано дозозависимое снижение уровня свободного бета-амилоидного 1-42 пептида в CSF (А), повышение общего бета-амилоидного 1-42 пептида в ткани головного мозга (В) и неизменные уровни общего бета-амилоидного 1-40 пептида в ткани головного мозга (С) при повышении доз антитела IgG1-ТМ Abet0380-GL у крыс Sprague-Dawley, получавших повторные еженедельные дозы в течение 14 дней.

На фигуре 17 показаны фотографии образца иммуногистохимического анализа связывания IgG1-ТМ Abet0380-GL с бета-амилоидными бляшками *in vivo* через 168 часов после введения дозы в периферический сосуд пожилым мышам Tg2576. Антитело положительного контроля, вводимое из расчета 30 мг/кг, проявляет сильное *in vivo* распознавание бляшек (А), тогда как IgG1-ТМ Abet0380-GL, вводимое из расчета 30 (В) или 10 (С) мг/кг, не проявляет какого-либо *in vivo* присоединения к бляшкам.

На фигуре 18 показана специфичность IgG1-ТМ Abet0380-GL в экспериментах по конкурентному связыванию с панелью из человеческих Abeta пептидов полной длины, усечений и пиро-пептидов (Abeta 1-42, Abeta 1-43, Abeta 1-16, Abeta 12-28, Abeta 17-42, Abeta пиро-3-42 или Abeta пиро-11-42), имеющих диапазон различных концентраций (от 10 мкМ с понижением до 0,17 нМ). Пояснение:

- ◆ Abeta 1-42
- ♣ Abeta 1-43
- ▼ Abeta 1-16
- ◆ Abeta 12-28
- ♣ Abeta 17-42
- ♣ Abeta пиро-3-42
- Abeta пиро-11-42
- ◇ Среда 1 (DMSO)
- ✱ Среда 2 (NH4OH)

На оси х показана концентрация пептида Abeta в виде log M, на оси у показан % специфичного связывания. Ингибирование IgG1-ТМ Abet0380-GL: связывание Abeta 1-42 с N-концевым биотином наблюдали в случае Abeta 1-42, Abeta 1-43, Abeta 17-42, Abeta пиро-3-42 и Abeta пиро-11-42 со значениями IC<sub>50</sub>, варьирующими в диапазоне от 10<sup>-8</sup> до 10<sup>-9</sup> M для этой группы. Отсутствие ингибирования IgG1-ТМ Abet0380-GL: связывание с Abeta 1-42 с N-концевым биотином наблюдали в случае Abeta 1-16 или Abeta 12-28.

На фигуре 19 показана способность антитела Abet0144-GL удалять бета-амилоид 1-42 в РК-PD исследовании на нормальных крысах. На оси х показана среда или концентрация Abet0144-GL (10 мг/кг или 40 мг/кг), на оси у показана концентрация общего бета-амилоида 1-42 в CSF в пг/мл. Уровень свободного бета-амилоида 1-42 в CSF незначительно изменялся под действием либо 10, либо 40 мг/кг Abet0144-GL (повышение на 5 и 18%, соответственно, при сравнении со средой). Уровень общего



бета-амилоида 1-42 в CSF значительно повышался на 38% при 10 мг/кг, и на 139% при 40 мг/кг. Уровень общего бета-амилоида 1-42 в ткани головного мозга также значительно повышался, на 16% и 50% при 10 и 40 мг/кг, соответственно. Данные из этого исследования на нормальных крысах демонстрируют, что Abet0144-GL не оказывал

5 значительного влияния на уровни свободного бета-амилоида 1-42 в CSF, и в то же время повышал уровни общего бета-амилоида 1-42 как в CSF, так и в головном мозге.

#### Подробное описание

При помощи связывания изоформ А $\beta$  1-42 пептида и его N-терминальных усечений (n-42) в плазме, головном мозге и спинномозговой жидкости (CSF) связывающий элемент

10 по настоящему изобретению может предупреждать накопление или способствовать устранению отложения изоформ А $\beta$  n-42 в головном мозге и сосудистой системе головного мозга. Связывающие элементы по настоящему изобретению могут связывать и осаждают растворимый А $\beta$ 1-42 в сыворотке крови и/или в спинномозговой жидкости (CSF), тем самым снижая концентрацию А $\beta$ 1-42 в плазме и/или CSF, соответственно.

15 Они представляют собой тактику лечения болезни Альцгеймера и других состояний, ассоциированных с амилоидозом.

Связывающие элементы являются специфичными в отношении эпитопа-мишени в А $\beta$ 17-42, более конкретно в А $\beta$ 29-42, и связывают этот эпитоп-мишень с высокой аффинностью по сравнению с эпитопами, не являющимися мишенями, к примеру,

20 эпитопами из А $\beta$ 1-40, тем самым нацеливаясь на основные токсические молекулы, связанные с образованием амилоидных бляшек. К примеру, связывающий элемент может проявлять аффинность связывания с А $\beta$ 1-42, которая по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 1000 раз или по меньшей мере в 10000 раз больше аффинности связывания с А $\beta$ 1-40. Таким образом, связывающий элемент

25 является селективным по преимущественному связыванию с А $\beta$ 1-42, а не с А $\beta$ 1-40. Как отмечено выше, связывающий элемент может связывать А $\beta$ 1-42 с константой диссоциации (Kd) 500 пМ или менее. Предпочтительно, он не проявляет значительного связывания с А $\beta$ 1-40. Аффинность и связывание можно определять с применением поверхностного плазмонного резонанса при помощи мономерного А $\beta$  пептида, как

30 описано в примерах.

Связывание с А $\beta$  также можно измерять в анализе гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF<sup>TM</sup>) для определения того, способно ли антитело конкурировать за связывание с А $\beta$  с эталонной молекулой антитела к А $\beta$  пептиду, как

35 описано в примерах.

HTRF<sup>TM</sup>-анализ представляет собой метод гомогенного анализа, который использует резонансный перенос энергии флуоресценции между донорным и акцепторным флуорофором, которые находятся в непосредственной близости. Такие анализы можно применять для измерения взаимодействия макромолекул при помощи прямого или

40 непрямого присоединения одной из молекул, представляющих интерес, к донорному флуорофору, криптату европия (Eu<sup>3+</sup>), и присоединение другой молекулы, представляющей интерес, к акцепторному флуорофору XL665 (стабильный сшитый аллофикоцианин). Возбуждение молекулы криптоата (при 337 нм) приводит к испусканию флуоресценции при 620 нм. Энергия, полученная в результате этого испускания, может

45 переноситься к XL665, находящемуся в непосредственной близости от криптоата, что приводит к испусканию специфичной долгоживущей флуоресценции (при 665 нм) от XL665. Измеряют специфичные сигналы как донора (при 620 нм), так и акцептора (при 665 нм), что делает возможным расчет соотношения 665/620 нм, что компенсирует присутствие окрашенных соединений в анализе.

Связывающий элемент согласно настоящему изобретению может конкурировать за связывание с Аβ1-42 и, таким образом, ингибировать связывание эталонного антитела в конкурентном НТFR<sup>TM</sup>-анализе с Аβ1-42, но не с Аβ1-40. Связывающий элемент может проявлять по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по 5 меньшей мере 85% или по меньшей мере 90% ингибирование связывания Abet0144GL с Аβ1-42 в НТFR<sup>TM</sup>-анализе.

Активность ингибирования связывания может выражаться в виде значения IC<sub>50</sub>, в нМ, если не заявлено иное. В функциональных анализах IC<sub>50</sub> представляет собой 10 концентрацию молекулы антитела, которая уменьшает биологический ответ на 50% от своего максимального. В исследованиях по связыванию лиганда IC<sub>50</sub> представляет собой концентрацию, которая уменьшает уровень связывания рецептора на 50% от уровня максимального специфического связывания. IC<sub>50</sub> можно рассчитать путем 15 нанесения на график % максимального биологического ответа как зависимость от логарифма концентрации связывающегося элемента, а также при помощи программного обеспечения, такого как Prism (GraphPad) или Origin (Origin Labs), для подгонки сигмоидальной функции к данным с получением значения IC<sub>50</sub>. Подходящие анализы для измерения или определения активности хорошо известны в данной области техники.

Связывающий элемент может характеризоваться IC<sub>50</sub>, составляющей 5 нМ или 20 меньше, например, 2 нМ или меньше, например, 1 нМ или меньше, в НТFR<sup>TM</sup>-анализе конкуренции за эпитоп с Abet0144-GL и Аβ1-42. Abet0144-GL представляет собой молекулу антитела с VH-доменом под SEQ ID NO: 20 VH-домена и SEQ ID NO: 29. Его можно использовать в анализе в таком же формате, что и молекулу антитела, 25 подлежащую тестированию, например в формате scFv или IgG, например IgG1. Таким образом, IgG молекулы антитела согласно настоящему изобретению могут конкурировать с IgG Abet0144-GL за связывание с человеческим Аβ1-42 в НТFR-анализе конкуренции за эпитоп. Активность в таком анализе может составлять менее 1 нМ.

Связывающий элемент согласно настоящему изобретению может проявлять 30 специфическое связывание с Аβ1-42, превышающее связывание с Аβ1-40, как определено при помощи конкурентного НТFR<sup>TM</sup>-анализа. В таком анализе Аβ1-40 может проявлять отсутствие значительного ингибирования связывания связывающегося элемента с Аβ1-42 пептидом, например, он может проявлять менее 20%, например, менее 10% или менее 35 5% ингибирования в таком анализе, и предпочтительно не проявляет значительного ингибирования в таком анализе.

Связывающие элементы согласно настоящему изобретению распознают эпитоп в человеческом Аβ17-42, более конкретно в человеческом Аβ29-42, и могут также распознавать свой эпитоп-мишень в Аβ от другого вида, например мыши или крысы.

Активность связывающегося элемента, рассчитываемую в конкурентном НТFR<sup>TM</sup>-анализе 40 с применением Аβ1-42 от первого вида (например, человека), можно сравнивать с активностью связывающегося элемента в таком же анализе с применением Аβ1-42 от второго вида (например, Аβ1-42 мыши), чтобы оценить степень перекрестной реактивности связывающегося элемента в отношении Аβ1-42 этих двух видов. Активность, 45 определяемая путем измерений IC<sub>50</sub>, может находиться в пределах 10-кратной или в пределах 100-кратной. Как отмечено выше, Abet0144GL можно применять как эталонное антитело в конкурентном НТFR<sup>TM</sup>-анализе. Связывающие элементы, описанные в данном документе, могут характеризоваться большей активностью в анализе с

применением человеческого A $\beta$ 1-42, чем в анализе с применением A $\beta$ 1-42, не являющегося человеческим.

Связывающий элемент может включать молекулу антитела с одним или несколькими CDR, например набором CDR, в каркасной области антитела (т.е. антиген-связывающий домен антитела). Например, молекула антитела может содержать VH- и/или VL-домены антитела. VH и VL домены молекул антитела также предусмотрены как часть настоящего изобретения. Как хорошо известно, VH и VL-домены содержат области, определяющие комплементарность ("CDR"), и каркасные области ("FW"). VH-домен содержит ряд HCDR, и VL-домен содержит ряд LCDR. Молекула антитела может содержать VH-домен антитела, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 VH, и/или VL-домен антитела, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 VL. VH- или VL-домены могут дополнительно включать каркасные области. Каркасные области VH- или VL-домена, как правило, включают четыре каркасных области, FW1, FW2, FW3 и FW4, которые расположены между CDR в следующей структуре: FW1 - CDR1 - FW2 - CDR2 - FW3 - CDR3 - FW4.

Примеры VH- и VL-доменов антител, FW и CDR согласно аспектам настоящего изобретения перечислены в таблицах 5 и 6 и прилагаемом перечне последовательностей, который является частью настоящего раскрытия. Все последовательности VH и VL, последовательности CDR, наборы CDR, наборы HCDR и наборы LCDR, раскрытые в данном документе, а также комбинации данных элементов, представляют аспекты настоящего изобретения. Как описано в данном документе, "набор CDR" включает CDR1, CDR2 и CDR3. Таким образом, набор HCDR относится к HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а набор LCDR относится к LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Если не указано иное, "ряд CDR" включает HCDR и LCDR. Как правило, молекулы антитела по настоящему изобретению являются моноклональными антителами.

В других вариантах осуществления связывающий элемент может содержать антигенсвязывающий участок в молекуле, не являющейся антителом, обычно образованный одной или несколькими CDR, например, набором CDR, в белковом каркасе, не являющимся антителом, как дополнительно обсуждается ниже.

Выделение исходной молекулы антитела, обозначенного Abet0007, с последующим осуществлением направленного мутагенеза CDR3 и отбором оптимизованного антитела Abet0144, осуществление модификации на уровне генов зародышевого типа до Abet0144-GL с набором последовательностей CDR и последовательностей каркасных областей, которые показаны в таблице 5, 6 и в перечне последовательностей, описано в данном документе. Благодаря масштабному процессу дальнейшей оптимизации и рекомбинации нескольких библиотек, как описано в примерах, из Abet0144GL получили панель клонов антител. Эти дополнительно оптимизированные клоны обозначены как Abet0380, Abet0319, Abet0321b, Abet0322b, Abet0323b, Abet0328, Abet0329, Abet0332, Abet0342, Abet0343, Abet0369, Abet0370, Abet0371, Abet0372, Abet0373, Abet0374, Abet0377, Abet0378, Abet0379, Abet0381, Abet0382 и Abet0383. Последовательности их CDR и последовательности их переменных доменов приведены в таблицах 5 и 6 и изложены в перечне последовательностей. Модифицированные на уровне генов зародышевого типа последовательности VH- и VL-доменов Abet0380GL, Abet0377GL, Abet0343GL, Abet0369GL и Abet0382GL показаны в таблице 8 и таблице 9.

К примеру, в таблицах 5 и 6 показано, что Abet0380 характеризуется набором CDR, в котором HCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 525 (остатки 31-35 по Kabat), HCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 526 (остатки 50-65 по Kabat), HCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 527 (остатки 95-102 по Kabat), LCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 534

(остатки 24-34 по Kabat), LCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 535 (остатки 50-56 по Kabat), и LCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 536 (остатки 89-97 по Kabat). Другие оптимизированные клоны антител аналогичным образом показаны в таблицах 5 и 6, и они также предусмотрены в качестве аспектов настоящего изобретения.

5 Связывающий элемент для человеческого Аβ1-42 в соответствии с настоящим изобретением может содержать один или несколько CDR, как описано в данном документе, например набор CDR. CDR или набор CDR могут представлять собой набор CDR из Abet0380, Abet0319, Abet0321b, Abet0322b, Abet0323b, Abet0328, Abet0329, Abet0332, Abet0342, Abet0343, Abet0369, Abet0370, Abet0371, Abet0372, Abet0373, Abet0374, Abet0377,  
10 Abet0378, Abet0379, Abet0381, Abet0382 и Abet0383 или их версии, модифицированной на уровне генов зародышевого типа, или могут представлять собой их вариант, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления

15 HCDR1 может иметь длину 5 аминокислот, при этом состоять из остатков 31-35 по Kabat;

HCDR2 может иметь длину 17 аминокислот, при этом состоять из остатков 50-65 по Kabat;

HCDR3 может иметь длину 16 аминокислот, при этом состоять из остатков 95-102 по Kabat;

20 LCDR1 может иметь длину 11 аминокислот, при этом состоять из остатков 24-34 по Kabat;

LCDR2 может иметь длину 7 аминокислот, при этом состоять из остатков 50-56 по Kabat; и/или

25 LCDR3 может иметь длину 9 аминокислот, при этом состоять из остатков 89-97 по Kabat.

Связывающие элементы могут содержать HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3 и/или LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3 из любого из антител, перечисленных в таблицах 5 и 6, например набор CDR любого из антител, перечисленных в таблице 5 или 6. Связывающий элемент может содержать набор CDR VH из любого из этих антител. Необязательно он может  
30 также включать набор CDR VL из одного из этих антител. CDR VL могут быть из того же антитела, что и CDR VH, или из другого антитела. VH-домен, содержащий набор HCDR из любого из антител, перечисленных в таблице 5, и/или VL-домен, содержащий набор LCDR любого из антител, перечисленных в таблице 6, также предусмотрены в данном документе.

35 Связывающий элемент может содержать набор H и/или L CDR любого из антител, перечисленных в таблицах 5 и 6, с одной или несколькими аминокислотными мутациями, например до 5, 10 или 15 мутаций, в раскрытом наборе H и/или L CDR. Мутация может представлять собой аминокислотную замену, делецию или вставку. К примеру, молекула антитела по настоящему изобретению может содержать набор H и/или L CDR из любого  
40 из Abet0380, Abet0319, Abet0321b, Abet0322b, Abet0323b, Abet0328, Abet0329, Abet0332, Abet0342, Abet0343, Abet0369, Abet0370, Abet0371, Abet0372, Abet0373, Abet0374, Abet0377, Abet0378, Abet0379, Abet0381, Abet0382 и Abet0383 или их модифицированной на уровне генов зародышевого типа версии, с одной или двумя аминокислотными мутациями, например заменами.

45 К примеру, связывающий элемент может содержать

VH-домен, содержащий набор HCDR из Abet0380 или Abet0380GL, где аминокислотные последовательности HCDR из Abet0380 или Abet0380GL представляют собой

HCDR2

SEQ ID NO: 526 и

HCDR3

SEQ ID NO: 527,

или содержащий набор HCDR из Abet0380 с одной или двумя аминокислотными мутациями, и

5 (ii) VL-домен, содержащий набор LCDR из Abet0380 или Abet0380GL, где аминокислотные последовательности LCDR из Abet0380 или Abet0380GL представляют собой

LCDR1

SEQ ID NO: 534,

LCDR2

SEQ ID NO: 535 и

LCDR3

SEQ ID NO: 536,

или содержащий набор LCDR из Abet0380 или Abet0380GL с одной или двумя аминокислотными мутациями.

Теоретически, мутации можно осуществлять в любом остатке в наборе CDR. В некоторых вариантах осуществления замены можно осуществлять в положениях, замещенных в любом из Abet0380, Abet0319, Abet0321b, Abet0322b, Abet0323b, Abet0328, Abet0329, Abet0332, Abet0342, Abet0343, Abet0369, Abet0370, Abet0371, Abet0372, Abet0373, Abet0374, Abet0377, Abet0378, Abet0379, Abet0381, Abet0382 и Abet0383 по сравнению с Abet0144GL, или в положениях, замещенных в любом из Abet0319, Abet0321b, Abet0322b, Abet0323b, Abet0328, Abet0329, Abet0332, Abet0342, Abet0343, Abet0369, Abet0370, Abet0371, Abet0372, Abet0373, Abet0374, Abet0377, Abet0378, Abet0379, Abet0381, Abet0382 и Abet0383 по сравнению с Abet0380 или в их модифицированных на уровне генов зародышевого типа версиях, которые показаны в таблицах 5 и 6.

К примеру, одна или несколько замен могут находиться в одном или нескольких из следующих остатков по Kabat:

25 26, 27, 28, 29 или 30 в FW1 VH;  
31, 32, 33, 34 или 35 в CDR1 VH;  
52a, 53, 54, 55, 56, 57, 58 или 62 в CDR2 VH;  
98, 99, 100h или 102 в CDR3 VH;  
30 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 в CDR1 VL;  
89, 90, 92, 93, 94 или 97 в CDR3 VL.

Примеры возможных аминокислотных замен в конкретных положениях остатков по Kabat показаны в таблицах 12 и 14 для VH-домена и таблицах 13 и 15 для VL-домена.

Как описано выше, связывающий элемент может включать молекулу антитела с одним или несколькими CDR, например набором CDR, в каркасной области антитела. Например, один или несколько CDR или набор CDR антитела могут быть перевиты в каркасную область (например, каркасную область человека) с получением молекулы антитела. Каркасные области могут относиться к последовательностям сегментов гена зародышевого типа человека. Таким образом, каркасная область может быть модифицирована на уровне генов зародышевого типа, в котором один или несколько остатков в пределах каркасной области изменены, чтобы соответствовать остаткам в эквивалентном положении в наиболее сходной каркасной области зародышевого типа человека. Специалист в данной области может выбрать сегмент зародышевого типа, который по последовательности наиболее близок к последовательности каркасной области антитела до модифицирования на уровне генов зародышевого типа, и протестировать аффинность или активность антител для подтверждения того, что модифицирование на уровне генов зародышевого типа существенно не уменьшает связывание антигена или активность в анализах, описываемых в данном документе. Последовательности сегментов гена зародышевого типа человека известны специалистам

в данной области и к ним можно получить доступ, например, из компиляции VBASE (VBASE, Центр белковой инженерии совета медицинских исследований (MRC Centre of Protein Engineering), Великобритания, 1997, <http://mrc-cpe.cam.ac.uk>).

Связывающий элемент, как описано в данном документе, может представлять собой выделенную молекулу антитела человека с VH-доменом, содержащим набор HCDR в каркасной области зародышевого типа человека, например Vh3-23 DP-47. Таким образом, каркасные области FW1, FW2 и/или FW3 VH-домена могут включать каркасные области сегмента гена зародышевого типа человека Vh3-23 DP-47 и/или могут быть модифицированы на уровне генов зародышевого типа путем мутирования остатков каркасных областей, чтобы они совпадали с остатками каркасных областей этого сегмента гена зародышевого типа человека. FW4 может включать каркасную область сегмента j зародышевого типа человека.

Аминокислотная последовательность FW1 VH может представлять собой SEQ ID NO: 528. FW1 VH содержит серию остатков в положениях 26-30 по Kabat, которые, как полагают, участвуют в связывании антигена и/или важны для структурной конформации CDR1-петли. Замены можно включать в SEQ ID NO: 528, например, для синергического действия в отношении выбранной последовательности HCDR1. Одна или несколько замен необязательно могут быть выбраны из показанных в таблице 12 или таблице 14.

Аминокислотная последовательность FW2 VH может представлять собой SEQ ID NO: 529. Аминокислотная последовательность FW3 VH может представлять собой SEQ ID NO: 530. Аминокислотная последовательность FW4 VH может представлять собой SEQ ID NO: 531.

Обычно связывающий элемент также содержит VL-домен, содержащий набор LCDR, например, в каркасной области зародышевого типа человека, например V лямбда 23-3 DPL-23. Таким образом, каркасные области VL-домена могут включать каркасные области FW1, FW2 и/или FW3 сегмента гена зародышевого типа человека V лямбда 23-3 DPL-23 и/или могут быть модифицированы на уровне генов зародышевого типа путем мутирования остатков каркасных областей, чтобы они совпадали с остатками каркасных областей данного сегмента гена зародышевого типа человека. FW4 может включать каркасную область сегмента j зародышевого типа человека. Аминокислотная последовательность FW1 VL может представлять собой SEQ ID NO: 537. Аминокислотная последовательность FW2 VL может представлять собой SEQ ID NO: 538. Аминокислотная последовательность FW3 VL может представлять собой SEQ ID NO: 539. Аминокислотная последовательность FW4 VL может представлять собой SEQ ID NO: 540.

Модифицированный на уровне генов зародышевого типа VH- или VL-домен может быть модифицирован на уровне генов зародышевого типа в одном или нескольких остатках Вернье или может не быть модифицирован в них, но, как правило, не модифицирован.

Например, молекула антитела или VH-домен, описываемые в данном документе, могут содержать следующий набор каркасных областей тяжелой цепи:

FW1 SEQ ID NO: 528;

FW2 SEQ ID NO: 529;

FW3 SEQ ID NO: 530;

FW4 SEQ ID NO: 531;

или может содержать указанный набор каркасных областей тяжелой цепи с 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислотными мутациями, например заменами.

Молекула антитела или VL-домен, описываемые в данном документе, могут включать следующий набор каркасных областей легкой цепи:

FW1 SEQ ID NO: 537;  
 FW2 SEQ ID NO: 538;  
 FW3 SEQ ID NO: 539;  
 FW4 SEQ ID NO: 540;

5 или может содержать указанный набор каркасных областей легкой цепи с 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотными мутациями, например заменами.

Немодифицированная на уровне генов зародышевого типа молекула антитела имеет такие же CDR, но отличающиеся каркасные области по сравнению с модифицированной на уровне генов зародышевого типа молекулой антитела. Из последовательностей  
 10 антител, показанных в данном документе в прилагаемом перечне последовательностей, последовательности Abet0144-GL, Abet0380-GL, Abet0377-GL, Abet0343-GL, Abet0369-GL и Abet0382-GL являются модифицированными на уровне генов зародышевого типа. Модифицированные на уровне генов зародышевого типа антитела из других молекул антител, последовательности которых раскрыты в данном документе, можно получить  
 15 при помощи модифицирования на уровне генов зародышевого типа каркасных областей последовательностей их VH- и VL-домена, необязательно, в Vh3-23 DP-47 у VH-домена и V лямбда 23-3 DPL-23 у VL-домена.

Как правило, VH-домен составляет пару с VL-доменом для обеспечения антигенсвязывающего участка антитела, хотя, как обсуждается выше, VH- или VL-  
 20 домен отдельно могут применяться для связывания антигена. К примеру, VH-домен Abet0380-GL (SEQ ID NO: 524) можно составлять в пару с VL-доменом Abet0380-GL (SEQ ID NO:533), так что образуется антигенсвязывающий участок антитела, содержащий как VH-, так и VL-домены Abet0380-GL. Аналогичные варианты осуществления предусмотрены для VH- и VL-доменов других антител, описываемых в данном  
 25 документе. В других вариантах осуществления VH Abet0380-GL составляют в пару с VL-доменом, не являющимся VL Abet0380-GL. Разнородность легкой цепи хорошо известна в данной области. Опять же аналогичные варианты осуществления предусмотрены в настоящем изобретении для других VH- и VL-доменов, описываемых в данном документе. Таким образом, VH-домен, содержащий CDR VH или  
 30 модифицированную на уровне генов зародышевого типа последовательность VH-домена из любого из Abet0319, Abet0321b, Abet0322b, Abet0323b, Abet0328, Abet0329, Abet0332, Abet0342, Abet0343, Abet0369, Abet0370, Abet0371, Abet0372, Abet0373, Abet0374, Abet0377, Abet0378, Abet0379, Abet0380, Abet0381, Abet0382 и Abet0383, может быть составлен в пару с VL-доменом, содержащем CDR VL или модифицированный на уровне  
 35 генов зародышевого типа VL-домен из другого антитела, например VH- и VL-домены могут быть получены из различных антител, выбранных из Abet0319, Abet0321b, Abet0322b, Abet0323b, Abet0328, Abet0329, Abet0332, Abet0342, Abet0343, Abet0369, Abet0370, Abet0371, Abet0372, Abet0373, Abet0374, Abet0377, Abet0378, Abet0379, Abet0380, Abet0381, Abet0382 и Abet0383.

40 Связывающий элемент может содержать

(i) аминокислотную последовательность VH-домена, показанную в таблице 16 или в прилагаемом перечне последовательностей для любого из Abet0380, Abet0343, Abet0369, Abet0377 и Abet0382 или их модифицированной на уровне генов зародышевого типа версии,

45 или содержать такую аминокислотную последовательность с одной или двумя аминокислотными мутациями; и

(ii) аминокислотную последовательность VL-домена, показанную в таблице 16 или в прилагаемом перечне последовательностей для любого из Abet0380, Abet0343, Abet0369,

Abet0377 и Abet0382 или их модифицированной на уровне генов зародышевого типа версии,

или содержать такую аминокислотную последовательность с одной или двумя аминокислотными мутациями.

5 Молекула антитела может содержать:

(i) VH-домен с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90%, 95% или 98% идентична аминокислотной последовательности VH-домена, показанной в таблице 16 для любого из Abet0380, Abet0343, Abet0369, Abet0377 и Abet0382 или их модифицированной на уровне генов зародышевого типа версии; и

10 (ii) VL-домен с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90%, 95% или 98% идентична аминокислотной последовательности VL-домена, показанной в таблице 16 для любого из Abet0380, Abet0343, Abet0369, Abet0377 и Abet0382 или их модифицированной на уровне генов зародышевого типа версии.

15 Она может содержать VH-домен и VL-домен, которые по меньшей мере на 90%, 95% или 98% идентичны VH-домену и VL-домену, соответственно, из любого из Abet0380, Abet0343, Abet0369, Abet0377 и Abet0382, или их модифицированной на уровне генов зародышевого типа версии.

Связывающий элемент может содержать VH-домен и VL-домен, в которых

(i) аминокислотная последовательность VH-домена показана в SEQ ID NO: 524, а  
20 аминокислотная последовательность VL-домена показана в SEQ ID NO: 533.

(ii) аминокислотная последовательность VH-домена имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 524, а аминокислотная последовательность VL-домена имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 533 VL-домена, или

25 (iii) аминокислотная последовательность VH-домена характеризуется по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 524, а аминокислотная последовательность VL-домена характеризуется по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью  
30 последовательности с SEQ ID NO: 533.

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела может не иметь константных областей антитела, например scFv.

35 В других вариантах осуществления молекула антитела может содержать константную область антитела. Молекула антитела может представлять собой целое антитело, такое как IgG, т.е. IgG1, IgG2 или IgG4, или может представлять собой фрагмент или производное антитела, как описано ниже. Молекулы антитела также могут иметь другие форматы, например IgG1 с YTE (Dall'Acqua et al. (2002) J. Immunology, 169: 5171-5180; Dall'Acqua et al. (2006) J Biol. Chem. 281(33):23514-24) и/или мутациями TM (Oganessian et al. (2008) Acta Cryst D64:700-4) в Fc-области.

40 Настоящее изобретение предусматривает связывающий элемент по настоящему изобретению с вариантной Fc-областью, где вариант содержит остаток фенилаланина (F) в положении 234, остаток фенилаланина (F) или остаток глутаминовой кислоты (E) в положении 235 и остаток серина (S) в положении 331, пронумерованные посредством индекса EU, как приведено в Kabat. Такая комбинация мутаций далее в данном документе  
45 упоминается как тройной мутант (TM).

Связывающий элемент, как описано в данном документе, может включать CDR, VH-домен, VL-домен, антитело-антиген связывающий участок или молекулу антитела, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, и/или вектор из любого



из:

- (i) номера доступа депонирования NCIMB 41889 (Abet0007);
- (ii) номера доступа депонирования NCIMB 41890 (Abet0380-GL);
- (iii) номера доступа депонирования NCIMB 41891 (Abet0144-GL);
- (iv) номера доступа депонирования NCIMB 41892 (Abet0377-GL).

Связывающий элемент, как описано в данном документе, можно получать или иметь возможность получать из нуклеиновой кислоты, вектора или клеточной линии с номером доступа депонирования NCIMB 41889, 41890, 41891 или 41892. Например, связывающий элемент можно получать путем экспрессии нуклеиновой кислоты или вектора клеточной линии с номером доступа депонирования NCIMB 41890. Нуклеиновую кислоту или вектор можно экспрессировать при помощи любой удобной системы экспрессии. Альтернативно, связывающий элемент можно экспрессировать при помощи клеточной линии с номером доступа депонирования NCIMB 41889, 41890, 41891 или 41892.

В аспектах настоящего изобретения также предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая VH- и/или VL-домены, которую содержит клеточная линия с номером доступа 41889, 41890, 41891 или 41892; вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту, который содержит клеточная линия с номером доступа 41889, 41890, 41891 или 41892; и клетки или клеточная линия с номером доступа 41889, 41890, 41891 или 41892.

Связывающий элемент по настоящему изобретению может включать антигенсвязывающий участок антитела или молекулу антитела, которые конкурируют за связывание с человеческим A $\beta$ 1-42 с любой молекулой антитела, кодируемой нуклеиновой кислотой, депонированной под номером доступа 41889, 41890, 41891 или 41892, или с молекулой антитела, которая содержит аминокислотные последовательности VH-домена и VL-домена из Abet007, Abet0380-GL, Abet0144-GL или Abet0377-GL, как изложено в прилагаемом перечне последовательностей.

#### *Связывающий элемент*

Термин "связывающий элемент" описывает один элемент из пары молекул, которые связываются друг с другом. Элементы из пары связывания могут представлять собой полученные естественным путем или полученные полностью или частично синтетическим путем. Один элемент пары молекул содержит область на своей поверхности, или полость, которая связывается с и, следовательно, является комплементарной определенной пространственной и полярной организации другого элемента пары молекул. Примерами типов пар связывания являются антиген-антитело, биотин-авидин, гормон-рецептор гормона, рецептор-лиганд, фермент-субстрат. Настоящее изобретение касается реакций типа антиген-антитело.

Связывающий элемент обычно включает молекулу, имеющую антигенсвязывающий центр. Например, связывающий элемент может представлять собой молекулу антитела или белок, не являющийся антителом, которые содержат антигенсвязывающий центр.

Антигенсвязывающий участок можно получить при помощи расположения CDR на белковом каркасе, не являющимся антителом, таком как фибронектин или цитохром В и т.д. [Haan & Maggos (2004) BioCentury, 12(5): A1-A6; Koide et al. (1998) Journal of Molecular Biology, 284: 1141-1151; Nygren *et al.* (1997) Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469], или путем рандомизации или мутирования аминокислотных остатков петли в белковом каркасе для придания специфичности связывание с требуемой мишенью. Каркасы для конструирования новых участков связывания в белках подробно рассмотрены Nygren *и соавт.* [выше]. Каркасные белки для миметиков антител раскрыты в WO00/34784, включенном в данном документе посредством ссылки во всей своей

полноте, где авторы изобретения описывают белки (миметики антител), которые включают домен фибронектина типа III, содержащий по меньшей мере одну рандомизированную петлю. Подходящий каркас, на который перевивают один или несколько CDR, например набор HCDR или HCDR3 и/или LCDR3, можно получить из

любого доменного элемента суперсемейства генов иммуноглобулинов. Остов может представлять собой человеческий белок или белок, не являющийся человеческим. Преимущество белкового каркасной структуры, не являющейся антителом, состоит в том, что с помощью нее может быть получен антигенсвязывающий центр в молекуле каркасной структуры, меньшей, чем по меньшей мере некоторые молекулы антител, и/или которую легче производить. Малый размер связывающегося элемента может придавать полезные физиологические свойства, такие как способность попадать в клетки, проникать глубоко в ткани, или достигать мишеней в других структурах, или связываться в белковых полостях антигена-мишени. Применение антигенсвязывающих участков в белковых каркасах, не являющихся антителом, рассмотрено в Wess, 2004 [Wess, L. B: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004].

Типичными являются белки, обладающие стабильным остовом и одной или несколькими переменными петлями, в которых аминокислотная последовательность петли или петель является специфично или случайно мутированной для создания антигенсвязывающего участка, который связывается с антигеном-мишенью. Такие белки включают IgG-связывающие домены белка A из *S. aureus*, трансферрин, тетранектин, фибронектин (например, десятый домен фибронектина III типа), липокалина, а также гамма-кристаллин и другие каркасы Affilin™ (Scil Proteins). Примеры других подходов включают синтетические "микротела" на основе циклотидов - маленьких белков с внутримолекулярными дисульфидными связями, микропротеины (Versabodies™, Amunix) и белки с анкириновым повтором (DARPin, Molecular Partners).

В дополнение к последовательностям антител и/или антигенсвязывающему участку, связывающий элемент может включать другие аминокислоты, например, образующие пептид или полипептид, такой как свернутый домен, или придающие молекуле другую функциональную характеристику в дополнение к способности связывать антиген.

Связывающиеся элементы могут нести детектируемую метку или могут быть конъюгированы с токсином или нацеливающим компонентом или ферментом (например, посредством пептидильной связи или линкера). Например, связывающий элемент может содержать каталитический центр (например, в ферментном домене), а также антигенсвязывающий центр, где антигенсвязывающий центр связывается с антигеном и, таким образом, нацеливает каталитический центр на антиген. Каталитический центр может ингибировать биологическую функцию антигена, например, путем расщепления.

Хотя, как отмечается, CDR могут удерживаться на каркасах, не являющихся антителами, структура для переноса CDR, например CDR3 или набора CDR по данному изобретению, будет, как правило, представлять собой последовательность тяжелой или легкой цепи антитела или ее существенную часть, в которой CDR или набор CDR расположен в месте, соответствующем CDR или набору CDR из природных VH- и VL-переменных доменов антител, кодируемых перегруппированными генами иммуноглобулинов. The structures and locations of immunoglobulin variable domains may be determined by reference to Kabat, et al., 1987 [Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4<sup>th</sup> Edition. US Department of Health and Human Services. 1987] и их исправленные и дополненные издания. Ряд научных и коммерческих интерактивных ресурсов доступны для запросов в этой базе данных. Например, см. Martin, A.C.R. Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer PROTEINS: Structure, Function

and Genetics, 25 (1996), 130-133 и ассоциированный интерактивный ресурс, доступный в настоящее время по веб-адресу <http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>.

Как предполагается, область CDR или CDR обозначают гипервариабельные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, как определено у Kabat *и соавт.* 1991 [Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington], и более поздние издания. Антитело, как правило, содержит 3 CDR тяжелой цепи и 3 CDR легкой цепи. Термин CDR или области CDR применяют в данном документе для обозначения, в зависимости от случая, одного или нескольких из данных областей, или даже данных областей в целом, которые содержат большинство аминокислотных остатков, ответственных за связывание посредством аффинности антитела к антигену или эпитопу, который оно распознает.

Среди шести коротких последовательностей CDR, третий CDR тяжелой цепи (HCDR3) характеризуется большей вариабельностью размера (большим разнообразием, главным образом, из-за механизмов распределения генов, которые приводят к его возрастанию). Он может состоять всего из 2 аминокислот, при этом самый длинный размер составляет 26. Длина CDR также может варьировать в зависимости от длины, которую может предоставлять конкретный лежащий в основе каркасной области. Функционально, HCDR3 частично играет роль в определении специфичности антитела (Segal *et al.*, PNAS, 71:4298-4302, 1974; Amit *et al.*, Science, 233:747-753, 1986; Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901-917, 1987; Chothia *et al.*, Nature, 342:877- 883, 1989; Caton *et al.*, J. Immunol., 144:1965-1968, 199; Sharon *et al.*, PNAS, 87:4814-4817, 1990; Sharon *et al.*, J. Immunol., 144:4863-4869, 1990; и Kabat *et al.*, J. Immunol., 147:1709-1719, 1991).

#### Молекула антитела

В данном разделе описан иммуноглобулин, полученный либо естественным, либо частично или полностью синтетическим путем. Выражение также охватывает любой полипептид или белок, содержащий антигенсвязывающий центр антитела. В данной ситуации следует понимать, что настоящее изобретение не относится к антителам в естественной форме, иными словами, что они не находятся в их природном окружении, но они могли бы быть выделены или получены из природных источников путем очистки, либо, иначе, получены путем генетической рекомбинации или путем химического синтеза, и, следовательно, что они могут содержать неприродные аминокислоты, как будет описано ниже. Фрагменты антитела, которые содержат антигенсвязывающий участок антитела, включают без ограничений молекулы, такие как Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb и Fd. Были сконструированы различные другие молекулы антител, включающие один или несколько антигенсвязывающих участков антитела, в том числе, например Fab<sub>2</sub>, Fab<sub>3</sub>, диатела, тритела, тетратела и миниантитела. Молекулы антител и способы их конструирования и применения описаны в Holliger & Hudson, *Nature Biotechnology* 23(9):1126-1136 2005.

Возможно получать моноклональные и другие антитела и применять методики технологии рекомбинантных ДНК для получения других антител или химерных молекул, которые связывают антиген-мишень. Такие методики могут включать введение ДНК, кодирующей вариабельную область иммуноглобулина или CDR антитела, в гены константных областей или константных областей плюс каркасных участков различных иммуноглобулинов. См., например, EP-A-184187, GB 2188638A или EP-A-239400 и большое количество последующей литературы. Гибридому или другую клетку, вырабатывающую антитело, можно подвергать генетическому мутированию или другим изменениям, которые могут или не могут изменять специфичность связывания

вырабатываемых антител.

Поскольку антитела можно модифицировать различными способами, термин "молекула антитела" следует рассматривать как охватывающий любой связывающий элемент или вещество, обладающие антигенсвязывающим участком антитела с 5 требуемой специфичностью и/или связывающиеся с антигеном. Таким образом, данное выражение охватывает фрагменты и производные антитела, в том числе любой либо природный, либо полностью или частично синтетический полипептид, содержащий антигенсвязывающий центр антитела. Следовательно, охвачены химерные молекулы, содержащие антигенсвязывающий участок антитела или эквивалент, слитые с другим 10 полипептидом (например, полученным от другого вида или принадлежащим к другому классу или подклассу антител). Клонирование и экспрессия химерных антител описаны в EP-A-0120694 и EP-A-0125023 и в большом количестве последующей литературы.

Дополнительные методики, доступные в области техники, связанной с разработкой антител, сделали возможным выделение человеческих и гуманизированных антител. 15 Например, можно получать гибридомы человека, как описано в Kontermann & Dubel [Kontermann, R & Dubel, S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag New York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545]. Фаговый дисплей, другая признанная методика получения связывающих элементов, была подробно описана во многих публикациях, таких как Kontermann & Dubel [выше] и WO92/01047 (дополнительно обсуждают ниже), а также 20 патенты США №№ US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404.

Трансгенных мышей, у которых гены мышинового антитела инактивированы и функционально заменены генами антитела человека, при этом оставлены интактными 25 другие компоненты иммунной системы мыши, можно применять для выделения антител человека [Mendez, M. et al. (1997) *Nature Genet*, 15(2): 146–156]. Гуманизированные антитела могут быть получены с помощью методик, известных в уровне техники, таких как методики, раскрытые, например, в WO91/09967, US 5585089, EP592106, US 565332 и WO93/17105. Кроме того, в WO2004/006955 описаны способы гуманизирования антител, основанные на выборе 30 последовательностей каркаса переменных областей из генов антител человека путем сравнения канонических типов структур CDR последовательностей CDR переменной области антитела, не являющегося человеческим, с каноническими типами структур CDR соответствующих CDR из библиотеки последовательностей антител человека, например, генных сегментов антитела зародышевого типа. Переменные области антитела человека, 35 имеющие канонические типы структур CDR, сходные с CDR, не являющимися человеческими, образуют подмножество представителей последовательностей антитела человека, из которых можно выбирать последовательности каркаса человека.

Представители подмножества могут быть дополнительно выстроены в ряд по сходству аминокислот между последовательностями CDR человека и не являющимися 40 человеческими. В способе по WO2004/006955, последовательности высокого ранга человека выбирают так, чтобы обеспечить последовательности каркасных областей для создания химерного антитела, которое функционально заменяет последовательности CDR человека аналогами CDR не принадлежащих человеку, с применением выбранных каркасных областей подгруппы элементов человека, получая, тем самым, гуманизированное антитело 45 с высокой аффинностью и низкой иммуногенностью без необходимости сравнивать последовательности каркасных областей между антителами человека и не принадлежащими человеку. Также раскрыты химерные антитела, созданные согласно способу.

Синтетические молекулы антител можно создавать путем экспрессии генов,

полученных при помощи олигонуклеотидов, синтезированных и собранных в пределах подходящих векторов экспрессии, например, как описано Knappik *и соавт.* [Knappik *et al.* J. Mol. Biol. (2000) 296, 57-86] или Krebs *и соавт.* [Krebs *et al.* Journal of Immunological Methods 254 2001 67-84].

5 Было показано, что фрагменты полного антитела могут выполнять функцию связывания антигенов. Примеры связывающих фрагментов представляют собой (i) Fab-фрагмент, состоящий из VL-, VH-, CL- и CH1-доменов; (ii) Fd-фрагмент, состоящий из VH- и CH1-доменов; (iii) Fv-фрагмент, состоящий из VL- и VH-доменов одного антитела; (iv) dAb-фрагмент [Ward, E.S. *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989); McCafferty *et al.* 10 (1990) Nature, 348, 552-554; Holt *et al.* (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490], который состоит из VH- или VL-домена; (v) выделенные CDR-области; (vi) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, бивалентный фрагмент, содержащий два соединенных Fab-фрагмента, (vii) одноцепочечные Fv-молекулы (scFv), где VH-домен и VL-домен связаны пептидным линкером, который обеспечивает возможность двум доменам связываться с 15 образованием антигенсвязывающего участка [Bird *et al.*, Science, 242, 423-426, 1988; Huston *et al.*, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988]; (viii) биспецифичные одноцепочечные Fv-димеры (PCT/US92/09965) и (ix) "диатела", мультивалентные или мультиспецифичные фрагменты, сконструированные посредством слияния генов (WO94/13804; Holliger, P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993). Молекулы Fv, scFv или диатела можно 20 стабилизировать путем встраивания дисульфидных мостиков, соединяющих VH- и VL-домены [Reiter, Y. *et al.*, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996]. Также можно создавать миниантитела, содержащие scFv, присоединенный к CH3-домену [Hu, S. *et al.*, Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996]. Другие примеры связывающих фрагментов представляют собой Fab', который отличается от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков 25 на карбоксильном конце CH1-домена тяжелой цепи, в том числе одного или нескольких цистеинов из шарнирной области антитела, и Fab'-SH, который представляет собой Fab'-фрагмент, в котором цистеиновый(е) остаток(и) константных доменов несет(несут) свободную тиоловую группу.

Qui *и соавт.* [Qui *et al.*, Nat. Biotechnol. 25:921-929 2007] описали молекулы антител, 30 содержащие всего два CDR, связанные каркасной областью. CDR3 из VH или VL-домена соединяли с петлей CDR1 или CDR2 другого домена. Связь осуществлялась через C-конец выбранной CDR1 или CDR2 к N-концу CDR3 посредством FR-области. Qui *и соавт.* выбрали FR-область, обладающую наименьшим количеством гидрофобных отрезков. Установили, что наилучшей комбинацией для протестированного антитела 35 является CDR1 VL, связанный посредством FR2 VH с CDR3 VH (CDR1VH-FR2VH-CDR3VL). При молекулярном весе приблизительно 3 кДа, эти молекулы антитела дают преимущества с точки зрения улучшения проникновения в ткани по сравнению с полноценными иммуноглобулинами (около 150 кДа) или scFv (около 28 кДа).

40 Фрагменты антитела по настоящему изобретению можно получать, начиная с любого из антител, перечисленных в данном документе, такими способами, как расщепление ферментами, например пепсином или папаином, и/или путем расщепления дисульфидных мостиков химическим восстановлением. В еще одном способе фрагменты антитела, включенные в настоящее изобретение, можно получать с помощью методик 45 генетической рекомбинации, также хорошо известных специалисту в данной области, или же путем пептидного синтеза, например при помощи автоматических синтезаторов пептидов, таких как поставляемые компанией Applied Biosystems и т.д., или путем синтеза и экспрессии нуклеиновых кислот.

Функциональные фрагменты антитела, согласно настоящему изобретению, включают

любой функциональный фрагмент, время полужизни которого увеличено путем химического модифицирования, особенно ПЕГилированием, либо путем введения в липосому.

dAb (доменное антитело) представляет собой небольшой мономерный антигенсвязывающий фрагмент антитела, а именно переменную область тяжелой или легкой цепи антитела. VH dAb встречаются в природе у верблюдовых (например, верблюда, ламы) и их можно получить посредством иммунизации представителя верблюдовых антигеном-мишенью, выделения антиген-специфичных В-клеток и прямого клонирования генов dAb из отдельных В-клеток. dAb также может вырабатываться в культуре клеток. Их малый размер, хорошая растворимость и температурная устойчивость делает их особенно пригодными в физиологическом отношении и подходящими для отбора и созревания аффинности. VH dAb верблюдовых находятся в разработке для терапевтического применения под названием "nanobodies™". Связывающий элемент по настоящему изобретению может представлять собой dAb, содержащее VH- или VL-домен, по сути приведенный в данном документе, или VH- или VL-домен, содержащий ряд CDR, по сути приведенных в данном документе.

Биспецифические или бифункциональные антитела образуют второе поколение моноклональных антител, в которых две различные переменные области объединены в одной молекуле [Holliger and Bohlen 1999 *Cancer and Metastasis Rev.* 18. 411-419]. Их применение было продемонстрировано как в области диагностики, так и в области терапии благодаря их способности выполнять новые эффекторные функции или нацеливаться на несколько молекул на поверхности опухолевых клеток. При необходимости применять биспецифичные антитела, они могут представлять собой традиционные биспецифичные антитела, которые можно получать различными способами [Holliger, P. and Winter G. *Current Opinion Biotechnol* 4, 446-449. 1993], например, полученные химическим способом или при помощи гибридных гибридом, или они могут представлять собой любой из фрагментов биспецифичных антител, указанных выше. Эти антитела можно получить при помощи химических способов [Glennie M J *et al.*, 1987 *J. Immunol.* 139, 2367-2375; Repp R. *et al.*, 1995 *J. Hemat.* 377-382] или соматических способов [Staerz U. D. and Bevan M. J. 1986 *PNAS* 83; Suresh M. R. *et al.*, 1986 *Methods Enzymol.* 121: 210-228], но, кроме того и преимущественно, при помощи методик генной инженерии, которые обеспечивают возможность усиления гетеродимеризации и, таким образом, облегчают процесс очистки искомым антител [Merchand *et al.*, 1998 *Nature Biotech.* 16:677-681]. Примеры биспецифических антител включают биспецифические антитела технологии ViTE™, в которых могут быть использованы связывающие домены двух антител с различной специфичностью и могут быть напрямую связаны посредством коротких гибких пептидов. Таким образом комбинируют два антитела на одной короткой полипептидной цепи. Диатела и scFv могут быть сконструированы без Fc-области с использованием только переменных доменов, потенциально снижающих эффекты антиидиотипической реакции.

Биспецифичные антитела можно сконструировать в виде полного IgG, в виде биспецифичного Fab'2, в виде Fab'PEG, в виде диател или в виде биспецифичного scFv. Дополнительно, два биспецифичных антитела можно связать с использованием стандартных способов, известных в данной области, с образованием четырехвалентных антител.

Биспецифичные диатела, в отличие от биспецифичных полных антител, могут также быть особенно пригодными, поскольку их можно легко конструировать и экспрессировать в *E. coli*. Диатела (и многие другие полипептиды, такие как фрагменты

антитела) с подходящей специфичностью связывания можно легко выбрать с применением фагового дисплея (WO94/13804) из библиотек. Если одно плечо диатела следует сохранить константным, например со специфичностью, направленной против бета-амилоида, как описано в данном документе, то можно создать библиотеку, в которой варьирует другое плечо, и выбрать антитело с подходящей специфичностью. Биспецифичные целые антитела можно создавать при помощи альтернативных способов генной инженерии, как описано у Ridgeway и соавт., 1996 [Ridgeway, J. B. V. *et al.*, Protein Eng., 9, 616-621, 1996].

В области техники доступны различные способы получения антител. Антитела могут представлять собой моноклональные антитела, особенно, человеческого, мышиноного, химерного или гуманизированного происхождения, которые можно получить в соответствии со стандартными способами, хорошо известными специалисту в данной области.

В целом, для получения моноклональных антител или их функциональных фрагментов, особенно мышиноного происхождения, можно обращаться к методикам, которые описаны, в частности, в руководстве "Antibodies" [Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp. 726, 1988], или к методике получения с помощью гибридом, описанной у Köhler и Milstein [Köhler and Milstein, Nature, 256:495-497, 1975].

Моноклональные антитела можно получить, например, с помощью животной клетки, иммунизированной человеческим Аβ1-42 или одним из его фрагментов, содержащих эпитоп, распознаваемый указанными моноклональными антителами, например Аβ17-42. Подходящие фрагменты и пептиды или полипептиды, содержащие их, описаны в данном документе, и их можно применять для иммунизации животных с получением антител против Аβ1-42. Указанный антиген или один из его фрагментов можно, в частности, получить в соответствии с обычными рабочими способами, при помощи генетической рекомбинации, начиная с последовательности нуклеиновой кислоты, содержащейся в последовательности кДНК, кодирующей Аβ1-42 или его фрагмент, при помощи пептидного синтеза, начиная с последовательности аминокислот, содержащейся в пептидной последовательности Аβ1-42 и/или его фрагмента.

Моноклональные антитела, например, можно очищать на колонке для аффинной хроматографии, на которой предварительно был иммобилизован человеческий Аβ1-42 или один из его фрагментов, содержащий эпитоп, распознаваемый указанными моноклональными антителами, например Аβ17-42. Более конкретно, моноклональные антитела можно очистить с помощью хроматографии с применением белка А и/или G, за которой следует или не следует ионообменная хроматография, направленная на устранение остаточных белковых примесей, а также ДНК и LPS, за которой следует или не следует гель-хроматография на сефарозном геле для устранения возможных агрегатов из-за присутствия димеров или других мультимеров. В одном варианте осуществления можно применять все данные методики одновременно или последовательно.

#### *Антигенсвязывающий центр*

В данном разделе описана часть молекулы, которая связывается со всем или частью антигена-мишени и комплементарна таковому. В молекуле антитела ее называют антигенсвязывающим участком антитела, и она составляет часть антитела, которая связывается со всем или частью антигена-мишени и комплементарна таковому. В случае, когда антиген большой, антитело может связываться только с конкретной частью антигена, данная часть которого называется эпитоп. Антигенсвязывающий центр

антитела может быть представлен одним или несколькими вариабельными доменами антитела. Антигенсвязывающий участок антитела может содержать вариабельную область легкой цепи антитела (VL) и вариабельную область тяжелой цепи антитела (VH).

- 5 В WO 2006/072620 описано конструирование антигенсвязывающих участков в структурных (не CDR) петлях, расположенных между бета-цепями доменов иммуноглобулина. Антигенсвязывающий участок может быть сконструирован в области молекулы антитела, отделенной от естественного расположения CDR, например в каркасной области VH- или VL-домена или в константном домене антитела, например
- 10 CH1 и/или CH3. Антигенсвязывающий участок, сконструированный в структурной области, может дополнять или заменять антигенсвязывающий участок, образованный наборами CDR из VH- и VL-домена. Если в молекуле антитела присутствуют множественные антигенсвязывающие участки, они могут связывать один и тот же антиген (антиген-мишень), тем самым увеличивая валентность связывающего элемента.
- 15 Альтернативно, множественные антигенсвязывающие участки могут связывать различные антигены (антиген-мишень и один или несколько других антигенов), что может быть использовано для добавления эффекторных функций, продления времени полужизни или улучшения доставки молекулы антитела *in vivo*.

#### *Выделенные*

- 20 Это означает состояние, в котором связывающие элементы по настоящему изобретению или нуклеиновая кислота, кодирующая такие связывающие элементы, как правило, будут в целом соответствовать настоящему изобретению. Таким образом, связывающие элементы, VH- и/или VL-домены, а также кодирующие молекулы нуклеиновых кислот и векторы согласно настоящему изобретению можно получать
- 25 выделенными и/или очищенными, например, из их природного окружения, фактически в чистой или гомогенной форме, или, в случае нуклеиновой кислоты, не содержащими или фактически не содержащими нуклеиновую кислоту или гены с иным происхождением, чем последовательность, кодирующая полипептид с требуемой функцией. Выделенные элементы и выделенная нуклеиновая кислота не будут содержать
- 30 или фактически не будут содержать материал, с которым они связаны в естественных условиях, например другие полипептиды или нуклеиновые кислоты, с которыми их обнаруживают в их природном окружении или среде, в которой их получают (например, клеточной культуре), если такое получение осуществляют при помощи технологии рекомбинантной ДНК, применяемой на практике *in vitro* или *in vivo*. Элементы и
- 35 нуклеиновую кислоту можно составлять с разбавителями или вспомогательными веществами, и оставлять, для практических целей, выделенными – например элементы, как правило, будут смешивать с желатином или другими носителями, в случае применения для покрытия микротитрационных планшетов для применения в иммунологических анализах, или будут смешивать с фармацевтически приемлемыми
- 40 носителями или разбавителями при применении в диагностике или терапии. Связывающие элементы могут быть гликозилированными либо естественным путем, либо с помощью систем гетерологичных эукариотических клеток (например, клетки CHO или NS0 (ECACC 85110503)), или они могут быть негликозилированными (например, при получении путем экспрессии в прокариотической клетке).
- 45 Гетерогенные препараты, содержащие молекулы антитела, также образуют часть настоящего изобретения. Например, такие препараты могут представлять собой смеси антител с тяжелыми цепями полной длины и тяжелыми цепями с отсутствием лизина на С-конце, с различной степенью гликозилирования и/или с дериватизированными



аминокислотами, как, например, циклизация N-концевой глутаминовой кислоты с образованием остатка пироглутаминовой кислоты.

Применяемое в данном документе выражение "фактически, как изложено" относят к характеристике(ам) соответствующих областей CDR из VH- или VL-домена связывающих элементов, описываемых в данном документе, которые являются либо идентичными, либо в высокой степени подобны указанным областям, последовательность которых изложена в данном документе. Как описано в данном документе, выражение "в высокой степени подобные" по отношению к указанной(ым) области(ям) одного или нескольких переменных доменов, предполагает, что в CDR и/или VH- или VL-доме можно осуществить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

Как отмечено выше, связывающий элемент согласно настоящему изобретению связывает человеческий A $\beta$ 1-42. Как описано в данном документе, связывающие элементы по настоящему изобретению можно оптимизировать в отношении аффинности и/или в отношении активности ингибирования в конкурентном HTRF<sup>TM</sup>-анализе. В целом, оптимизация активности подразумевает мутирование последовательности выбранного связывающего элемента (обычно последовательности переменного домена антитела) для создания библиотеки связывающих элементов, которые затем анализируют на активность и выбирают более активные связывающие элементы. Таким образом, выбранные "оптимизированные в отношении активности" связывающие элементы, как правило, обладают более высокой активностью, чем связывающий элемент, из которого создали библиотеку. Тем не менее, связывающие элементы с высокой активностью можно также получать без оптимизации, например связывающий элемент с высокой активностью можно получить непосредственно при предварительном отборе. Анализы и активности более подробно описаны в другом месте в данном документе. Специалист в данной области, таким образом, может получать связывающие элементы с высокой активностью.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ получения одного или нескольких связывающих элементов, способных связывать антиген, при этом способ включает приведение библиотеки связывающих элементов согласно настоящему изобретению в контакт с указанным антигеном и выбор одного или нескольких связывающих элементов библиотеки, способных связывать указанный антиген.

Библиотека может быть представлена на частицах или молекулярных комплексах, например реплицируемых генетических пакетах, таких как дрожжи, бактериальные частицы или частицы бактериофага (например, T7), вирусы, клетки или ковалентные, рибосомные или другие *in vitro* системы дисплея, при этом каждая частица или молекулярный комплекс содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую VH-переменный домен антитела, представленный на ней, и необязательно также представленный VL-домен, в случае его присутствия. Фаговый дисплей описан в WO92/01047 и, например, патентах США №№ US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 и US6521404, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Рибосомный дисплей описан в Hanes J and Plückthun A. (1997) Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 May 13;94(10):4937-42; WO01/75097 и WO2006/072773, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

После выбора связывающих элементов, способных связывать антиген и

представленных на бактериофаге или других частицах или молекулярных комплексах библиотеки, нуклеиновую кислоту можно извлекать из бактериофага, или другой частицы, или молекулярного комплекса, представляющих указанный выбранный связывающий элемент. Такую нуклеиновую кислоту можно применять в последующем  
5 получении связывающего элемента или VH- или VL-вариабельного домена антитела путем экспрессии на основании нуклеиновой кислоты, при этом последовательность нуклеиновой кислоты извлечена из бактериофага, или другой частицы, или молекулярного комплекса, представляющих указанный выбранный связывающий элемент.

10 VH-вариабельный домен антитела с аминокислотной последовательностью VH-вариабельного домена антитела указанного выбранного связывающего элемента может быть получен в выделенной форме, как и связывающий элемент, содержащий такой VH-домен.

Способность связывать человеческий A $\beta$ 1-42 и A $\beta$ 1-40 можно дополнительно  
15 тестировать, а также способность конкурировать, например, с любым из антител, перечисленных в данном документе (например, формате scFv и/или формате IgG, например IgG2 или IgG1) за связывание с человеческим A $\beta$ 1-42. Можно тестировать способность нейтрализовать A $\beta$ 1-42, как дополнительно обсуждается в другом месте в данном документе.

Связывающий элемент может связывать человеческий A $\beta$ 1-42с аффинностью,  
20 свойственной любому из антител, перечисленных в таблицах 5 и 6, например scFv, IgG2, IgG1TM или IgG1, или с аффинностью, которая является лучшей. Аффинности связывания антител показаны в таблице 7. Аффинность связывания и активность нейтрализации различных связывающих элементов можно сравнивать при соответствующих условиях.

25 Варианты VH- и VL-доменов и CDR, описанных в данном документе, в том числе те, аминокислотные последовательности которых изложены в данном документе, и которые можно использовать в связывающих элементах для A $\beta$ 1-42, можно получать при помощи способов изменения или мутирования последовательности и скрининга в отношении антигенсвязывающих элементов с требуемыми характеристиками. Примеры  
30 требуемых характеристик включают без ограничений: повышенную аффинность связывания антигена по сравнению с известными антителами, которые являются специфичными для антигена, усиленную нейтрализацию активности антигена по сравнению с известными антителами, которые являются специфичными для антигена, если активность известна, указанную способность конкурировать с известным антителом  
35 или лигандом антигена при определенном молярном соотношении, способность к иммунопреципитации комплекса, способность связываться с указанным эпитопом: линейным эпитопом, например пептидной последовательностью, выявленной с применением сканирования связывания пептидов, как описано в данном документе, например, с применением пептидов, подвергнутых скринингу в линейной и/или  
40 затрудненной конформации, или конформационным эпитопом, образованным при помощи несмежных остатков; и способность к модуляции новой биологической активности человеческого A $\beta$ 1-42. В данном документе также предложены такие способы.

Варианты молекул антитела, раскрытых в данном документе, можно получать и  
45 применять в настоящем изобретении. Следуя примеру вычислительной химии в применении методик многофакторного анализа данных к соотношениям структура/ свойство - активность [см., например, Wold, *et al.* Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics—Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B. Kowalski); D. Reidel Publishing

Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN 90-277-1846-6), количественные соотношения активность-свойство антител можно получить с применением хорошо известных математических методик, таких как статистическая регрессия, распознавание образов и классификация [см., например, Norman et al. *Applied Regression Analysis*. Wiley-Interscience;

5 3<sup>rd</sup> edition (April 1998) ISBN: 0471170828; Kandel, Abraham *et al.* *Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis*. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995), ISBN: 0133418847; Krzanowski, Wojtek. *Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective* (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (December 2000), ISBN: 0198507089; Witten, Ian H. *et al*  
10 *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations*. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999), ISBN: 1558605525; Denison David G. T. (Editor) *et al* *Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression* (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (July 2002), ISBN: 0471490369; Ghose, Arup K. *et al.* *Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery*. ISBN: 0-8247-0487-8]. Свойства антител можно вывести на основании  
15 эмпирических и теоретических моделей (например, анализа вероятных соприкасающихся остатков или расчетных физико-химические свойств) последовательности антитела, функциональных и трехмерных структур, и данные свойства можно рассматривать индивидуально и в комбинации.

20 Антигенсвязывающий участок антитела, состоящий из VH-домена и VL-домена, как правило, образован шестью петлями полипептида: тремя, образованными варибельным доменом легкой цепи (VL), и тремя, образованными варибельным доменом тяжелой цепи (VH). Анализ антител с известной атомной структурой выявил взаимосвязи между последовательностью и трехмерной структурой паратопов антитела [Chothia C. *et al.* *Journal Molecular Biology* (1992) 227, 799-817; Al-Lazikani, *et al.* *Journal Molecular Biology*  
25 (1997) 273(4), 927-948]. Данные взаимосвязи подразумевают, что за исключением третьего участка (петли) в VH-доменах, петли центра связывания имеют одну из небольшого количества конформаций основной цепи - канонические структуры. Как было показано, каноническая структура, имеющая форму специфической петли, определяется ее  
30 размером и присутствием определенных остатков в ключевых участках, как в петле, так и в каркасных областях.

Данное исследование взаимосвязи последовательность-структура можно применять для прогнозирования остатков в антителе с известной последовательностью, но с неизвестной трехмерной структурой, которые важны для поддержания трехмерной структуры его петель CDR и, следовательно, поддерживают специфичность связывания.  
35 Эти прогнозы можно подкреплять путем сравнения прогнозов с выходными данными предварительных оптимизационных экспериментов. При структурном подходе можно создать модель молекулы антитела [Chothia, *et al.* *Science*, 223,755-758 (1986)] с применением любого свободно доступного или коммерческого пакета, такого как WAM [Whitelegg, N.R.u. and Rees, A.R (2000). *Prot. Eng.*, 12, 815-824]. Пакет программного  
40 обеспечения для визуализации и анализа белков, такой как Insight II (Accelrys, Inc.) или Deep View [Guex, N. and Peitsch, M.C. *Electrophoresis* (1997) 18, 2714-2723] можно затем применять для оценки возможных замен в каждом положении в CDR. Данную информацию можно затем использовать для того, чтобы сделать так, что замены вероятно будут оказывать минимальный или благоприятный эффект на активность.

45 Методики, необходимые для осуществления замен в аминокислотных последовательностях CDR VH- или VL-доменов антитела, и связывающие элементы, как правило, доступны в уровне техники. Можно создавать варианты последовательности с заменами, которые, как прогнозируют, могут оказывать или

могут не оказывать минимальное или благоприятное влияние на активность, и тестировать их в отношении способности связывать Аβ1-42 и/или в отношении любого другого требуемого свойства.

5 Варианты аминокислотных последовательностей варьируемых доменов любого из VH- и VL-доменов, чьи последовательности, в частности, раскрыты в данном документе, как рассматривалось, можно использовать согласно настоящему изобретению.

Как описано выше, аспекты настоящего изобретения предусматривают связывающий элемент, такой как молекула антитела, содержащая VH-домен, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по 10 меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности VH-домена любого из антител, перечисленных в данном документе, для которых последовательности VH-домена показаны в прилагаемом ниже перечне 15 последовательностей; и/или содержащая VL-домен, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности VL- 20 домена любого из антител, перечисленных в таблице 11, для которых последовательности VL-домена показаны в прилагаемом перечне последовательностей.

Аспекты настоящего изобретения предусматривают связывающий элемент, такой как молекула антитела, содержащая VH-домен с набором CDR VH, аминокислотные последовательности которых по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по 25 меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны аминокислотным последовательностям набора CDR VH любого из антител, перечисленных в данном документе, для которых последовательности CDR VH показаны в данном документе, 30 и/или содержащая VL-домен с набором CDR VL, аминокислотные последовательности которых по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны аминокислотным последовательностям 35 набора CDR VL любого из антител, перечисленных в данном документе, для которых последовательности CDR VL показаны в данном документе.

Алгоритмы, которые можно применять для расчета % идентичности двух аминокислотных последовательностей, включают, например, BLAST [Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410], FASTA [Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448] или 40 алгоритм Смита - Ватермана [Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197], например, при использовании параметров по умолчанию.

Конкретные варьируемые домены могут включать одну или несколько мутаций аминокислотных последовательностей (замену, делецию и/или вставку аминокислотного остатка) и менее чем приблизительно 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2.

45 Мутации можно выполнять в одной или нескольких каркасных областях и/или в одном или нескольких CDR. Мутации обычно не приводят к потере функции, поэтому связывающий элемент, содержащий измененную таким образом аминокислотную последовательность, может сохранять способность связывать человеческий Аβ1-42.

Он может сохранять такие же количественные характеристики способности к связыванию и/или нейтрализации, как у связывающего элемента, в котором изменение не выполняли, например, как измерено в анализе, описанном в данном документе.

Связывающий элемент, содержащий измененную таким образом аминокислотную последовательность, может характеризоваться улучшенной способностью связывать человеческий A $\beta$ 1-42.

Мутация может включать замену одного или нескольких аминокислотных остатков на не встречающуюся в природе или нестандартную аминокислоту, модифицируя один или несколько аминокислотных остатков с получением не встречающейся в природе или нестандартной формы, или вставку одной или нескольких не встречающихся в природе или нестандартных аминокислот в последовательность. Примеры числа и местоположений изменений в последовательностях по настоящему изобретению описаны в других частях данного документа. Встречающиеся в природе аминокислоты включают 20 "стандартных" L-аминокислот, обозначаемых как G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E их стандартным однобуквенным кодом. Нестандартные аминокислоты включают любой другой остаток, который может быть внедрен в полипептидный скелет или который получен в результате модификации существующего аминокислотного остатка. Нестандартные аминокислоты могут быть встречающимися в природе или не встречающимися в природе. В данной области известен ряд встречающихся в природе нестандартных аминокислот, таких как 4-гидроксипролин, 5-гидроксилизин, 3-метилгистидин, N-ацетилсерин и др. [Voet & Voet, *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> Edition, (Wiley) 1995]. Аминокислотные остатки, дериватизированные по их N-альфа-положению, будут расположены только на N-конце аминокислотной последовательности. Как правило, в настоящем изобретении аминокислота представляет собой L-аминокислоту, однако она может представлять собой D-аминокислоту. Изменение может, таким образом, включать модификацию L-аминокислоты с получением D-аминокислоты или замену ее таковой. Метилированные, ацетилированные и/или фосфорилированные формы аминокислот также известны, и аминокислоты в настоящем изобретении могут быть подвергнуты таким модификациям.

Аминокислотные последовательности в доменах антитела и связывающие элементы по настоящему изобретению могут содержать неприродные или нестандартные аминокислоты, описанные выше. Нестандартные аминокислоты (например, D-аминокислоты) могут быть внедрены в аминокислотную последовательность во время синтеза или с помощью модификации или замены "первоначальных" стандартных аминокислот после синтеза аминокислотной последовательности.

Применение нестандартных и/или не встречающихся в природе аминокислот увеличивает структурное и функциональное разнообразие и может, таким образом, увеличивать возможность получения требуемых свойств связывания и нейтрализации у связывающего элемента по настоящему изобретению. Также было показано, что D-аминокислоты и аналоги имеют отличающиеся фармакокинетические профили по сравнению со стандартными L-аминокислотами, в силу *in vivo* разложения полипептидов с L-аминокислотами после введения животному, например человеку, что означает, что D-аминокислоты являются предпочтительными для некоторых способов применения *in vivo*.

Новые VH- или VL-области, несущие полученные из CDR последовательности по настоящему изобретению, можно получать с применением случайного мутагенеза одного или нескольких выбранных VH- и/или VL-генов с созданием мутаций в пределах всего вариабельного домена. Такая методика описана Gram *et al.* [Gram *et al.*, 1992, *Proc.*

*Natl. Acad. Sci., USA*,89:3576-3580], которые применяли ПЦР сниженной точности. В некоторых вариантах осуществления одну или две аминокислотные замены осуществляют в пределах всего варибельного домена или набора CDR.

Другой способ, который можно применять, представляет собой направление мутагенеза на CDR-области VH- или VL-генов. Такие методики раскрыты у Barbas *и соавт.* [Barbas *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*,91:3809-3813] и Schier *и соавт.* [Schier *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.*263:551-567].

Все вышеописанные методики известны как таковые в данной области, и специалист сможет применить такие методики для получения связывающих элементов по настоящему изобретению с применением стандартной методологии в данной области.

Дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает способ получения антигенсвязывающего участка антитела против человеческого Аβ1-42, при этом способ включает получение путем замены, делеции или вставки одной или нескольких аминокислот в аминокислотной последовательности VH-домена, изложенного в данном документе, VH-домена, который представляет собой вариант аминокислотной последовательности VH-домена, необязательно комбинирование VH-домен, полученного таким образом, с одним или несколькими VL-доменами и тестирование VH-домена или комбинации или комбинаций VH/VL для выявления связывающего элемента или антигенсвязывающего участка антитела против Аβ1-42, которые, необязательно, обладают одним или несколькими требуемыми свойствами. Указанный VL-домен может иметь аминокислотную последовательность, по сути приведенную в данном документе. Можно использовать аналогичный способ, в котором один или несколько вариантов последовательности VL-домена, раскрытых в данном документе, комбинируют с одним или несколькими VH-доменами.

Как отмечалось выше, аминокислотная последовательность CDR фактически такая, как изложено в данном документе, может быть встроена в качестве CDR в варибельный домен антитела человека или его существенную часть. Последовательности HCDR3, фактически такие, как изложено в данном документе, представляют варианты осуществления настоящего изобретения, и каждая из них может быть встроена в качестве HCDR3 в варибельный домен тяжелой цепи человека или его существенную часть.

Варибельные домены, используемые в настоящем изобретении, могут быть образованы или получены из любого варибельного домена зародышевого типа или преобразованного варибельного домена человека или могут представлять собой синтетический варибельный домен, основанный на консенсусных или реально существующих последовательностях известных варибельных доменов человека. Варибельный домен можно получать из антитела, не являющегося человеческим. Последовательность CDR по настоящему изобретению (например, CDR3) может быть введена в репертуар варибельных доменов, в которых отсутствует CDR (например, CDR3), с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Например, Marks *et al.* [Marks *et al. Bio/Technology*, 1992, 10:779-783] описывают способы получения спектров варибельных доменов антител, в которых консенсусные праймеры, направленные на 5'-конец области варибельного домена или смежные с ним, применяются в сочетании с консенсусными праймерами к третьей каркасной области генов VH человека для получения спектра варибельных доменов VH с недостатком CDR3. Marks *и соавт.* дополнительно описывают, как этот спектр можно комбинировать с CDR3 конкретного антитела. С помощью аналогичных методик полученные на основе CDR3 последовательности по настоящему изобретению, могут быть перетасованы с репертуарами VH- или VL-доменов, в которых отсутствует CDR3, и полные VH- или

VL-домены после перетасовки комбинируют с родственным VL- или VH-доменом с получением связывающих элементов по настоящему изобретению. Затем спектр можно представлять на подходящей системе хозяина, такой как система фагового дисплея из WO92/01047, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, или в любой из последующей многочисленной литературы, в том числе Kay, Winter и McCafferty [Kay, B.K., Winter, J., and McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press], так что можно выбрать подходящий связывающий элемент. Спектр может состоять всего из  $10^4$  отдельных элементов и более, например по меньшей мере  $10^5$ , по меньшей мере  $10^6$ , по меньшей мере  $10^7$ , по меньшей мере  $10^8$ , по меньшей мере  $10^9$  или по меньшей мере  $10^{10}$  элементов или более. Другие подходящие системы хозяев включают без ограничений дрожжевой дисплей, бактериальный дисплей, T7 дисплей, вирусный дисплей, клеточный дисплей, рибосомный дисплей и ковалентный дисплей.

Предусмотрен способ получения связывающего элемента для человеческого A $\beta$ 1-42, причем способ включает:

(a) получение исходного спектра нуклеиновых кислот, кодирующих VH-домен, который либо включают CDR3, подлежащий замене, или не содержат область, кодирующую CDR3;

(b) объединение указанного спектра с донорной нуклеиновой кислотой, кодирующей аминокислотную последовательность, фактически такую, как изложено в данном документе для CDR3 VH, например CDR3 VH, показанного в таблице 11, так что указанную донорную нуклеиновую кислоту вводят в CDR3-область в спектр, так чтобы получить получаемый в результате спектр нуклеиновых кислот, кодирующих VH-домен;

(c) экспрессию нуклеиновых кислот указанного получаемого в результате спектра;

(d) отбор связывающего элемента для человеческого A $\beta$ 1-42; и

(e) выделение указанного связывающего элемента или нуклеиновой кислоты, кодирующей его.

И в этом случае, можно применять аналогичный способ, в котором CDR3 VL по настоящему изобретению комбинируют со спектром нуклеиновых кислот, кодирующих VL-домен, которые либо включают CDR3, подлежащий замене, либо не содержат область, кодирующую CDR3.

Аналогично, один, или несколько, или все три CDR можно прививать в спектр VH- или VL-доменов, которые затем подвергают скринингу в отношении связывающего элемента или связывающих элементов для человеческого A $\beta$ 1-42.

К примеру, можно использовать HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, например набор HCDR, из одного или нескольких антител, перечисленных в таблице 5 или таблице 6, и/или можно использовать LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3, например набор LCDR, из одного или нескольких антител, перечисленных в данном документе.

Аналогично, можно использовать другие VH и VL-домены, наборы CDR и наборы HCDR и/или наборы LCDR, раскрытые в данном документе.

Существенная часть варибельного домена иммуноглобулина может включать по меньшей мере три области CDR вместе с их промежуточными каркасными областями. Данная часть может также состоять по меньшей мере приблизительно на 50% из одной или обеих из первой и четвертой каркасных областей, при этом 50% представляют собой С-терминальные 50% первой каркасной области и N-терминальные 50% четвертой каркасной области. Дополнительные остатки на N-терминальном или С-терминальном конце значительной части варибельного домена могут представлять собой остатки,

которые обычно не связаны с встречающимися в природе областями переменных доменов. Например, конструирование связывающих элементов по настоящему изобретению, осуществляемое с помощью методик рекомбинантных ДНК, может привести в результате к введению N- или C-терминальных остатков, кодируемых линкерами, вводимыми для обеспечения клонирования или других этапов манипуляций. Другие стадии манипуляции включают введение линкеров для присоединения переменных доменов по настоящему изобретению к дополнительным белковым последовательностям, в том числе константным областям антитела, другим переменным доменам (например, при получении диател) или детектируемым/ функциональным меткам, которые обсуждаются более подробно в других местах в данном документе.

Хотя в некоторых аспектах настоящего изобретения, связывающие элементы содержат пару VH- и VL-доменов, одиночные связывающие домены на основе последовательностей либо VH-, либо VL-доменов образуют дополнительные аспекты настоящего изобретения. Известно, что одиночные домены иммуноглобулинов, особенно VH-домены, способны связывать антигены-мишени специфичным способом. Например, см. обсуждение dAb выше.

В случае любого из одиночных связывающих доменов, эти домены можно применять для скрининга комплементарных доменов, способных образовывать двухдоменный связывающий элемент, способный связывать A $\beta$ 1-42. Этого можно достичь посредством способов скрининга фагового дисплея с применением так называемого иерархического двойного комбинаторного подхода, раскрытого в WO92/01047, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, в котором применяют отдельные колонии, содержащие клон либо H, либо L цепи, для заражения полной библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (L или H), а полученный двухцепочечный связывающий элемент выбирают в соответствии с методиками фагового дисплея, как, например, описанными в данной ссылке. Эта методика также раскрыта в Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 1992, 10:779-783.

Связывающие элементы по настоящему изобретению могут дополнительно включать константные области антител или их части, например константные области антител человека или их части. Например, VL-домен можно присоединять на его C-терминальном конце к константным доменам легкой цепи антитела, в том числе цепей С $\kappa$  или С $\lambda$  человека. Аналогично, связывающий элемент на основе VH-домена можно присоединять на его C-терминальном конце ко всему или части (например, СH1-домену) тяжелой цепи иммуноглобулина, полученной из любого изотипа антитела, например IgG, IgA, IgE и IgM и любого из подклассов изотипов, в частности, IgG2, IgG1 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления предпочтительным может быть IgG2, вследствие отсутствия у него эффекторных функций. В других вариантах осуществления предпочтительным может быть IgG1, в связи с его эффекторной функцией и простотой получения. Любой синтетический или другой вариант константной области, который обладает этими свойствами и стабилизирует переменные области, может также применяться в настоящем изобретении.

Связывающие элементы можно метить детектируемой или функциональной меткой. Таким образом, связывающий элемент или молекула антитела могут присутствовать в виде иммуноконъюгата, для получения детектируемого и/или количественно измеряемого сигнала. Иммуноконъюгат может содержать молекулу антитела по настоящему изобретению, конъюгированную с детектируемой или функциональной меткой. Детектируемая метка, как указано в данном документе, может представлять



собой любую метку, которая вырабатывает или которую можно индуцировать к выработке сигнала, в том числе без ограничений люминофоры, хемилюминесцеры (например, пероксидаза хрена), окрашенные метки (например, латекс [синий] или коллоидное золото [красный]), радиоактивные метки, ферменты, фотосенсибилизаторы и магнитные метки. Количество метки, связанной на поверхности, например поверхности капиллярного отверстия, следовательно, можно выявлять и/или измерять посредством выявления флуоресценции или люминесценции, цвета, радиоактивности, активности фермента, поглощения света или изменений в магнитном поле. Детектируемые метки можно присоединять к связывающим элементам с применением традиционных методов химии. Предпочтительно, детектируемая метка представляет собой метку, которую можно выявлять при помощи оптических считываний, например, с помощью цифровой камеры или планшетного сканера. Метки, которые можно выявлять посредством оптических считываний, включают люминофоры, хемилюминесцеры и окрашенные метки. Механизм, при помощи которого сигнал может вырабатываться для оптического выявления, включает (но не обязательно ограничиваться): поглощение света, рассеивание света, дифракцию света, отражение света, флуоресценцию или люминесценцию.

Подходящие метки включают в качестве иллюстрации, а не ограничения ферменты, такие как щелочная фосфатаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа ("G6PDH"), альфа-D-галактозидаза, глюкооксидаза, глюкоамилаза, карбоангидраза, ацетилхолинэстераза, лизоцим, малатдегидрогеназа и пероксидаза, например пероксидаза хрена;

красители;

флуоресцентные метки или люминофоры, такие как флуоресцеин и его производные, флуорохром, соединения и производные родамина, GFP (GFP – "зеленый флуоресцентный белок"), дансил, умбеллиферон, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о-фталевый альдегид и флуорескамин; флуорофоры, такие как криптаты и хелаты лантаноидов, например европия, и т.д. (Perkin Elmer and Cis Biointernational),

хемолюминесцентные метки или хемилюминесцеры, такие как изолюминол, люминолом и диоксетаны;

биолюминесцентные метки, такие как люцифераза и люциферин;

сенсбилизаторы;

коферменты;

субстраты ферментов;

радиоактивные метки, в том числе без ограничений бром<sup>77</sup>, углерод<sup>14</sup>, кобальт<sup>57</sup>, фтор<sup>8</sup>, галлий<sup>67</sup>, галлий<sup>68</sup>, водород<sup>3</sup> (тритий), индий<sup>111</sup>, индий<sup>113m</sup>, йод<sup>123m</sup>, йод<sup>125</sup>, йод<sup>126</sup>, йод<sup>131</sup>, йод<sup>133</sup>, ртуть<sup>107</sup>, ртуть<sup>203</sup>, фосфор<sup>32</sup>, рений<sup>99m</sup>, рений<sup>101</sup>, рений<sup>105</sup>, рутений<sup>95</sup>, рутений<sup>97</sup>, рутений<sup>103</sup>, рутений<sup>105</sup>, скандий<sup>47</sup>, селен<sup>75</sup>, сера<sup>35</sup>, технеций<sup>99</sup>, технеций<sup>99m</sup>, теллур<sup>121m</sup>, теллур<sup>122m</sup>, теллур<sup>125m</sup>, тулий<sup>165</sup>, тулий<sup>167</sup>, тулий<sup>168</sup>, иттрий<sup>199</sup> и другие радиоактивные метки, упомянутые в данном документе;

частицы, такие как латексные частицы или частицы углерода; золь металла; кристаллит; липосомы; клетки и т.д., которые можно дополнительно метить красителем, катализатором или другой детектируемой группой;

молекулы, такие как биотин, дигоксигенин или 5-бромдезоксиуридин;

компоненты токсинов, такие как, например, компонент токсина, выбранный из группы экзотоксина *Pseudomonas* (PE или его цитотоксический фрагмент или мутант), дифтерийный токсин или его цитотоксический фрагмент или мутант, ботулинический

токсин типов А, В, С, D E или F, рицин или его цитотоксический фрагмент, например рицин А, абрин или его цитотоксический фрагмент, сапорин или его цитотоксический фрагмент, антивирусный токсин лаконоса или его цитотоксический фрагмент и бриодин 1 или его цитотоксический фрагмент.

5 Примеры подходящих ферментов и коферментов раскрыты в US4275149 и US4318980. Подходящие люминофоры и хемилюминесцеры также раскрыты в US4275149. Метки дополнительно включают химические компоненты, такие как биотин, который можно выявлять посредством связывания со специфическим когнатным детектируемым компонентом, например меченым авидином или стрептавидином. Детектируемые метки  
10 можно прикреплять к антителам по настоящему изобретению с применением традиционных методов химии, известных в данной области.

Иммуноконъюгаты или их функциональные фрагменты можно получать способами, известными специалистам в данной области. Их можно присоединять к ферментам или к флуоресцентным меткам напрямую или посредством спейсерной группы или  
15 связывающей группы, такой как полиальдегид, например глутаральдегид, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), диэтилентриаминпентауксусная кислота (DPTA), либо в присутствии связывающих средств, таких как упомянутые выше, для терапевтических конъюгатов. Конъюгаты, содержащие метки типа флуоресцеина можно получать путем реакции с изотиоцианатом.

20 Способы, известные в данной области для присоединения терапевтических радиоизотопов к антителам либо напрямую, либо при помощи хелатирующего средства, такого как EDTA, DTPA, которые упоминаются выше, также можно применять для радиоактивных элементов, которые можно применять в диагностике. Кроме того, возможно выполнять мечение натрием<sup>125</sup> с помощью методики с хлорамином Т [Hunter  
25 W. M. and Greenwood F. C. (1962) Nature 194:495], либо технецием<sup>99m</sup> с помощью методики по US4424200 или присоединенным посредством DTPA, как описано в US4479930.

Существуют многочисленные способы, посредством которых метка может создавать сигнал, детектируемый с помощью внешних средств, например с помощью визуального  
30 осмотра, электромагнитного излучения, тепла и химических реагентов. Метку можно также связывать с другим связывающим элементом, который связывает антитело по настоящему изобретению, или с подложкой.

Метка может непосредственно вырабатывать сигнал и, следовательно, для выработки сигнала не требуются дополнительные компоненты. Многочисленные органические  
35 молекулы, например люминофоры, способны поглощать ультрафиолетовый и видимый свет, при этом поглощение света передает энергию этим молекулам и приводит их в возбужденное энергетическое состояние. Эта поглощенная энергия затем рассеивается путем излучения света на второй длине волны. Это излучение на второй длине волны может также передавать энергию меченой акцепторной молекуле, и получаемая в  
40 результате энергия рассеивается от акцепторной молекулы путем излучения света, например резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Другие метки, которые непосредственно вырабатывают сигнал, включают радиоактивные изотопы и красители.

Альтернативно, метке могут потребоваться другие компоненты для выработки сигнала, а система, вырабатывающая сигнал, будет тогда включать все компоненты, требуемые  
45 для выработки поддающегося измерению сигнала, которые могут включать субстраты, коферменты, энхансеры, дополнительные ферменты, вещества, которые вступают в реакцию с ферментативными продуктами, катализаторы, активаторы, кофакторы, ингибиторы, акцепторы, ионы металлов, а также специфическое связывающее вещество, требуемое для связывания веществ, генерирующих сигнал. Подробное обсуждение

подходящих систем, создающих сигнал, можно найти в US5185243.

Аспект настоящего изобретения предлагает способ, включающий обеспечение или разрешение связывания связывающего элемента, как предусмотрено в данном документе, с человеческим Аβ1-42. Как отмечалось, такое связывание может происходить *in vivo*, например, после введения связывающего элемента или нуклеиновой кислоты, кодирующей связывающий элемент, или оно может происходить *in vitro*, например, при ELISA, Вестерн-блоттинге, иммуноцитохимии, иммунопреципитации, аффинной хроматографии и биохимических или клеточных анализах.

Настоящее изобретение также предусматривает непосредственное измерение уровней антигена, например, в плазме или CSF, путем использования связывающего элемента по настоящему изобретению, например в системе биосенсора. Например, способ выявления и/или измерения связывания с человеческим Аβ1-42 может включать, (i) воздействие на указанный связывающий элемент Аβ1-42 и (ii) выявление связывания указанного связывающего элемента с Аβ1-42, где связывание выявляют с применением любого способа или детектируемой метки, описанной в данном документе. Аβ1-42 может представлять собой мономерный или олигомерный Аβ1-42, предпочтительно мономерный Аβ1-42. Данный, а также любой другой способ выявления связывания, как описано в данном документе, могут интерпретироваться непосредственно лицом, осуществляющим способ, например путем визуального наблюдения детектируемой метки. Альтернативно, данный способ или любой другой способ выявления связывания, описываемый в данном документе, может предоставлять отчет в виде автордиограммы, фотографии, компьютерной распечатки, отчета проточной цитометрии, графика, диаграммы, тестовой пробирки, или контейнера, или лунки, которые содержат результат, или любого другого визуального или физического представления результата способа.

Можно определять количественный показатель связывания связывающего элемента с Аβ1-42. Количественное определение может быть связано с количеством антигена в тестируемом образце, который может представлять диагностический интерес. Скрининг в отношении связывания Аβ1-42 и/или его количественное определение могут быть применимыми, например, в скрининге пациентов на заболевания или нарушения, упоминаемые в данном документе, и/или любое другое заболевание или нарушение, связанное с аберрантными уровнями и/или активностью Аβ1-42.

Диагностический способ может включать (i) получение образца ткани или жидкости от субъекта, например пациента, у которого предполагают состояние или заболевание, упомянутое в данном документе, или уверены в них; (ii) воздействие на указанный образец ткани или жидкости одним или несколькими связывающими элементами по настоящему изобретению; и (iii) выявление связанного Аβ1-42 по сравнению с контрольным образцом, где увеличение величины связывания Аβ1-42 по сравнению с контролем может указывать на аберрантный уровень Аβ1-42. Образцы ткани или жидкости для тестирования включают кровь, сыворотку крови, плазму, CSF, мочу, биоптат, опухоли или любую ткань, которая предположительно содержит аберрантные уровни Аβ1-42. Субъекты с положительным результатом теста на аберрантные уровни и активность Аβ1-42 также могут получать пользу от способов лечения, раскрытых далее в данном документе.

Специалисты в данной области способны выбрать подходящий способ определения связывания связывающего элемента с антигеном в соответствии с их предпочтениями и общими сведениями в свете способов, раскрытых в данном документе.

Реакционную способность связывающих элементов в образце можно определить с помощью любых подходящих способов. Радиоиммуноанализ (RIA) является одной из возможностей. Антиген с радиоактивной меткой смешивают с немеченным антигеном

(тестируемый образец) и оставляют для связывания со связывающим элементом. Связанный антиген физически отделяют от несвязанного антигена и определяют количество радиоактивного антигена, связанного со связывающим элементом. Чем больше антигена присутствует в тестируемом образце, тем меньше радиоактивного антигена свяжется со связывающим элементом. Также можно применять анализ конкурентного связывания с нерадиоактивным антигеном с применением антигена или его аналога, связанного с репортерной молекулой. Репортерной молекулой может являться флуорохромом, фосфор или лазерный краситель со спектрально изолированными характеристиками поглощения или излучения. Подходящие флуорохромы включают флуоресцеин, родамин, фикоэритрин и тexasский красный, а также хелаты или криптаты лантаноидов. Подходящие хромогенные красители включают диаминобензидин.

Другие репортеры включают макромолекулярные коллоидные частицы или материал на основе частиц, такие как латексные гранулы, которые окрашены, магнетики или парамагнетики и биологически или химически активные средства, которые могут прямо или непрямо вызывать детектируемые сигналы, которые наблюдают визуально, обнаруживают электронными средствами или регистрируют иным образом. Такие молекулы могут представлять собой ферменты, катализирующие реакции, в которых, например, проявляется окрашивание, или меняется цвет, или изменяются электрические свойства. Они могут вызывать возбуждение на молекулярном уровне, так что электронные переходы между энергетическими состояниями приводят к характерному спектральному поглощению или эмиссии. Они могут включать химические соединения, используемые в сочетании с биосенсорами. Можно использовать системы выявления на основе биотина/авидина или биотина/стрептавидина и щелочной фосфатазы.

Сигналы, генерируемые отдельными конъюгатами связывающий элемент-репортер, можно применять для получения количественно определяемых абсолютных или относительных данных связывания соответствующего связывающего элемента в образцах (нормальные и тестируемые).

Набор, содержащий связывающий элемент, описываемый в данном документе, также предусмотрен как один из аспектов настоящего изобретения. В наборе связывающий элемент можно пометить, чтобы обеспечить его реакционную способность в образце, например, как дополнительно описано ниже. Дополнительно, связывающий элемент можно прикреплять или не прикреплять к твердой подложке. Компоненты набора обычно стерильны и находятся в герметичных флаконах или других контейнерах. Наборы можно использовать в диагностическом анализе или других способах, для которых пригодны связывающие элементы. Набор можно применять в способе, описываемом выше. Набор может содержать инструкции по использованию компонентов в способе, например способе в соответствии с настоящим изобретением. Вспомогательные материалы, способствующие или обеспечивающие возможность осуществления такого способа могут включаться в набор по настоящему изобретению. Вспомогательные материалы включают второй, отличающийся связывающий элемент, который связывается с первым связывающим элементом и конъюгирован с детектируемой меткой (например, флуоресцентной меткой, радиоактивным изотопом или ферментом). Наборы на основе антител могут также содержать микрогранулы для проведения иммунопреципитации. Каждый компонент наборов, как правило, находится в собственном подходящем контейнере. Таким образом, эти наборы, как правило, содержат различные контейнеры, подходящие для каждого связывающего элемента. Дополнительно, наборы могут содержать инструкции для выполнения анализа и

способов для интерпретации и анализа данных, полученных в результате выполнения анализа.

Настоящее изобретение также предусматривает применение связывающего элемента, описанного выше, для измерения уровней антигена в конкурентном анализе, то есть способ измерения уровня антигена в образце с использованием связывающего элемента, 5 предусматриваемого в настоящем изобретении, в конкурентном анализе. Его проводят, если физическое разделение связанного и несвязанного антигена не требуется. Одной из возможностей является связывание репортерной молекулы со связывающим элементом, в силу чего при связывании происходит физическое или оптическое изменение. Репортерная молекула может прямо или опосредованно генерировать 10 детектируемые сигналы, которые можно измерять количественно. Связывание репортерных молекул может быть прямым или опосредованным, ковалентным, например через пептидную связь, или нековалентным. Связывание через пептидную связь может представлять собой результат рекомбинантной экспрессии слияния генов, 15 кодирующих антитело и репортерную молекулу.

Конкуренцию между связывающими элементами можно легко проанализировать *in vitro*, например, при помощи ELISA и/или биохимического анализа конкуренции, такого как маркирования специфической репортерной молекулой одного связывающего 20 элемента, который можно выявить в присутствии одного или нескольких других связывающих элементов без маркера, с возможностью идентификации связывающих элементов, которые связываются с тем же эпитопом или перекрывающимся эпитопом. Такие способы хорошо известны обычному специалисту в данной области, и описаны более подробно в данном документе.

Настоящее изобретение распространяется на связывающий элемент, который 25 конкурирует за связывание с человеческим A $\beta$ 1-42с любым связывающим элементом, определенным в данном документе, например любым из антител, перечисленных в таблицах 5 и 6, например в формате IgG2, IgG1 или тройной мутации IgG1 ("TM"; Oganessian *et al.* (2008) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 64(Pt 6):700-4). Конкуренцию между связывающими элементами можно легко проанализировать *in vitro*, например, 30 путем маркирования специфической репортерной молекулой одного связывающего элемента, который можно выявлять в присутствии другого связывающего(их) элемента(ов) без маркера, с возможностью идентификации связывающих элементов, которые связываются с тем же эпитопом или перекрывающимся эпитопом. Конкуренцию можно определять, например, с применением анализа ELISA, при котором A $\beta$ 1-42иммобилизуют 35 на планшете и к планшету добавляют первый меченный или маркированный связывающий элемент, вместе с одним или несколькими другими немаркированными или немечеными связывающими элементами. Присутствие немаркированного связывающего элемента, который конкурирует с маркированным связывающим элементом, наблюдали по уменьшению сигнала, испускаемого маркированным 40 связывающим элементом.

Конкурентные анализы также можно применять в картировании эпитопов. В одном случае картирование эпитопов можно применять для идентификации эпитопа, связанного при помощи связывающего элемента, который необязательно может 45 обладать оптимизированными нейтрализующими и/или модулирующими характеристиками. Такой эпитоп может быть линейным или конформационным. Конформационный эпитоп может содержать по меньшей мере два различных фрагмента A $\beta$ , где указанные фрагменты расположены вблизи друг к другу, когда A $\beta$  пептид сворачивается в свою третичную или четвертичную структуру с образованием

конформационного эпитопа, который распознается ингибитором Аβ, таким как Аβ-связывающий элемент. При тестировании конкуренции можно использовать пептидный фрагмент антигена, в частности, пептид, включающий или состоящий фактически из эпитопа, представляющего интерес. Можно применять пептид, состоящий из последовательности эпитопа плюс одна или несколько аминокислот на любом конце. Связывающие элементы согласно настоящему изобретению могут быть таковыми, что их связывание с антигеном ингибируется пептидом с данной последовательностью или содержащим ее.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение предусматривает выделенную нуклеиновую кислоту, которая содержит последовательность, кодирующую связывающий элемент, VH-домен и/или VL-домен согласно настоящему изобретению, и способы получения связывающего элемента, VH-домена и/или VL-домена по настоящему изобретению, которые включают экспрессию указанной нуклеиновой кислоты в условиях осуществления выработки указанного связывающего элемента, VH-домена и/или VL-домена и его выделения. Примеры кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты изложены в таблицах и прилагаемом перечне последовательностей. Последовательности нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению могут включать ДНК или РНК и могут быть полностью или частично синтетическими. Ссылка на нуклеотидную последовательность, изложенную в данном документе, охватывает молекулу ДНК с указанной последовательностью, и охватывает молекулу РНК с указанной последовательностью, в которой U замещен на T, если контекст не требует иного.

Настоящее изобретение также предусматривает конструкции в форме плазмид, векторов, таких как плазмидный или фаговый вектор, кассет транскрипции или экспрессии, которые содержат по меньшей мере один полинуклеотид, описываемый выше, например функционально связанный с регуляторным элементом.

Дополнительный аспект предусматривает клетку-хозяина, содержащую или трансформированную нуклеиновыми кислотами и/или векторами по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также предусматривает рекомбинантную линию клеток-хозяев, которая содержит одну или несколько конструкций, описанных выше. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая любой CDR, или набор CDR, или VH-домен, или VL-домен, или антигенсвязывающий участок антитела, или молекулу антитела, например scFv или IgG (например, IgG2, IgG1 или IgG1TM), как предусмотрено, образует аспект настоящего изобретения, вместе со способом получения

закодированного продукта, при этом способ включает экспрессию из кодирующих его последовательностей нуклеиновой кислоты. Экспрессии можно легко достичь путем культивирования рекомбинантных клеток-хозяев, содержащих нуклеиновую кислоту, при соответствующих условиях. После получения путем экспрессии VH- или VL-домен или связывающий элемент можно выделить и/или очистить с применением любой подходящей методики для последующего использования соответствующим образом.

Соответственно, другой аспект настоящего изобретения представляет собой способ получения VH-вариабельного домена антитела, причем способ включает обеспечение экспрессии из кодирующих последовательностей нуклеиновых кислот. Такой способ может включать культивирование клеток-хозяев в условиях для получения указанного VH-вариабельного домена антитела.

Аналогичные способы получения VL-вариабельных доменов и связывающих элементов, содержащих VH- и/или VL-домен, предусмотрены как дополнительные аспекты настоящего изобретения.

Способ получения может включать этап выделения и/или очистки продукта. Способ получения может включать составление продукта в композицию, включающую по меньшей мере один дополнительный компонент, такой как фармацевтически приемлемый наполнитель.

5 Системы для клонирования и экспрессии полипептида в ряде различных клеток-хозяев хорошо известны. Подходящие клетки-хозяева включают бактерий, клетки млекопитающих, клетки растений, мицелиальные грибы, дрожжи и бакуловирусные системы, а также трансгенные растения и животные. Экспрессия антител и фрагментов антител в прокариотических клетках хорошо известна в данной области. Обзор, см.,  
10 например, у Plückthun [Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991)]. Распространенным бактериальным хозяином является *E. coli*.

Экспрессия в эукариотических клетках в культуре также доступна специалистам в данной области в качестве варианта для получения связывающего элемента [Chadd HE and Chamow SM (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12: 188-194; Andersen DC and  
15 Krummen L (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 117; Larrick JW and Thomas DW (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12:411-418].

Линии клеток млекопитающих, доступные в данной области для экспрессии гетерологичного полипептида, включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка, клетки меланомы мыши NS0,  
20 клетки миеломы крысы YB2/0, эмбриональные клетки почки человека, эмбриональные клетки сетчатки человека и многие другие.

Можно выбрать или сконструировать подходящие векторы, содержащие, при необходимости, подходящие регуляторные последовательности, в том числе промоторные последовательности, терминаторные последовательности,  
25 последовательности полиаденилирования, энхансерные последовательности, маркерные гены и другие последовательности. При необходимости, векторы могут представлять собой плазмиды, например фагмиду, или вирусы, например 'фаг, [Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*:3<sup>rd</sup> edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press].  
30 Многие известные методики и протоколы для манипуляций с нуклеиновой кислотой, например для получения конструкций нуклеиновой кислоты, мутагенеза, секвенирования, введения ДНК в клетки и экспрессии генов, а также анализа белков, подробно описаны в Ausubel и соавт. [Ausubel et al. eds., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 4<sup>th</sup> edition 1999].

Дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту, раскрытую в данном документе. Такая клетка-хозяин может находиться *in vitro*, и может находиться в культуре. Такая клетка-хозяин может находиться *in vivo*. Присутствие клетки-хозяина *in vivo* может обеспечивать  
35 внутриклеточную экспрессию связывающих элементов по настоящему изобретению в виде "интраантител" или внутриклеточных антител. Интраантитела можно применять для генной терапии.

Другой аспект предусматривает способ, включающий введение нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в клетку-хозяина. Для введения можно использовать любую доступную методику. Для эукариотических клеток подходящие методики могут  
45 включать трансфекцию с использованием фосфата кальция, DEAE-декстран, электропорацию, трансфекцию, опосредованную липосомами, и трансдукцию с применением ретровируса или другого вируса, например, вируса оспы, или бакуловируса, в случае клеток насекомых. Введение нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина, в частности эукариотическую клетку, можно применять вирусные или плазмидные системы.

Плазмидную систему можно поддерживать эписомально или можно вводить в клетку-хозяина или в искусственную хромосому. Введение можно осуществлять путем либо случайной, либо направленной интеграции одной или нескольких копий в один или несколько локусов. Для бактериальных клеток подходящие методики могут включать трансформацию с хлористым кальцием, электропорацию и трансфекцию с применением бактериофага.

После введения может следовать индукция или обеспечение экспрессии из нуклеиновой кислоты, например, путем культивирования клеток-хозяев в условиях для экспрессии гена. Очистки экспрессированного продукта можно достичь способами, известными специалисту в данной области.

Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению можно интегрировать в геном (например, хромосому) клетки-хозяина. Интеграцию можно стимулировать путем включения последовательностей, которые стимулируют рекомбинацию с геномом, в соответствии со стандартными методиками.

Настоящее изобретение также предусматривает способ, который включает применение конструкции, указываемой выше, в системе экспрессии с целью экспрессии связывающего элемента или полипептида, описываемых выше.

Связывающие элементы согласно настоящему изобретению можно применять в лечении (которое может включать профилактическое лечение) заболевания или нарушения в организме человека или животного (например, у пациента-человека), которое предусматривает введение пациенту связывающего элемента. Состояния, которые можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, описаны в другом месте в данном документе, в том числе профилактическое лечение и снижение тяжести состояния или одного, или нескольких его симптомов или отсрочки или снижения риска начала заболевания.

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает способ лечения или снижения тяжести по меньшей мере одного симптома любого из состояний, упомянутых в данном документе, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества одного или нескольких связывающих элементов по настоящему изобретению отдельно или в схеме комбинированного лечения с другим подходящим лекарственным препаратом, известным из уровня техники или описанным в данном документе, так что снижается тяжесть по меньшей мере одного симптома любого из упомянутых выше нарушений.

Выражение "эффективная доза" определяется как количество, достаточное для излечения или по меньшей мере частичной остановки заболевания и его осложнений у пациента, уже страдающего от заболевания.

Настоящее изобретение направлено среди прочего на лечение болезни Альцгеймера и других амилоидогенных заболеваний при помощи введения пациенту терапевтического антитела по настоящему изобретению при условиях, которые приводят к благоприятному терапевтическому ответу у пациента (например, снижению A $\beta$ 1-42 в CSF, уменьшению объема бляшек, ингибированию образования бляшек, снижению дистрофии нейритов, улучшению когнитивной функции и/или реверсии, уменьшению или предупреждению снижения когнитивных способностей) у пациента, например, для профилактики или лечения амилоидогенного заболевания.

Применяемое в данном документе "лечение" определяется как применение или введение терапевтического средства пациенту, у которого имеется заболевание или состояние, ассоциированное с амилоидозом; или симптом, или предрасположенность к такому заболеванию или состоянию, ассоциированному с амилоидозом, с целью



излечить, вылечить, облегчить, ослаблять, видоизменить, лечить, уменьшить, нормализовать или воздействовать на заболевание, состояние, его симптомы или предрасположенность к нему.

Настоящее изобретение предусматривает способы предупреждения или лечения 5 заболевания, ассоциированного с отложениями амилоида из А $\beta$  в головном мозге пациента. Такие заболевания включают болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и когнитивные нарушения. Когнитивные нарушения встречаются вместе с другими характерными признаками амилоидогенного заболевания или без них. Настоящее изобретение предусматривает способы лечения макулярной дегенерации, состояния, 10 которое связано с А $\beta$ . Способы по настоящему изобретению могут включать введение пациенту эффективной дозы антитела, которое специфично связывается с 1–42 А $\beta$  и его N-терминальными усечениями. Такие способы особенно применимы для предупреждения или лечения болезни Альцгеймера у пациентов-людей.

Антитела по настоящему изобретению можно применять в схеме лечения для 15 предупреждения или уменьшения нейропатологии и, у некоторых пациентов, когнитивного нарушения, ассоциированного с болезнью Альцгеймера.

Пациенты, подлежащие лечению, включают пациентов, у которых проявляются симптомы, а также индивидуумов с риском заболевания, но у которых симптомы не проявляются. В случае болезни Альцгеймера, потенциально каждый имеет риск 20 заболевания, если он или она живет в течение достаточно длительного времени. Антитела по настоящему изобретению можно вводить профилактически субъекту без какой-либо оценки риска у пациента-субъекта. Пациенты, подлежащие лечению, включают индивидуумов, для которых известен генетический риск болезни Альцгеймера, например индивидуумов, кровные родственники которых имеют данное заболевание, и тех, у 25 которых риск определен посредством анализа генетических или биохимических маркеров. Генетические маркеры предрасположенности к болезни Альцгеймера включают мутации в гене APP, в частности, мутации в положении 717 и положениях 670 и 671, называемые мутациями Харди и шведскими мутациями, соответственно. Другие маркеры риска представляют собой мутации в генах пресенилина, PS1 и PS2, и 30 ApoE4, семейный анамнез AD, гиперхолестеринемия или атеросклероз. Индивидуумы, страдающие от болезни Альцгеймера, могут диагностироваться по характерной деменции, ассоциированной с заболеванием, а также по присутствию факторов риска, описанных выше. Доступен ряд диагностических тестов для содействия идентификации болезни Альцгеймера у индивидуума. Они включают измерение уровней белка-тау и 35 А $\beta$ 1-42 в CSF. Повышенный уровень белка-тау и сниженный уровень А $\beta$ 1-42 могут сигнализировать о наличии AD. Индивидуумов, страдающих от болезни Альцгеймера, также можно диагностировать по критериям NINCDS-ADRDA или DSM-IV-TR.

У бессимптомных пациентов лечение можно начинать в любом возрасте (например, 10, 20, 30). В целом, лечение начинают в старческом возрасте, например, когда пациент 40 достигает своих 40, 50, 60 или 70 лет. Лечение может включать множественные дозы в течение периода времени, который может иметь продолжительность, составляющую всю оставшуюся жизнь пациента. Необходимость введения повторных доз можно отслеживать при помощи измерения уровней антител с течением времени.

Для профилактики фармацевтические композиции или лекарственные препараты 45 вводят пациенту, подверженному болезни Альцгеймера, или, иначе, имеющему риск ее развития, в количестве, достаточном для устранения или снижения риска, ослабления тяжести или отсрочки начала заболевания, в том числе биохимических, гистологических, связанных с когнитивными нарушениями, и/или поведенческих симптомов заболевания,

его осложнений и промежуточных фенотипов патологии, присутствующих во время развития заболевания. Для терапевтических применений композиции или лекарственные препараты вводят пациенту, у которого подозревают или который уже страдает от такого заболевания, в количестве, достаточном для излечения или по меньшей мере

5 частичной остановки симптомов заболевания (биохимических, гистологических, связанных с когнитивными нарушениями и/или поведенческих), в том числе его осложнений и промежуточных фенотипов патологии, присутствующих во время развития заболевания.

Настоящее изобретение предусматривает способ лечения индивидуума, включающий

10 введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества одного или нескольких связывающих элементов по настоящему изобретению отдельно или в схеме комбинированного лечения с другим подходящим лекарственным препаратом, известным из уровня техники или описанным в данном документе. Способ лечения может включать введение эффективного количества связывающего элемента, описанного

15 в данном документе, пациенту, нуждающемуся в этом, где уровни A $\beta$ 1-42 снижаются в плазме крови и/или в CSF.

Способ лечения может включать (i) идентификацию пациента, имеющего состояние, ассоциированное с амилоидозом, как упомянуто в данном документе, и (ii) введение

20 пациенту эффективного количества связывающего элемента, описанного в данном документе, где уровни A $\beta$ 1-42 снижаются в плазме крови и/или в CSF, а амилоидоз уменьшается. Эффективное количество представляет собой количество, которое снижает уровни A $\beta$ 1-42 так, чтобы снизить или уменьшить тяжесть по меньшей мере одного симптома конкретного заболевания или нарушения, подлежащего лечению, но не обязательно излечить заболевание или нарушение.

Настоящее изобретение также предусматривает способ противодействия по меньшей мере одному эффекту A $\beta$ 1-42, включающий обеспечение контакта или введение

25 эффективного количества одного или нескольких связывающих элементов по настоящему изобретению, так что указанный по меньшей мере один эффект A $\beta$ 1-42 испытывает противодействие.

Соответственно, дополнительные аспекты данного изобретения предусматривают

30 способы лечения, включающие введение связывающего элемента, как предусмотрено, фармацевтических композиций, содержащих такой связывающий элемент, и применение такого связывающего элемента в получении лекарственного препарата для введения, например, в способе создания лекарственного препарата или фармацевтической

35 композиции, включающего составление связывающего элемента с фармацевтически приемлемым наполнителем. Фармацевтически приемлемый наполнитель может представлять собой соединение или комбинацию соединений, входящих в фармацевтическую композицию, не провоцирующих вторичные реакции, и которые обеспечивают, например, облегчение введения связывающего элемента, увеличение

40 его срока жизни и/или его эффективности в организме, повышение его растворимости в растворе или улучшение его сохранности. Такие фармацевтически приемлемые носители хорошо известны и будут адаптированы специалистом в данной области, в зависимости от природы и способа введения выбранного(ых) активного(ых) соединения(й).

Связывающие элементы, как описано в данном документе, обычно будут вводиться

45 в форме фармацевтической композиции, которая может содержать по меньшей мере один компонент в дополнение к связывающему элементу. Таким образом, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению и для применения

в соответствии с настоящим изобретением могут содержать, в дополнение к связывающему элементу, фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области. Такие вещества должны быть нетоксичными и не должны оказывать противодействие эффективности активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала будет зависеть от пути введения.

Для инъеклируемых составов, например, для внутривенной или подкожной инъекции, активный ингредиент будет находиться в форме водного раствора, приемлемого для парентерального введения, который не содержит пирогены и имеет подходящий рН, изотоничность и стабильность. Связывающие элементы, которые описаны в данном документе, можно составлять в жидкой, полутвердой или твердой формах, в зависимости от физико-химических свойств молекулы и пути доставки. Составы могут содержать наполнители или комбинации наполнителей, например, сахара, аминокислоты и поверхностно-активные вещества. Жидкие составы могут содержать антитела с широким спектром концентраций и рН. Твердые составы могут быть получены, например, путем лиофилизации, сушки распылением или сушки с помощью технологии с применением сверхкритического флюида. Средство для лечения можно вводить посредством инъекции, например, подкожно или внутривенно. Средство для лечения можно вводить путем импульсной инфузии, в частности, со снижением дозы связывающего элемента. Путь введения может определяться физико-химическими характеристиками средства для лечения, особенностями заболевания или необходимостью оптимизации эффективности и минимизации побочных эффектов. Одним конкретным путем введения является внутривенное введение. Другим способом введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению является подкожное введение. Подкожная инъекция с применением безыгольного устройства также является предпочтительной.

Композицию можно вводить саму по себе или в комбинации с другими средствами для лечения либо одновременно, либо последовательно в зависимости от состояния, подлежащего лечению.

Связывающий элемент может применяться как часть комбинированной терапии в сочетании с дополнительным лекарственным компонентом. Комбинированное лечение можно применять для обеспечения значительных синергических эффектов, в частности, комбинацию связывающего элемента с одним или несколькими другими лекарственными средствами. Связывающий элемент можно вводить одновременно или последовательно или в виде комбинированного препарата с другим терапевтическим средством или средствами, для лечения одного или нескольких состояний, перечисленных в данном документе.

Связывающий элемент и одно или несколько указанных выше дополнительных лекарственных компонентов можно применять при производстве лекарственного препарата. Лекарственное средство может предназначаться для отдельного или комбинированного введения индивидууму, и, соответственно, может содержать связывающий элемент и дополнительный компонент в виде комбинированного препарата или в виде отдельных препаратов. Отдельные препараты могут применяться для облегчения отдельного и последовательного или одновременного введения, и позволяют вводить компоненты различными путями, например, с помощью перорального и парентерального введения.

Предусматриваемые композиции можно вводить млекопитающим. Введение, как правило, проводится с “терапевтически эффективным количеством”, что является достаточным, чтобы продемонстрировать пользу у пациента. Такая эффективность

может представлять собой по меньшей мере уменьшение интенсивности по меньшей мере одного симптома. Фактическое вводимое количество, а также частота и динамика введения будут зависеть от природы и тяжести того, что подлежит лечению, конкретного млекопитающего, подлежащего лечению, клинического состояния отдельного пациента, 5 причины нарушения, местоположения доставки композиции, типа связывающего элемента, способа введения, режима введения и других факторов, известных практикующим врачам. Назначение лечения, например, принятие решения о дозировке и т.д., входит в ответственность врачей общей практики и других врачей, и может зависеть от тяжести симптомов и/или прогрессирования заболевания, подлежащего 10 лечению. Терапевтически эффективное количество или подходящую дозу связывающего элемента по настоящему изобретению можно определить путем сравнения его активности *in vitro* и активности *in vivo* на животных моделях. Известны способы экстраполяции эффективных дозировок для других подопытных животных на людей. Точная доза будет зависеть от ряда факторов, в том числе от того, предназначено ли 15 антитело для диагностики, предупреждения или для лечения, размера и локализации области, которая подлежит лечению, конкретной природы антитела (например, полное антитело, фрагмент или диатело) и природы любой детектируемой метки или другой молекулы, прикрепленной к антителу. Типичная доза антитела будет находиться в диапазоне от 100 мкг до 1 г для системного применения. Может вводиться изначально 20 более высокая ударная доза, за которой следует одна или несколько более низких доз. Как правило, антитело будет представлять собой целое антитело, например изотипа IgG1 или IgG1-ТМ. Средства для лечения можно вводить повторно с интервалами один раз в день, два раза в неделю, один раз в неделю или один раз в месяц по решению врача. Лечение можно проводить каждые две - четыре недели с подкожным введением, 25 и каждые четыре-восемь недель с внутривенным введением. Лечение может быть периодическим, и период между введениями составляет примерно две недели или больше, например, примерно три недели или больше, примерно четыре недели или больше или примерно раз в месяц.

Различные дополнительные аспекты и варианты осуществления настоящего 30 изобретения будут очевидны специалистам в данной области в свете настоящего раскрытия.

Все документы, в том числе ссылки на базы данных и номера доступа, патенты, заявки на патент и публикации, упоминающиеся в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

35 Применяемое в данном документе "и/или" следует понимать как конкретное раскрытие каждого из данных двух указанных свойств или компонентов с другим или без другого. Например, "А и/или В" следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из (i) А, (ii) В, (iii) А и В, как если бы каждый из них был изложен в данном документе по отдельности.

40 Если контекст не диктует иное, описания и определения деталей, изложенных выше, не ограничены каким-либо конкретным аспектом или вариантом осуществления настоящего изобретения и в равной степени применимы ко всем описанным аспектам и вариантам осуществления.

*Определенные аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения далее 45 будут проиллюстрированы посредством примеров и со ссылками на прилагаемые фигуры и таблицы.*

#### Примеры

Следующие последовательности были депонированы в NCIMB, Ferguson Building,

Craibstone Estate, Баксберн, Абердин, AB21 9YA. Шотландия, Великобритания.

Клетки *E. coli* TOP10 Abet0007 = NCIMB 41889

Клетки *E. coli* TOP10 Abet0380-GL = NCIMB 41890

Клетки *E. coli* TOP10 Abet0144-GL = NCIMB 41891

5 Клетки *E. coli* TOP10 Abet0377-GL = NCIMB 41892

Дата депонирования = 2 ноября 2011 г.

Пример 1. Получение антитела, специфичного к бета-амилоиду 1-42, и отбор лидерного антитела

### *1.1 Состав бета-амилоидных пептидов*

10 Биотинилированный человеческий бета-амилоидный 1-42 пептид (rPeptide, США; № по кат.: A1117 или Bachem AG, Швейцария; № по кат.: H-5642) ресуспендировали до 1 мг/мл в 1% растворе гидроксида аммония (объем/объем) и хранили в аликвотах при -80°C, до того как они потребуются. Идентичной процедуре следовали в случае немеченого человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида (Anaspec, США; № по кат.: 64129), немеченого человеческого бета-амилоидного 1-40 пептида (rPeptide, США; № по кат.: A1155), биотинилированного человеческого бета-амилоидного 1-40 пептида (rPeptide, США; № по кат.: A111 или Bachem AG, Швейцария; № по кат.: H-5914), биотинилированного мышинового бета-амилоидного 1-42 пептида (Anaspec, США; № по кат.: 61718-01) и биотинилированного мышинового бета-амилоидного 1-40 пептида (Anaspec, США; № по кат.: 61717).

### *1.2 Отбор*

Библиотеку фагового дисплея на основе фага Fab310-лямбда (Дуах, США), клонированную в фагмидный вектор на основе нитчатого фага M13, применяли для отбора (Hoet *et al.*, 2005). Fab-антитела, специфичные к бета-амилоиду 1-42, выделяли из библиотек фагового дисплея с применением серии циклов отбора на синтетическом человеческом биотинилированном бета-амилоиде 1-42 (rPeptide, США), фактически как описано ранее (Hawkins *et al.*, 1992; Vaughan *et al.*, 1996). Кратко, для первого раунда отбора в фазе раствора, биотинилированный амилоид-бета 1-42 в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (DPBS, pH 7,4) добавляли к очищенным фаговым частицам, которые предварительно инкубировали в течение 1 часа в Marvel-PBS (3% вес/объем), содержащем 100-кратный избыток немеченого человеческого бета-амилоидного 1-40 пептида (Anaspec, США). Фаговые частицы, которые связались с биотинилированным бета-амилоидным 1-42 пептидом, захватывали с применением парамагнитных гранул, соединенных со стрептавидином (Invitrogen Life Technologies, Великобритания), и слабосвязанные фаговые частицы удаляли при помощи серии циклов отмывки с применением PBS-Tween (0,1% объем/объем). Связанные фаговые частицы отмывали от гранул, инфицировали в бактерии *E. coli* TG1 и спасали для раунда отбора (Vaughan *et al.*, 1996). Два последующих раунда отбора проводили, как ранее описано, но со сниженной концентрацией биотинилированного бета-амилоидного 1-42 антигена.

### *1.3 Идентификация клонов, специфичных к бета-амилоиду 1-42, с применением анализа прямого связывания с неочищенными Fab-фрагментами*

Для получения растворимых одноцепочечных Fab-фрагментов (sFab) генIII tether удаляли из кассеты для дисплея на основе Fab310-лямбда с применением стандартных методик расщепления и лигирования. Вкратце, фагмидные векторы выделяли из продукта раунда 3 с применением стандартных наборов для очистки ДНК (QIAGEN, Великобритания) и последовательность генаIII tether удаляли из вектора с применением рестриктазы *MluI* (Hoet *et al.*, 2005). Повторно лигированные векторы трансформировали обратно в клетки TG1 и отдельные колонии отбирали для анализа.

Неочищенные sFab из периплазматических препаратов подвергали скринингу посредством анализа связывания с помощью гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF™, CisBio International, Франция) с применением планшет-ридера EnVision (PerkinElmer, США). В этом анализе связывание неочищенных sFab с человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом оценивали посредством измерения резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) между sFab с гистидиновой меткой и биотинилированным пептидом с применением детекторных реагентов криптоата стрептавидина и антитела к 6his-XL665 (CisBio International, Франция; № по кат.: 610SAKLB и 61HISXLB, соответственно). Продукты отбора подвергали скринингу в виде неочищенных бактериальных периплазматических экстрактов, содержащих sFab, приготовленных в 50 мМ буфера MOPS pH 7,4, 0,5 мМ EDTA и 0,5 М сахарозы. Десять микролитров неочищенных образцов sFab вносили в 384-луночный планшет для анализа Costar® (Corning, США; № по кат.: 3676). После этого следовало добавление 5 мкл 20 нМ синтетического человеческого бета-амилоида 1-42 и 5 мкл объединенного раствора 6 нМ криптоата стрептавидина и 20 нМ антитела к his-XL665. Лунки с неспецифичным связыванием (отрицательные контроли) определяли для каждого планшета с применением неочищенных sFab отрицательного контроля вместо тестируемого образца sFab. Перекрестно-реагирующие клоны sFab идентифицировали с применением одновременного анализа с человеческим бета-амилоидным 1-40 пептидом. Все разведения осуществляли в 50 мМ MOPS pH 7,4 (Sigma, Великобритания; № по кат.: M9381), содержащем 0,4 М KF (BDH Chemicals, США; № по кат.: 103444T), 0,1% бычий сывороточный альбумин, не содержащий жирных кислот (Sigma, Великобритания; № по кат.: A6003), и 0,1% Tween 20 (объем/объем) (Sigma, Великобритания; № по кат.: P2287) (буфер для анализа). Планшеты для анализа инкубировали в течение 4 часов при комнатной температуре перед считыванием посредством флуоресценции с временным разрешением на планшет-ридере EnVision (PerkinElmer, США) с применением длины волны возбуждения 320 нм и измерения испускания при 620 нм и 665 нм (100 вспышек).

Данные анализировали путем расчета значений % дельта F для каждого образца. % дельта F определяли согласно уравнению 1.

Уравнение 1:

% дельта F =	(соотношение 665 нм/620 нм у образца) – (соотношение 665 нм/620 нм у отрицательного контроля)	x 100
	(соотношение 665 нм/620 нм у отрицательного контроля)	

#### 1.4 Анализ прямого связывания очищенных sFab-фрагментов

Периплазматические экстракты с неочищенными sFab, которые показали специфичное связывание с человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом в HTRF™-анализе, подвергали ДНК-секвенированию (Osborn *et al.*, 1996; Vaughan *et al.*, 1996). sFab с уникальными белковыми последовательностями экспрессировали в *E. coli* и очищали посредством аффинной хроматографии (фактически как описано (Bannister *et al.*, 2006)). Профиль связывания бета-амилоида для каждого очищенного sFab определяли путем тестирования серии разведений очищенных sFab в HTRF™-анализе, описанном в разделе 1.3, заменяя периплазматические препараты с неочищенными sFab на очищенные sFab. Очищенные sFab тестировали одновременно на связывание с биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом, биотинилированным мышинным бета-амилоидным 1-42 пептидом и биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-40 пептидом. Кроме того, sFab тестировали на связывание со скремблированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом (Anasres, синтез под заказ) в отдельном

HTRF™-эксперименте, чтобы проконтролировать какое-либо неспецифичное связывание пептида. Данные анализировали путем расчета значений % дельта F, как описано в разделе 1.3.

Типовые результаты для очищенного sFab Abet0007 показаны на фигуре 1. Эти результаты демонстрируют, что Abet0007 специфично связывается с человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом, а не с человеческим бета-амилоидным 1-40 пептидом и скремблированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом. Кроме того, sFab Abet0007 перекрестно реагирует с мышинным бета-амилоидным 1-42 пептидом.

#### 1.5 Переформатирование Fab-антител, специфичных к бета-амилоиду 1-42, в формат IgG2

Тринадцать клонов, специфичных к бета-амилоиду 1-42, переводили из Fab в IgG2 посредством субклонирования переменных доменов тяжелой цепи ( $V_H$ ) и переменных доменов легкой цепи ( $V_L$ ) в векторы, экспрессирующие целые тяжелые и легкие цепи человеческого антитела, соответственно.  $V_H$ -домены подвергали оптимизации кодонов в лаборатории перед субклонированием, поскольку  $V_H$ -домены из библиотеки Duax FAV310 являются полусинтетическими и не могут экспрессироваться в достаточных количествах в клетках млекопитающих, описанных в данном документе. Совпадающий с геном зародышевого типа  $V_H$ , полученный в лаборатории, который, как известно, хорошо экспрессируется в виде человеческого IgG полной длины в клетках млекопитающих, применяли в качестве матрицы для изменения частоты использования кодонов ДНК в  $V_H$ -доменах из Duax, при этом с сохранением оригинальной аминокислотной последовательности. Кодон-оптимизированные переменные домены тяжелых цепей клонировали в вектор экспрессии для млекопитающих (pEU 9.2), содержащий константные домены тяжелой цепи человека и регуляторные элементы для экспрессии целой тяжелой цепи IgG2 в клетках млекопитающих. Аналогично, переменный домен легкой цепи клонировали в вектор экспрессии для млекопитающих (pEU4.4) для экспрессии константных доменов легкой лямбда-цепи человека и регуляторных элементов для экспрессии целой легкой цепи IgG в клетках млекопитающих. Векторы для экспрессии тяжелых цепей и легких цепей первоначально описаны в Persic и соавт. (Persic *et al.*, 1997). Для получения клонов в виде IgG2 векторы экспрессии для тяжелой и легкой цепи IgG временно трансфицировали в клетки млекопитающих HEK293-EBNA (Invitrogen, Великобритания; № по кат.: R620-07) или SER6-CHO (полученные в лаборатории), в которых антитело экспрессировалось и секретировалось в среду. Собранную среду отфильтровывали перед очисткой. IgG очищали с применением хроматографии с белком А (Biosepra™, Pall, США или MabSelect SuRe, GE Healthcare, Великобритания). Культуральные супернатанты загружали на подходящую колонку с белком А, предварительно уравновешенную 50 mM Tris pH 8,0, 250 mM NaCl. Связавшийся IgG элюировали из колонки с применением 0,1 M цитрата натрия, pH 3,0, и элюат нейтрализовали добавлением 1 M Tris-буфера (pH 10,0). Для IgG проводили замену буфера на PBS в модификации Дульбекко с применением колонок для замены буфера NAP-10 (GE Healthcare, Великобритания; № по кат.: 17-0854-02). Очищенные IgG пропускали через фильтр с диаметром пор 0,2 микрометра и концентрацию IgG определяли по поглощению при 280 нм с применением коэффициента экстинкции на основе аминокислотной последовательности IgG. Очищенные IgG анализировали в отношении агрегирования или разложения с применением методик SEC-HPLC и SDS-PAGE.

#### 1.6 Определение специфичности лидерного антитела в конкурентном HTRF™-анализе

*с применением бета-амилоидного пептида*

Как описано выше, очищенные sFab-фрагменты, которые специфично связывались с бета-амилоидным 1-42 пептидом, превращали в рекомбинантные IgG. Для тестирования специфичности связывания этих IgG с другими человеческими бета-амилоидными пептидами разрабатывали конкурентный анализ. В этом анализе немеченные человеческие бета-амилоидные пептиды 1-42 (rPeptide, США; № по кат.: A1165), 1-40 (rPeptide, США; № по кат.: A1155), 11-42 (rPeptide, США; № по кат.: A1063), 17-42 (rPeptide, США; № по кат.: A1058) и 1-43 (Anaspec, США; № по кат.: 25356) инкубировали с лидерным IgG и биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом (rPeptide, США; № по кат.: A1117). Вкратце, серию разведений каждого тестируемого пептида объединяли с 0,3 нМ тестируемого IgG и 5 нМ биотинилированного человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида. Конкуренцию каждого пептида оценивали путем выявления утраты связывания лидерного IgG с биотинилированным 1-42 пептидом посредством измерения резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) между IgG и биотинилированным 1-42 бета-амилоидом с применением детекторных реагентов криптоата стрептавидина (CisBio International, Франция; № по кат.: 610SAKLB) и антитела к Fc IgG XL665 человека (CisBio International, Франция; № по кат.: 61HFCXLB).

Криптата стрептавидина и антитело к Fc IgG XL665 человека объединяли из расчета 7 нМ и 5 нМ, соответственно, в буфере для анализа, содержащем 50 мМ MOPS pH 7,4 (Sigma, Великобритания; № по кат.: M9381), 0,4 М KF (BDH Chemicals, США; № по кат.: 103444T), 0.1% fatty acid free bovine serum albumin (Sigma, UK; cat: A6003) and 0.1% Tween 20 (v/v) (Sigma, UK; cat: P2287). 5 мкл этого раствора вносили в планшет для анализа (Costar® 384-луночный с черными мелкими лунками, Corning Life Sciences; № по кат.: 3676). Бета-амилоидные пептиды серийно разводили в буфере для анализа с применением 96-луночного планшета с лунками с U-образным дном Greiner (Greiner BioOne, Германия; № по кат.: 650201). По 5 мкл каждого разведения пептида переносили в двойной повторности в планшет для анализа с применением роботизированной станции дозирования жидкостей MiniTrak™ (PerkinElmer, США). Тестируемый IgG разбавляли до 1,2 нМ в буфере для анализа и 5 мкл вносили в планшет для анализа. 20 нМ раствор биотинилированного человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида приготовили в буфере для анализа и 5 мкл этого раствора вносили в планшеты для анализа. Лунки с неспецифичным связыванием (отрицательные контроли) определяли для каждого планшета путем замещения тестируемого IgG 5 мкл буфера для анализа. Планшеты для анализа инкубировали в течение 4 часов при комнатной температуре перед считыванием флуоресценции с временным разрешением при длинах волны испускания 620 нм и 665 нм с применением планшет-ридера EnVision (PerkinElmer, США).

Данные анализировали путем расчета значений % дельта F для каждого образца. % дельта F определяли согласно уравнению 1. Значения % дельта F затем использовали для расчета % специфичного связывания, как описано в уравнении 2.

Уравнение 2:

% специфичного связывания =	% дельта F образца	x 100
	% Дельта F общего связывания контроля	

Типовые результаты для IgG Abet0007 показаны на фигуре 2. Эти результаты демонстрируют, что IgG Abet0007 связывается с человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом, но не с человеческим бета-амилоидным 1-40 пептидом. Это антитело также связывается с усеченными пептидами 11-42 и 17-42 и с человеческим бета-амилоидным



1-43 пептидом.

*1.7 Определение аффинностей связывания лидерных антител с человеческим бета-амилоидом 1-42 с применением поверхностного плазмонного резонанса*

Биосенсорный инструмент VIAcore T-100 (GE Healthcare, Великобритания) применяли для оценки кинетических параметров взаимодействия между каждым лидерным антителом и синтетически полученным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом. Эти эксперименты осуществляли, фактически, как описано у Karlsson и соавт. (Karlsson *et al.*, 1991).

В биосенсоре используются оптические эффекты поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для изучения изменений поверхностной концентрации, происходящих в результате взаимодействия молекулы аналита, которую пропускают поверх молекулы лиганда, иммобилизованного на слое декстрана биосенсорного чипа. Как правило, определенную концентрацию частиц аналита пропускают поверх соответствующего лиганда и любое связывание определяется как увеличение местного SPR сигнала (фаза ассоциации). За этим следует период с пропуском потока буфера, в течение которого диссоциацию частиц аналита с иммобилизованным на поверхности лигандом можно наблюдать в виде снижения сигнала (фаза диссоциации). Оставшийся аналит затем можно отделить от связанного с чипом лиганда, и процедура повторяется с несколькими различными концентрациями аналита. Эксперимент разрабатывали, так что ни абсолютная связывающая способность, ни кинетический профиль связанного лиганда существенно не изменяются в течение всего эксперимента и могут отслеживаться с применением серии контролей, используемых в ходе всего эксперимента. Проприетарный физиологический раствор, забуференный при помощи HEPES, содержащий EDTA (HBS-EP+, GE Healthcare), обычно применяют в качестве разбавляющего буфера для образцов аналитов и в качестве проточного буфера во время фазы диссоциации. Экспериментальные данные записываются в виде «резонансных единиц» (RU), которые являются условными единицами, прямо соответствующими SPR сигналу. RU прямо пропорциональны изменениям показателя преломления на поверхности чипа, который, в свою очередь, является приближенным показателем массы связанного аналита. Проприетарный пакет программного обеспечения VIAevaluation можно затем применять для обработки данных и подбора моделей связывания для наборов данных. Обратные константы скорости ассоциации ( $k_a$ ;  $M^{-1} s^{-1}$ ) и диссоциации ( $k_d$ ;  $s^{-1}$ ) позволяют рассчитать аффинные константы диссоциации (KD; M).

Аффинность связывания между каждым тестируемым IgG и человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом оценивали с применением анализов, в которых антитело ковалентно связывали посредством аминного мостика с поверхностью проприетарного чипа CM5 с конечной поверхностной плотностью приблизительно 2000 RU. Поверхность чипа регенерировали между циклами при помощи однократной 40 секундной инъекции 10 mM глицина, pH 2.0, для удаления лиганда, связавшегося с антителом. Регенерация не приводила к значительной потере активности связывания пептида.

Серию разведений синтетического человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида (1,6–100 нМ) последовательно пропускали поверх поверхности с антителом в течение достаточного количества времени для наблюдения сенсограмм, которые можно было с достоверностью согласовать с подходящей моделью связывания. Данные от холостой пробы для эталонной проточной кюветы вычитали из каждого набора данных для IgG и проводили двойное контрольное вычитание данных холостой пробы с буфером с нулевой концентрацией из основного набора данных для снижения влияния любых артефактов от буфера или эффектов неспецифического связывания. Затем подбирали

подходящую модель связывания одновременно для данных от каждого титрования  
аналита с применением программного обеспечения VIAevaluation.

Правильность данных оценивали с применением рассчитанного значения  $\chi^2$  при  
5 допустимом значении ниже  $2 RU^2$ . Общую успешность подбора оценивали с применением  
остатков при допустимом отклонении менее  $2 RU$ .

Типовые результаты для IgG2 Abet0007 показаны на фигуре 3. Средняя константа  
скорости ассоциации ( $k_a$ ), константа скорости диссоциации ( $k_d$ ) и константа диссоциации  
10 (KD) составляют  $1,6 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ ,  $7,4 \times 10^{-2} s^{-1}$  и  $473 nM$ , соответственно. Эти параметры  
получены на основании подбора модели Langmuir 1:1 к данным.

#### *1.8 Определение функциональных характеристик лидерных антител при помощи деплеции бета-амилоидных пептидов из человеческой плазмы*

Лидерные антитела тестировали в анализе деплеции в плазме для изучения их  
способности к иммунопреципитации человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида из  
15 плазмы крови человека. Этот анализ применяли для получения доказательства  
функциональной эффективности каждого антитела. Вкратце, образцы плазмы человека  
инкубировали с каждым тестируемым IgG в течение 3 часов, после чего антитела и  
любые связанные лиганды удаляли. Содержание бета-амилоидного 1-42 пептида в  
образцах плазмы человека анализировали с применением стандартных методик до и  
20 после иммунопреципитации, и эти значения применяли для определения эффективности  
антитела. Образцы плазмы также анализировали в отношении какой-либо деплеции  
бета-амилоидного 1-40 пептида для оценки специфичности лидерного антитела

Каждое тестируемое антитело отдельно ковалентно связывали с магнитными  
гранулами с карбоновой кислотой Dynabeads® M-270 (Invitrogen Life Technologies,  
25 Великобритания; № по кат.: 143-05D) согласно инструкциям производителя. Для каждого  
тестируемого IgG 100 мкл Dynabeads промывали дважды с помощью 100 мкл 25 mM  
MES, pH 5 (Sigma, Великобритания; № по кат.: M5287), с применением магнита для  
отделения гранул от суспензии. Непосредственно перед использованием EDC (Pierce,  
Thermo Scientific, США; № по кат.: 22981) растворяли в холодном 25 mM MES, pH 5, до  
30 конечной концентрации 50 мг/мл. 50 мг/мл раствор NHS (Pierce, Thermo Scientific; № по  
кат.: 24500) готовили аналогично в 25 mM MES, pH 5. 50 мкл раствора NHS и 50 мкл  
раствора EDC добавляли к промытым Dynabeads, которые хорошо перемешивали и  
инкубировали при вращении с небольшим наклоном при комнатной температуре в  
течение 30 минут. Магнит применяли для осаждения гранул и супернатант удаляли.  
35 Гранулы дважды промывали с помощью 100 мкл 25 mM MES, pH 5. Каждый тестируемый  
IgG разводили до 0,6 мг/мл в общем объеме 100 мкл 25 mM MES, pH 5. Промытые  
гранулы ресуспендировали в растворе лиганда и инкубировали в течение по меньшей  
мере 30 минут при комнатной температуре при вращении с небольшим наклоном.  
Впоследствии гранулы осаждали с применением магнита и однократно промывали с  
40 помощью 100 мкл 50 mM буфера Tris, pH 7,4 (Sigma, Великобритания). Затем гранулы  
ресуспендировали в 100 мкл Marvel-PBS (3% вес/объем) и инкубировали на протяжении  
ночи при 4°C. Гранулы промывали дважды при помощи PBS в модификации Дульбекко  
(100 мкл) и ресуспендировали в PBS (100 мкл).

Образцы плазмы с EDTA отбирали у анонимных доноров в медицинской клинике  
45 AstraZeneca в Седертелье, Швеция. Приблизительно 100 мл крови собирали от каждого  
донора, и их собирали в две 50 мл пробирки. EDTA добавляли до конечной концентрации  
5 mM для предотвращения свертывания, и пробирки центрифугировали при  $4000 \times g$  в  
течение 10 минут при 4°C. Супернатант (плазму) собирали, делили на аликвоты в 1 мл

пробирки и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ , до того как они потребуются. Образцы анализировали на содержание как бета-амилоидного 1-42 пептида, так и бета-амилоидного 1-40 пептида, как описано ниже.

Каждый набор покрытых антителом гранул отдельно инкубировали с 1 мл аликвотой плазмы с EDTA в течение 3 часов при  $4^{\circ}\text{C}$  при вращении с небольшим наклоном, и затем гранулы осаждали с применением магнита. Супернатант осторожно удаляли от гранул и анализировали на как бета-амилоидный 1-42 пептид, так и бета-амилоидный 1-40 пептид, как описано ниже.

Анализ содержания бета-амилоидного 1-40 пептида в образцах плазмы осуществляли с применением набора для ELISA на человеческий A $\beta$  40 от Invitrogen (Великобритания; № по кат.: КНВ3482) согласно инструкциям производителя. Вкратце, стандарт человеческого бета-амилоидного 1-40 пептида применяли для создания серии разведений от 1 нг/мл вниз до 7,81 пг/мл. Разведения производили с применением *стандартного буфера для разведений*, содержащего 1 таблетку ингибитора протеазы (Roche, Великобритания; № по кат.: 11697498001) на 50 мл разбавителя. Затем по 50 мкл каждого разведения вносили в различные лунки планшета для микротитрования, предварительно покрытые проприетарным моноклональным антителом, специфичным по отношению к N-концу бета-амилоидного пептида. Образцы плазмы с EDTA центрифугировали в течение 10 минут при  $4^{\circ}\text{C}$  и 2000 x g и по 50 мкл супернатанта каждого образца вносили в отдельную лунку в тот же планшет для микротитрования, что и стандарты. Затем в каждую лунку планшета для микротитрования добавляли по 50 мкл проприетарного *антитела для выявления человеческого A $\beta$* , которое специфично распознает C-конец бета-амилоидного 1-40 пептида. Планшет накрывали при помощи пленки для планшетов и инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре при встряхивании. Планшет промывали четыре раза при помощи 400 мкл промывочного буфера, позволяя планшету пропитаться в течение 15-30 секунд во время каждой промывки. Затем планшет переворачивали и постукивали для высушивания. По 100 мкл проприетарного *антитела против IgG кролика, конъюгированного с HRP*, добавляли в каждую лунку, планшет накрывали при помощи пленки для планшетов и образцы инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Снова планшет промывали четыре раза при помощи 400 мкл промывочного буфера, позволяя планшету пропитаться в течение 15-30 секунд во время каждой промывки. Затем планшет переворачивали и постукивали для высушивания. По 100 мкл проприетарного *стабилизированного хромогена* добавляли в каждую лунку и планшет инкубировали в темноте в течение 20 минут при комнатной температуре. После этого в каждую лунку добавляли по 100 мкл проприетарного *стоп-раствора*. Поглощение каждой лунки считывали при 450 нм в течение 2 часов после добавления стоп-раствора. Стандартную кривую получали на основании серии разведений человеческого бета-амилоидного 1-40 пептида и ее применяли для определения концентрации человеческого бета-амилоидного 1-40 пептида в тестируемых образцах плазмы с EDTA.

Анализ содержания бета-амилоидного 1-42 пептида в образцах плазмы осуществляли с применением набора для  $\beta$ -амилоида<sub>(1-42)</sub> INNOTEST® от Innogenetics (Бельгия; № по кат.: 80177), фактически согласно инструкциям производителя. Вкратце, стандарт человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида применяли для создания серии разведений от 1 нг/мл вниз до 7,81 пг/мл. Затем по 100 мкл каждого разведения вносили в различные лунки планшета для микротитрования, предварительно покрытые проприетарным моноклональным антителом, специфичным по отношению к C-концу бета-амилоидного 1-42 пептида. Образцы плазмы с EDTA центрифугировали в течение 10 минут при  $4^{\circ}\text{C}$

и 2000 x g и по 100 мкл супернатанта каждого образца вносили в отдельную лунку в тот же планшет для микротитрования, что и стандарты. Планшет накрывали при помощи пленки для планшетов и инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре при встряхивании. Планшет промывали пять раз с помощью 400 мкл промывочного буфера и затем переворачивали и постукивали до сухости. По 100 мкл проприетарного конъюгата 1 (C1HS), который распознает N-конец бета-амилоидного пептида, добавляли в каждую лунку. Планшет накрывали при помощи пленки для планшетов, и образцы инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Снова планшет промывали пять раз с помощью 400 мкл промывочного буфера и затем переворачивали и постукивали до сухости. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл конъюгата 2 (C2), конъюгата стрептавидина с HRP, который связывается с биотинилированным антителом C1HS. Планшет накрывали при помощи пленки для планшетов и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшет промывали пять раз с помощью 400 мкл промывочного буфера и затем переворачивали и постукивали до сухости. В каждую лунку добавляли по 100 мкл проприетарного раствора субстрата, планшет инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, и затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл стоп-раствора. Поглощение каждой лунки считывали при 450 нм в течение 15 минут после добавления стоп-раствора. Стандартную кривую получали на основании серии разведений человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида и ее применяли для определения концентрации человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида в тестируемых образцах плазмы с EDTA.

В одном эксперименте антитело IgG2 Abet0007 снижало уровни человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида в плазме от 80,47 пг мл<sup>-1</sup> до 60,56 пг мл<sup>-1</sup> (снижение на 25%). Во втором эксперименте уровни снижались от 197,43 пг мл<sup>-1</sup> до 154,45 пг мл<sup>-1</sup> (снижение на 22%).

#### 1.9 Идентификация лидерных клонов с низкой аффинностью в отношении нативного бета-амилоида с применением *in vitro* иммуногистохимии

Лидерные антитела тестировали в отношении их способности связываться с бета-амилоидом для того, чтобы идентифицировать лидерные клоны с низкой аффинностью в отношении нативных форм бета-амилоидного пептида. Вкратце, лидерные антитела подвергали скринингу на срезах головного мозга людей с болезнью Альцгеймера и срезах головного мозга мышей Tg2576 для идентификации антител к бета-амилоиду 1-42, которые связывались с нативным амилоидом *in vitro*.

Мыши Tg2576 представляют собой трансгенных мышей, которые сверхэкспрессируют ген для человеческого белка-предшественника амилоида (APP). Этот ген несет две точковые мутации в сайте расщепления гамма-секретазой (Lys670Asn и Met671Leu), что ведет к образованию бета-амилоидных бляшек в коре и гиппокампе мышей, начиная с возраста приблизительно 9 месяцев.

Ткань головного мозга человека получали из лобной коры (нижняя лобная извилина) двух индивидуумов с тяжелой болезнью Альцгеймера (генотип ApoE 3/3, стадия по Braak 6 и генотип ApoE 4/3, стадия по Braak 5, соответственно). В качестве контроля, эквивалентную ткань получали от одного индивидуума без деменции (генотип ApoE 3/3, стадия по Braak 1). Все три ткани были получены из Банка головных мозгов Нидерландов (Netherlands Brain Bank) (NBB). Качество срезов проверяли при помощи окрашивания гематоксилином/эозином перед использованием. Ткань головного мозга мыши вырезали из мышей Tg2576 в возрасте 15 месяцев (2 мыши), 18 месяцев (6 мышей) и 22 месяца (2 мыши).

Срезы головного мозга, залитого в парафин, толщиной 4-6 мкм, подготавливали

для иммуногистохимии вначале путем удаления парафиновой несущей матрицы. Срезы промывали ксилолом (5 минут x2), абсолютным этанолом (3 минуты x2), 95% этанолом (3 минуты x2), 70% этанолом (3 минуты x2), 90% муравьиной кислотой (Sigma Aldrich, Великобритания; № по кат.: 06440; 10 минут), водопроводной водой (20 минут x3) и PBS (5 минут x2). Затем срезы прокипятили в растворе Diva Decloaker (Biocare Medical, США; № по кат.: DV2004 G1) в микроволновой печи в течение 20 минут при 100°C. Образцы впоследствии охлаждали до 40°C в водяной бане и затем промывали дистиллированной водой (5 минут) и PBS (5 минут x3).

Лидерные антитела IgG2 тестировали при концентрациях 2, 5 и 20 мкг мл<sup>-1</sup>. Связывание этих IgG выявляли с применением вторичного антитела кролика против человеческого Ig (Dako, Дания; № по кат.: A0482) при разведении 1 к 400, а впоследствии с применением антитела OmniMap против Ig кролика, конъюгированного с HRP (Ventana Medical Systems, США; № по кат.: 760-4311). Сигнал выявляли с применением набора ChromoMap DAB (Ventana Medical Systems, США; № по кат.: 760-159). Эти стадии окрашивания осуществляли с применением системы для автоматического приготовления препаратов BenchMark (Ventana Medical Systems, США) согласно стандартным протоколам.

Количественную оценку окрашивания проводили слепым методом при помощи по меньшей мере двух различных людей под оптическим увеличением 20–40x. *In vitro* связывание бляшек определяли с применением шкалы от 0 (отсутствует окрашивание бляшек) до 4 (интенсивное окрашивание бляшек).

IgG2 Abet0007 не демонстрировало окрашивания бляшек как в головном мозге людей с болезнью Альцгеймера, так и в головном мозге мышей Tg2576 (балл = 0). В отличие от этого, антитело положительного контроля давало балл 4 на смежных срезах при таких же состояниях. Типичные фотографии представлены на фигуре 4.

**Пример 2. Оптимизация антитела Abet0007 посредством направленного мутагенеза определяющей комплементарности области 3 (CDR3)**

### 2.1 Превращение исходного клона Abet0007 в формат scFv

Исходный клон превращали из формата IgG2 в формат одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) при подготовке для аффинной оптимизации. Кодон-оптимизированные переменные домены тяжелой цепи (V<sub>H</sub>) и переменные домены легкой цепи (V<sub>L</sub>) амплифицировали отдельно от их соответствующих векторов IgG с добавлением специфичных сайтов клонирования и гибкой линкерной области. Затем осуществляли рекомбинаторную ПЦР для получения полной scFv-конструкции, которую клонировали в фагмидный вектор pCantab10.5, фактически как описано в Vaughan и соавт. (Vaughan *et al.*, 1996). Вектор pCantab10.5 представляет собой модифицированную версию вектора pCantab6, который содержит дополнительные сайты рестрикции для облегчения добавления меток, кроме стандартных меток His и тус.

### 2.2 Оптимизация Abet0007 посредством нацеленного мутагенеза

Лидерное антитело (Abet0007) оптимизировали для улучшения аффинности к человеческому бета-амилоидному 1-42 пептиду с применением подхода нацеленного мутагенеза и отборов с фаговым дисплеем на основе аффинности. Большие scFv-фаговые библиотеки, полученные из Abet0007, создавали путем олигонуклеотид-направленного мутагенеза определяющих комплементарности областей 3 (CDR3) переменных доменов тяжелой цепи (V<sub>H</sub>) и переменных доменов легкой цепи (V<sub>L</sub>) с применением стандартных методик молекулярной биологии, как описано у Clackson and Lowman ((2004) *A Practical Approach*, Oxford University Press).

Библиотеки подвергали процедурам отбора с помощью фагового дисплея на основе аффинности, чтобы обогатить вариантами с более высокой аффинностью к человеческому бета-амилоидному 1-42 пептиду. Процедуру отбора осуществляли, фактически, как описано ранее (Hawkins *et al.*, 1992; Schier *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1996). Вкратце, фаговые частицы с scFv инкубировали с биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом (rPeptide, США; № по кат.: A1117) в растворе. Фаг с ScFv, который связался с антигеном, затем захватывали на покрытых стрептавидином парамагнитных гранулах (Dynabeads® M280, Invitrogen Life Sciences, Великобритания) согласно рекомендациям производителя. Затем отобранные фаговые частицы с scFv спасали, как описано ранее (Osbourn *et al.*, 1996), и процесс отбора повторяли в присутствии понижающихся концентраций биотинилированного человеческого бета-амилоидного 1-42 антигена (от 200 нМ до 2 нМ за 3 раунда).

### 2.3 Идентификация улучшенных клонов с применением анализа прямого связывания

Тысячу семьсот шестьдесят scFv случайным образом отобрали из раундов отбора 2 и 3 из подхода с нацеленным мутагенезом, описанного в разделе 2.2. Эти клоны подвергали скринингу с применением анализа прямого связывания, фактически, как описано в разделе 1.3. Вкратце, неочищенные scFv из периплазматических препаратов тестировали на повышенное связывание с биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом и выявляли с применением HTRF™-технологии с детекторными реагентами криплатом стрептавидина и антителом к bhis-XL665.

Неочищенные scFv из периплазматических препаратов готовили в 50 мМ буфере MOPS, pH 7,4, содержащем 0,5 мМ EDTA и 0,5 М сахарозы, и впоследствии разводили до 1% в буфере для анализа, содержащем 50 мМ MOPS, pH 7,4 (Sigma, Великобритания; № по кат.: M9381), 0,4 М фторида калия (BDH Chemicals, США; № по кат.: 103444T), 0,1% бычьего сывороточного альбумина, не содержащего жирных кислот (Sigma, Великобритания; № по кат.: A6003) и 0,1% Tween 20 (объем/объем) (Sigma, Великобритания; № по кат.: P2287), с применением 384-луночного планшета с лунками с V-образным дном Greiner (Greiner BioOne, Германия; № по кат.: 781280). 5 мкл разведенного образца scFv переносили в планшет для анализа (Costar® 384-луночный с черными мелкими лунками, Corning Life Sciences; № по кат.: 3676) с применением роботизированной станции дозирования жидкостей MiniTrak™ (PerkinElmer, США). Затем в каждую лунку добавляли по 5 мкл буфера для анализа. 20 нМ раствор биотинилированного человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида (rPeptide, США; № по кат.: A1117) готовили в буфере для анализа и 5 мкл этого раствора добавляли в планшеты для анализа. Детекторные реагенты криплат стрептавидина (Cisbio International, Франция; № по кат.: 610SAKLB) и антитело к His6-XL665 (Cisbio International, Франция; № по кат.: 61HISXLB) объединяли в буфере для анализа с получением концентраций 7 нМ криптата стрептавидина и 60 нМ антитела к His6-XL665 и затем по 5 мкл этой детекторной смеси добавляли во все лунки планшетов для анализа. Лунки с неспецифичным связыванием (отрицательные контроли) определяли для каждого планшета путем замещения образца scFv 5 мкл буфера для анализа. Планшеты для анализа закрывали и инкубировали в течение 2,5 часа при комнатной температуре перед считыванием флуоресценции с временным разрешением при длинах волны испускания 620 нм и 665 нм с применением планшет-ридера EnVision (PerkinElmer, США). Анализ данных осуществляли, как описано ранее (раздел 1.3), и значения % дельта F применяли для сравнения сигналов анализа в соседних лунках. “Попадание” определяли как образец scFv, который дает % дельта F больше, чем сигнал, наблюдаемый для scFv Abet0007.

## 2.4 Подтверждение улучшенных клонов с применением анализа конкуренции за эпитоп

Клоны, которые показали более высокое связывание с человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом, чем исходный клон Abet0007, подвергали ДНК-секвенированию (Osbourn *et al.*, 1996; Vaughan *et al.*, 1996). scFv с уникальными белковыми последовательностями экспрессировали в *E. coli* и очищали посредством аффинной хроматографии с последующей заменой буфера. Затем аффинности связывания этих scFv тестировали в анализе конкуренции за эпитоп против эталонного антитела, называемого Abet0042, которое имеет аналогичную аффинность в отношении человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида, что и Abet0007. В этом конкурентном анализе определяли конкуренцию связывания IgG Abet0042 с биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом по сравнению с тестируемыми образцами scFv. Связывание IgG Abet0042 с биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом выявляли с применением HTRF™-технологии, как описано ранее (раздел 1.6). Вкратце, серию разведений очищенных scFv добавляли в смесь IgG Abet0042, биотинилированного бета-амилоидного 1-42 пептида, криптоата стрептавидина и антитела к Fc IgG XL665 человека. Флуоресценцию с временным разрешением считывали после двух часов инкубации при комнатной температуре.

Очищенные scFv серийно разводили в буфере для анализа, содержащем 50 мМ буфера MOPS, pH 7,4 (Sigma, Великобритания; № по кат.: M9381), 0,4 М фторида калия (BDH Chemicals, США; № по кат.: 103444T), 0,1% бычьего сывороточного альбумина, не содержащего жирных кислот (Sigma, Великобритания; № по кат.: A6003) и 0,1% Tween 20 (Sigma, Великобритания; № по кат.: P2287), с применением 96-луночного планшета с лунками с U-образным дном Greiner (Greiner BioOne, Германия; № по кат.: 650201). 5 мкл каждого разведения scFv переносили в двойной повторности в планшет для анализа (Costar® 384-луночный с черными мелкими лунками, Corning Life Sciences; № по кат.: 3676) с применением роботизированной станции дозирования жидкостей MiniTrak™ (PerkinElmer, США). 20 нМ раствор биотинилированного бета-амилоидного 1-42 пептида (rPeptide, США; № по кат.: A1117) предварительно готовили в буфере для анализа и 5 мкл раствора биотинилированного пептида вносили в планшеты для анализа с получением конечной концентрации 5 нМ пептида при конечном объеме анализа 20 мкл. Планшеты для анализа герметизировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Криптан стрептавидина и антитело к Fc IgG XL665 человека объединяли при 7 нМ и 20 нМ, соответственно, в буфере для анализа и 5 мкл этого раствора вносили в планшет для анализа. IgG Abet0042 разводили до 2,4 нМ в буфере для анализа и 5 мкл вносили в планшет для анализа с получением конечной концентрации IgG 0,6 нМ. Лунки с неспецифичным связыванием (отрицательные контроли) определяли для каждого планшета путем замещения образца IgG Abet0042 5 мкл буфера для анализа. Планшеты для анализа закрывали и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре перед считыванием флуоресценции с временным разрешением при длинах волны испускания 620 нм и 665 нм с применением планшет-ридера EnVision (PerkinElmer, США).

Данные анализировали путем расчета значения % дельта F и % специфического связывания для каждого образца. % дельта F определяли согласно уравнению 1 и % специфического связывания рассчитывали с применением уравнения 2. Значения IC<sub>50</sub> определяли с применением Prism (Graphpad Software, США) путем подбора кривой с применением логистического уравнения с четырьмя параметрами, как описано в уравнении 3.

Уравнение 3:

Y = Bottom +	Top – Bottom
	$1 + 10^{-(\text{LogEC}_{50} - X) \cdot \text{HillSlope}}$

5 где Y представляет собой специфичное связывание и X представляет собой логарифм концентрации.

Типовые результаты показаны на фигуре 5. Оригинальное лидерное антитело, Abet0007, характеризуется IC<sub>50</sub> 159 нМ, тогда как наиболее улучшенный клон, Abet0144, характеризуется значением IC<sub>50</sub> 5,5 нМ.

10 *2.5 Определение кинетического профиля аффинности улучшенных клонов в формате очищенных scFv при помощи поверхностного плазмонного резонанса*

Поверхностный плазмонный резонанс применяли для анализа очищенных клонов scFv, которые продемонстрировали значительное улучшение аффинности связывания в отношении человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида в сравнении с исходной последовательностью, Abet0007, в HTRF™-анализе конкуренции за эпитоп (раздел 2.4). Вкратце, биосенсорный инструмент VIAcore T-100 (GE Healthcare, Великобритания) применяли для оценки кинетических параметров взаимодействия между каждым очищенным scFv и синтетически полученным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом. Эти эксперименты осуществляли, фактически, как описано у Karlsson и соавт. (Karlsson *et al.*, 1991). Подробнее см. раздел 1.7.

Аффинность связывания между каждым тестируемым scFv и человеческим бета-амилоидным пептидом 1-42 оценивали с применением анализов, в которых биотинилированный синтетический человеческий бета-амилоидный 1-42 пептид (rPeptide, США; № по кат.: A1117) был нековалентно связан через взаимодействие биотин/стрептавидин с проприетарным сенсорным чипом SA с конечной поверхностной плотностью приблизительно 700 RU. Поверхность чипа регенерировали между циклами при помощи однократной 20 секундной инъекции 10 мМ глицина, pH 2.0, для удаления scFv, связавшегося с пептидом. Регенерация не приводила к значительной потере способности связывания пептида.

30 Серию разведений каждого очищенного scFv (12,5–400 нМ) последовательно пропускали поверх поверхности с пептидом в течение достаточного количества времени для наблюдения сенсограмм, которые можно было с достоверностью согласовать с подходящей моделью связывания. Данные холостой пробы с буфером с нулевой концентрацией вычитали из основного набора данных для снижения влияния любых артефактов от буфера или эффектов неспецифичного связывания. Затем подбирали подходящую модель связывания одновременно для данных от каждого титрования аналита с применением программного обеспечения VIAevaluation.

Правильность данных оценивали с применением рассчитанного значения  $\chi^2$  при допустимом значении ниже 4 RU<sup>2</sup>. Общую успешность подбора оценивали с применением остатков при допустимом отклонении менее 20 RU.

Типовые результаты для scFv Abet0144 показаны на фигуре 6. Константа скорости ассоциации (ka), константа скорости диссоциации (kd) и константа диссоциации (KD) составляют 2,01 x 10<sup>5</sup> М<sup>-1</sup> с<sup>-1</sup>, 6,66 x 10<sup>-3</sup> с<sup>-1</sup> и 33,2 нМ, соответственно. Эти параметры получены на основании подбора модели Langmuir 1:1 к данным.

45 *2.6 Переформатирование scFv с улучшенной аффинностью в IgG1-ТМ человека*

Формат антитела IgG1-ТМ представляет собой изотип IgG1 антитела человека, содержащий три замены одиночных аминокислот (тройной мутант: ТМ) в пределах



нижней части шарнирного участка и константного CH2-домена (Oganesyap *et al.*, 2008). При введении в нижнюю часть шарнирного участка и C<sub>H</sub>2-домен молекул IgG1 человека тройная мутация L234F/L235E/P331S ('ТМ') обуславливает значительное снижение его связывания с человеческими CD64, CD32A, CD16 и C1q. Эти ТМ мутации применяют для создания человеческого изоформа с очень низкой эффекторной функцией. ScFv переформатировали в IgG1-ТМ путем субклонирования переменных доменов тяжелой цепи (V<sub>H</sub>) и переменных доменов легкой цепи (V<sub>L</sub>) в векторы, экспрессирующие целые тяжелые и легкие цепи человеческих антител, соответственно. Переменный домен тяжелой цепи клонировали в вектор экспрессии для млекопитающих (pEU 1.4), содержащий константные домены тяжелой цепи человека и регуляторные элементы для экспрессии целой тяжелой цепи IgG1-ТМ в клетках млекопитающих. Аналогично, переменный домен легкой цепи клонировали в вектор экспрессии для млекопитающих (pEU 4.4) для экспрессии константных доменов легкой цепи человека и регуляторных элементов для экспрессии целой легкой цепи IgG в клетках млекопитающих. IgG антитела экспрессировали и очищали, фактически, как описано в разделе 1.5.

### 2.7 Модифицирование на уровне генов зародышевого типа

Аминокислотные последовательности V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-доменов специфических антител к бета-амилоидному 1-42 пептиду, оптимизированных в отношении аффинности, выравнивали с известными последовательностями генов зародышевого типа человека из базы данных VBASE (Tomlinson *et al.*, 1992) и самый близкий ген зародышевого типа идентифицировали при помощи анализа на сходство последовательностей. Для V<sub>H</sub>-доменов оптимизированной линии антител это был Vh3-23 (DP-47), а для V<sub>L</sub>-доменов это был Vl3-3г (DPL-23).

Процесс модифицирования на уровне генов зародышевого типа состоял из восстановления остатков каркасных участков в V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-доменах согласно самой близкой последовательности гена зародышевого типа для идентичного соответствия антителам человека. В случае Abet0144, в V<sub>H</sub>-домене не требовались изменения ни одного остатка (таблица 1), однако всего 5 изменений провели в каркасном участке V<sub>L</sub>-домена. Эти изменения находились в положениях по Kabat 1, 2, 3, 40 и 81 (таблица 2). Остатки Вернье (Foote *et al.*, 1992) не модифицировали на уровне генов зародышевого типа, кроме остатка 2 в последовательности легкой цепи, который был модифицирован на уровне генов зародышевого типа в то же самое время, что и фланкирующие остатки 1 и 3. Модифицирование на уровне генов зародышевого типа этих аминокислотных остатков проводили с применением стандартных методик сайт-направленного мутагенеза с соответствующими мутагенными праймерами, как описано у Clackson and Lowman (Clackson *et al.*, 2004).



Таблица 2. Выравнивание последовательностей клонов Abet0144 и Abet0144-GL с геном зародышевого типа VL3-3R (DPL-23). Выделены остатки, которые отличаются от таковых в гене зародышевого типа. Остатки Вернье обозначены кружками (●). Пять изменений было сделано в VL-домене для модифицирования на уровне генов зародышевого типа  
 5 клона Abet0144. Остаток Вернье 2 восстанавливали согласно гену зародышевого типа в то же самое время, что и остатки 1 и 3. Восстановление этого остатка не повлияло на активность антитела.

2.8 Определение показателей кинетики связывания IgG, оптимизированных в отношении аффинности, с применением поверхностного плазмонного резонанса

10 Поверхностный плазмонный резонанс применяли для анализа показателей кинетики связывания IgG, оптимизированных в отношении аффинности (раздел 2.6), и их модифицированных на уровне генов зародышевого типа аналогов (раздел 2.7). Вкратце, биосенсорный инструмент VIAcore T-100 (GE Healthcare, Великобритания) применяли для оценки кинетических параметров взаимодействия между каждым тестируемым IgG  
 15 и синтетически полученным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом. These experiments were performed essentially as described by Karlsson *et al.* (Karlsson *et al.*, 1991). Подробнее см. раздел 1.7.

Аффинность связывания между каждым тестируемым IgG и человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом оценивали с применением анализов, в которых антитело  
 20 ковалентно связывали посредством аминного мостика с поверхностью проприетарного чипа CM3 с конечной поверхностной плотностью приблизительно 2000 RU. Поверхность чипа регенерировали между циклами при помощи однократной 40 секундной инъекции 10 mM глицина, pH 2.0, для удаления лиганда, связавшегося с антителом. Регенерация не приводила к значительной потере способности связывания пептида.

25 Серию разведений синтетического человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида (1,6–50 нМ) последовательно пропускали поверх поверхности с антителом в течение достаточного количества времени для наблюдения сенсограмм, которые можно было с достоверностью согласовать с подходящей моделью связывания. Данные от холостой пробы для эталонной проточной кюветы вычитали из каждого набора данных для IgG  
 30 и проводили двойное контрольное вычитание данных холостой пробы с буфером с нулевой концентрацией из основного набора данных для снижения влияния любых артефактов от буфера или эффектов неспецифического связывания. Затем подбирали подходящую модель связывания одновременно для данных от каждого титрования аналита с применением программного обеспечения VIAevaluation.

35 Правильность данных оценивали с применением рассчитанного значения  $\chi^2$  при допустимом значении ниже  $2 \text{ RU}^2$ . Общую успешность подбора оценивали с применением остатков при допустимом отклонении менее 2 RU.

Типовые результаты для IgG1-TM Abet0144-GL (модифицированного на уровне генов зародышевого типа) показаны на фигуре 7. Константа скорости ассоциации ( $k_a$ ),  
 40 константа скорости диссоциации ( $k_d$ ) и константа диссоциации (KD) составляют  $2,08 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $1,97 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  и 9,50 нМ, соответственно. Эти параметры получены на основании подбора модели Langmuir 1:1 к данным.

2.9 Определение профиля специфичности IgG, оптимизированных в отношении аффинности, с применением поверхностного плазмонного резонанса

45 Поверхностный плазмонный резонанс применяли для проверки надежности специфичности оптимизированных в отношении аффинности IgG против человеческих бета-амилоидных 1-42 пептидов. Вкратце, биосенсорный инструмент VIAcore T-100 (GE

Healthcare, Великобритания) применяли для оценки кинетических параметров взаимодействия между каждым тестируемым IgG и рядом малых пептидов, в том числе синтетически полученными человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом и человеческим бета-амилоидным 1-40 пептидом. Эти эксперименты осуществляли, фактически, как описано у Karlsson и соавт. (Karlsson *et al.*, 1991). Подробнее см. раздел 1.7.

Аффинность связывания между каждым тестируемым IgG и каждым пептидом оценивали с применением анализов, в которых антитело ковалентно связывали посредством аминного мостика с поверхностью проприетарного чипа CM3 с конечной поверхностной плотностью приблизительно 2000 RU. Поверхность чипа регенерировали между циклами при помощи однократной 40 секундной инъекции 10 mM глицина, pH 2.0, для удаления лиганда, связавшегося с антителом. Регенерация не приводила к значительной потере способности связывания пептида.

Каждый тестируемый пептид при 400 нМ последовательно пропускали поверх поверхности с антителом в течение достаточного количества времени для наблюдения сенсограмм, на которых либо не показано связывание, либо которые можно было с достоверностью согласовать с подходящей моделью связывания. Данные от холостой пробы для эталонной проточной кюветы вычитали из каждого набора данных для IgG и проводили двойное контрольное вычитание данных холостой пробы с буфером с нулевой концентрацией из основного набора данных для снижения влияния любых артефактов от буфера или эффектов неспецифического связывания.

Типовые результаты для IgG1-TM Abet0144-GL (модифицированного на уровне генов зародышевого типа) показаны на фигуре 8. Два пептида (биотинилированный человеческий бета-амилоидный 1-42 (rPeptide, США; № по кат.: A1117) и немеченный человеческий бета-амилоидный 1-42 (rPeptide, США; № по кат.: A1165)) демонстрировали сильное связывание с антителом, тогда как три пептида (биотинилированный скремблированный человеческий бета-амилоидный 1-42 (Anaspec, США; синтез под заказ), биотинилированный человеческий бета-амилоидный 1-40 (rPeptide, США; № по кат.: A1111) и немеченный человеческий бета-амилоидный 1-40 (Anaspec, США; № по кат.: 24236)) демонстрировали отсутствие связывания с антителом.

#### *2.10 Определение профиля специфичности IgG1-TM Abet0144-GL в формате биохимического анализа конкуренции за эпитоп*

Для тестирования специфичности связывания этих IgG1-TM Abet0144-GL с другими человеческими бета-амилоидными пептидами разрабатывали конкурентный анализ. В этом анализе фиксированную концентрацию (1,5 нМ) биотинилированного человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида (rPeptide, США; № по кат.: A1117) инкубировали с диапазоном различных концентраций немеченных человеческих бета-амилоидных пептидов, в том числе 1-42, 1-40, 1-16, 12-28, руго 3-42, руго 11-42 и скремблированным 1-42 (Anaspec № по кат.: 20276, 24236, 24226, 24230, 29907, 29903 и 25383, соответственно), в присутствии фиксированной концентрации (0,28 нМ) IgG1-TM Abet0144-GL. Конкуренцию пептидов оценивали посредством выявления ингибирования связывания IgG1-TM Abet0144-GL с биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом с применением резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением (TR-FRET). Это включало применение детекторных реагентов для TR-FRET антитела к Fc IgG человека, меченного криптоатом европия (CisBio International, Франция; № по кат.: 61HFCKLB), и стрептавидина, меченного XL665 (CisBio International, Франция; № по кат.: 611SAXLB).

Эксперименты проводили в 384-луночных планшетах для микротитрования с лунками

с мелким дном Costar. По 5 мкл/лунка биотинилированного человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида (6 нМ) вносили во все лунки планшета для анализа (за исключением лунок для отрицательного контроля анализа связывания), чтобы получить конечную концентрацию при анализе 1,5 нМ. 5 мкл буфера для анализа вносили только в лунки для отрицательного контроля анализа связывания. Готовили серийную 1:3 титрацию из 11 точек в двух повторностях, или применение каждого тестируемого пептида начинали с наибольшей концентрации 40 мкМ, чтобы получить наибольшую конечную концентрацию пептида в анализе 10 мкМ. Затем по 5 мкл на лунку серийного разведения каждого тестируемого пептида переносили на 384-луночный планшет для анализа. 5 мкл буфера для анализа вносили только в лунки для общего и отрицательного контроля анализа связывания. IgG1-ТМ Abet0144-GL разводили с получением рабочего раствора из расчета 1,12 нМ. По 5 мкл на лунку этого раствора добавляли во все лунки 384-луночного планшета для анализа, чтобы привести к конечной концентрации Abet0144-GL-IgG1-ТМ в анализе 0,28 нМ. Наконец, готовили объединенный раствор, содержащий антитело к Fc человека, меченное криптоатом европия (2,4 нМ), и стрептавидин, меченный XL665 (60 нМ). По 5 мкл на лунку этого раствора добавляли во все лунки 384-луночного планшета для анализа, так что конечные концентрации антитела к Fc человека, меченного криптоатом европия, и стрептавидаина, меченного XL665, составляли 0,6 нМ и 15 нМ, соответственно. Обратите внимание, что конечный объем анализа составлял 20 мкл, и что каждый отдельный компонент анализа вносили в виде добавления 5 мкл, причем с концентрацией в четыре раза большей, чем требуемая конечная концентрация для анализа. Все реагенты разводили в буфере для анализа, содержащем 50 мМ MOPS, pH 7.4 (Sigma, Великобритания; № по кат.: M9381), 0,4 М KF (BDH Chemicals, США; № по кат.: 103444Т), 0,1% бычьего сывороточного альбумина, не содержащего жирных кислот (Sigma, Великобритания; № по кат.: A6003) и 0,1% Tween 20 (объем/объем) (Sigma, Великобритания; № по кат.: P2287).

Планшеты для анализа инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре перед считыванием флуоресценции с временным разрешением при длинах волны испускания 620 нм и 665 нм с применением планшет-ридера EnVision (PerkinElmer, США). Данные анализировали путем расчета значений % дельта F для каждого образца. % дельта F определяли согласно уравнению 1.

Уравнение 1:

% дельта F =	(соотношение 665 нм/620 нм у образца) – (соотношение 665 нм/620 нм у отрицательного контроля)	x 100
	(соотношение 665 нм/620 нм у отрицательного контроля)	

Значения % дельта F использовали для расчета % специфического связывания, как описано в уравнении 2.

Уравнение 2:

% специфического связывания =	% дельта F образца	x 100
	% Дельта F общего связывания контроля	

Типовые результаты для IgG1-ТМ Abet0144-GL показаны на фигуре 9. Эти результаты демонстрируют, что IgG1-ТМ Abet0144-GL связывается с человеческим бета-амилоидным 1-42, руго 3-42 и руго 11-42 пептидами, но не связывается с человеческим бета-амилоидным 1-40 пептидом или усечениями пептида 1-16 и 12-28.

## 2.11 Определение функциональных характеристик лидерных антител при помощи деплеции бета-амилоидных пептидов из человеческой плазмы

Лидерные антитела тестировали в анализе деплеции в плазме для изучения их

способности к иммунопреципитации человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида из плазмы крови человека. Этот анализ применяли для получения доказательства функциональной эффективности каждого антитела. Анализы осуществляли точно, как описано в разделе 1.8.

5 В одном эксперименте антитело IgG1-ТМ Abet0144-GL снижало уровни человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида в плазме от 13,54 пг мл<sup>-1</sup> до 9,86 пг мл<sup>-1</sup> (снижение на 27%). Во втором эксперименте уровни снижались от 40,06 пг мл<sup>-1</sup> до 34,65 пг мл<sup>-1</sup> (снижение на 14%).

10 *2.12 Идентификация улучшенных клонов с нативным связыванием в отношении бета-амилоида с применением in vitro иммуногистохимии*

IgG, оптимизированные в отношении аффинности, тестировали в отношении их способности связываться с бета-амилоидом для того, чтобы идентифицировать лидерные клоны, которые распознают нативный бета-амилоидный пептид. Вкратце, лидерные антитела подвергали скринингу на срезах головного мозга людей с болезнью Альцгеймера и срезах головного мозга мышей Tg2576 для идентификации антител к бета-амилоиду 1-42, которые связывались с нативным амилоидом *in vitro*. Эксперименты осуществляли, фактически, как описано в разделе 1.9.

В этих экспериментах ткань головного мозга человека получали из лобной коры и гиппокампа от двух индивидуумов с тяжелой болезнью Альцгеймера (женщина, ApoE 4/3, 86 лет; женщина, ApoE 3/3, 67 лет). Ткань головного мозга мыши получали от мышей Tg2576 в возрасте 18 месяцев (6 мышей). Антитела тестировали при концентрациях 2, 5 и 20 мкг мл<sup>-1</sup>.

В одном эксперименте антитело IgG1-ТМ Abet0144-GL не окрашивало диффузные бляшки (DP) или бляшки при церебральной амилоидной ангиопатии (САА) (балл = 0). Оно, однако, окрашивало плотные бляшки (CP) с баллом 1 на срезах головного мозга у мышей Tg2576, и баллом 1,5 на срезах головного мозга людей с AD. Напротив, антитело положительного контроля давало балл 3-4 на всех бляшках (CP, DP, САА) на смежных срезах при таких же состояниях. Типичные фотографии показаны на фигуре 10.

30 Пример 3. Оптимизация антитела Abet0144-GL посредством мутирования всех шести CDR, в том числе фланкирующих остатков Вернье

*3.1 Превращение исходного клона Abet0144-GL в формат scFv, совместимый с рибосомным дисплеем*

Исходный клон превращали из формата IgG1-ТМ в формат одноцепочечного 35 переменного фрагмента (scFv) при подготовке для оптимизации аффинности. Кодон-оптимизированные переменные домены тяжелой цепи (V<sub>H</sub>) и переменные домены легкой цепи (V<sub>L</sub>) амплифицировали отдельно от их соответствующих векторов IgG с добавлением специфичных сайтов клонирования и гибкой линкерной области. Затем осуществляли рекомбинаторную ПЦР для получения полной scFv-конструкции, которую 40 клонировали в модифицированный pUC-вектор (pUC-RD), содержащий структурные особенности, необходимые для рибосомного дисплея. Эти особенности включают 5'-и 3'-структуру стебель-петля для предотвращения разрушения мРНК-транскрипта экзонуклеазами, последовательность Shine-Dalgarno для содействия связыванию 45 рибосомы с мРНК-транскриптом, и ген III-спейсер, который позволяет транслированной молекуле scFv сворачиваться, при этом она остается прикрепленной к рибосоме (Groves *et al.*, 2005).

*3.2 Оптимизация Abet0144-GL посредством нацеленного мутагенеза*

Лидерное антитело (Abet0144-GL) дополнительно оптимизировали для улучшения аффинности к человеческому бета-амилоидному 1-42 пептиду с применением подхода нацеленного мутагенеза и отборов с рибосомным дисплеем на основе аффинности. Большие scFv-рибосомные библиотеки, полученные из Abet0144-GL, создавали путем олигонуклеотид-направленного мутагенеза всех шести определяющих комплементарность областей (CDR) переменных доменов тяжелой цепи ( $V_H$ ) и переменных доменов легкой цепи ( $V_L$ ) с применением стандартных методик молекулярной биологии, как описано у Clackson and Lowman (Clackson *et al.*, 2004). Мутированные последовательности из каждого CDR подвергали оптимизации в отношении аффинности в виде отдельной библиотеки. Пять остатков Вернье, предшествующих  $V_H$ CDR1 (остатки по Kabat 26-30), также рандомизировали с применением нацеленного мутагенеза и эти последовательности объединяли и подвергали созреванию с остальной библиотекой  $V_H$ CDR1. Все библиотеки подвергали процедурам отбора с помощью рибосомного дисплея на основе аффинности, чтобы обогатить вариантами с более высокой аффинностью к человеческому бета-амилоидному 1-42 пептиду. Процедуры отбора проводили, фактически, как описано ранее (Hanes *et al.*, 2000).

Вкратце, шесть библиотек нацеленного мутагенеза лидерного клона Abet0144-GL, каждая из которых охватывает один CDR, отдельно транскрибировали в мРНК. С использованием способа прерванной трансляции получали трехчленные комплексы мРНК-рибосома-scFv (Hanes *et al.*, 1997). Затем эти комплексы подвергали четырем раундам отбора, инкубировали в присутствии понижающихся концентраций синтетического биотинилированного человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида (Wachem, Германия; № по кат.: H-5642) (от 100 нМ до 10 нМ) для отбора на варианты с более высокой аффинностью в отношении человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида. Комплексы, которые связались с антигеном, затем захватывали на покрытых стрептавидином парамагнитных гранулах (Dynabeads™, Invitrogen, Великобритания, № по кат.: 112-05D), а неспецифичные рибосомные комплексы смывали. Затем мРНК выделяли из связавшихся рибосомных комплексов, подвергали обратной транскрипции в кДНК и их амплифицировали при помощи ПЦР. Эту ДНК применяли в следующем раунде отбора.

После четырех раундов созревания аффинности, каждый результат отбора клонировали с целью скрининга. ScFv, выделенные с помощью рибосомного дисплея, клонировали в фагмидный вектор pCANTAB6 при помощи разрезания рестрикционной эндонуклеазой *NotI/NcoI* конструкции рибосомного дисплея (New England BioLabs, США; № по кат.: R0189L, R0193L), с последующим лигированием в pCANTAB6, разрезанный при помощи *NotI/NcoI*, с применением T4 ДНК-лигазы (New England BioLabs, США; № по кат.: M0202L), фактически, как описано у McCafferty *и соавт.* (McCafferty *et al.*, 1994).

### 3.3 Идентификация улучшенных клонов с применением анализа конкуренции за эпитоп

Две тысячи двести четыре scFv, выбранных случайным образом из раундов отбора 3 и 4 подхода с нацеленным мутагенезом, описанным в разделе 3.2, экспрессировали в бактериях с получением неочищенных периплазматических scFv. scFv, способные к связыванию синтетического человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида посредством того же эпитопа, что и IgG1-ТМ Abet0144-GL, выявляли в анализе в формате конкуренции, с применением платформы НТRF™. А именно, резонансный перенос

энергии флуоресценции (FRET) измеряли между криптоном стрептавидина (ассоциирует с биотинилированным бета-амилоидным 1-42 пептидом) и антителом к Fc XL665 (ассоциирует с IgG1-ТМ Abet0144-GL) в присутствии одной концентрации каждого неочищенного периплазматического тестируемого scFv. Успешная оккупация эпитопа для IgG1-ТМ Abet0144-GL на пептиде при помощи scFv приводила к снижению в FRET, как измеряли на флуоресцентном планшет-ридере.

‘Общий’ сигнал связывания определяли посредством анализа связывания IgG1-ТМ Abet0144-GL с синтетическим человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом в отсутствие конкурирующего пептида. Сигналы ‘образца’ получали на основании анализа связывания IgG1-ТМ Abet0144-GL с синтетическим человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом в присутствии образца тестируемого scFv. Наконец, сигнал ‘холостой с криптоном’ определяли посредством анализа флуоресценции, опосредованной только смесью детекторных реагентов.

Неочищенные периплазматические scFv получали в буфере для образцов, состоящем из 50 мМ MOPS, pH 7,4, 0,5 мМ EDTA и 0,5 М сахарозы. Для определения профиля образцы scFv разводили в 384-луночном планшете с лунками с V-образным дном до 50% исходной концентрации в буфере для анализа, состоящем из 50 мМ MOPS, pH 7,4, 0,4 М фторида калия, 0,1% альбумина бычьей сыворотки, не содержащей жирных кислот, и 0,1% Tween 20 (объем/объем). По 5 мкл каждого из вновь разведенных scFv переносили в лунки ‘образец’ с черным, мелким, твердым дном несвязывающего 384-луночного планшета для анализа с применением роботизированной станции дозирования жидкостей. Оставшиеся реагенты (приготовленные в буфере для анализа) вносили в планшет для анализа при помощи многоканальной пипетки в следующем порядке: 5 мкл буфера для образцов (в лунки ‘общий’ и ‘холостой с криптоном’), 10 мкл буфера для анализа (в лунки ‘холостой с криптоном’), 5 мкл 2 нМ IgG1-ТМ Abet0144-GL (в лунки ‘образец’ и ‘общий’), 5 мкл 5 нМ биотинилированного человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида (в лунки ‘образец’ и ‘общий’) и 5 мкл детекторной смеси, состоящей из 6 нМ криптона стрептавидина и 60 нМ антитела к His6-XL665 (во все лунки). Планшеты для анализа закрывали и затем инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре в темноте, перед измерением флуоресценции с временным разрешением при длине волны испускания 620 и 665 нм на флуоресцентном планшет-ридере.

Данные анализировали путем расчета значений % дельта F для каждого образца. % дельта F определяли согласно уравнению 4.

Уравнение 4:

% дельта F =	(соотношение 665 нм/620 нм у образца) – (соотношение 665 нм/620 нм в холостой с криптоном)	x 100
	(соотношение 665 нм/620 нм в холостой с криптоном)	

Значения дельта F затем использовали для расчета нормализованных значений связывания, как описано в уравнении 5.

Уравнение 5:

Нормализованные данные (% общего) =	% дельта F образца	x 100
	% дельта F контроля общего связывания	

Неочищенные периплазматические scFv, демонстрирующие значительное ингибирование связывания IgG1-ТМ Abet0144-GL с бета-амилоидным 1-42 пептидом, подвергали ДНК-секвенированию (Osborn *et al.*, 1996; Vaughan *et al.*, 1996). scFv, у которых обнаружили уникальные белковые последовательности, экспрессировали в



*E. coli* и очищали посредством аффинной хроматографии с последующей заменой буфера.

Активность каждого очищенного scFv определяли посредством тестирования серий разведений scFv (как правило, 4 пМ – 1200 нМ) в анализе конкуренции за эпитоп, описанном выше. Данные вновь анализировали путем расчета значений % дельта F и % общего связывания для каждого образца. Кроме того, также рассчитывали значение % ингибирования для каждой концентрации очищенных scFv, как описано в уравнении 6:

Уравнение 6:

% ингибирования = 100 - % общего связывания

Концентрацию образца ScFv помещали на график в сравнении с % ингибирования с применением научного программного обеспечения для построения графиков и для каждого из зависимых от концентраций ответов подбирали кривые нелинейной регрессии. Значения IC<sub>50</sub> получали на основании этих анализов с углами наклона, ограниченными значением -1. Наиболее сильный клон из этого раунда отборов, Abet0286, характеризовался IC<sub>50</sub> 1,8 нМ и брал начало из библиотеки нацеленного мутагенеза V<sub>L</sub>CDR1.

Источники реагентов/оборудования: MOPS (Sigma, Великобритания; № по кат.: M9381), фторид калия (BDH chemicals, США; № по кат.: A6003), бычий сывороточный альбумин, не содержащий жирных кислот (Sigma, Великобритания; № по кат.: A6003), Tween 20 (Sigma, Великобритания; № по кат.: P2287), IgG1-ТМ Abet0144-GL (получен в лаборатории), биотинилированный человеческий бета-амилоидный 1-42 пептид (rPeptide, США; № по кат.: A1117), криптан стрептавидина (Cisbio, Франция; № по кат.: 610SAKLB), антитело к His6-XL665 (Cisbio, Франция; № по кат.: 61HISXLB), 384-луночные планшеты для анализа (Corning, Costar Life Sciences; № по кат.: 3676), 384-луночные планшеты для разведений (Greiner BioOne, Германия; № по кат.: 781280), роботизированная станция дозирования жидкостей (MiniTrak™, Perkin Elmer, США), флуоресцентный планшет-ридер (Envision™, Perkin Elmer, США), HTRF-технология (Cisbio International, Франция), программное обеспечение для построения графиков/проведения статистических анализов (Prism, Graphpad США).

#### *3.4 Рекомбинация успешных результатов отбора для получения “двухкомпонентных” библиотек и последующая оптимизация их аффинности*

Анализ конкуренции за эпитоп, описанный в разделе 3.3, применяли для составления мнения о том, подверглась ли конкретная scFv-рибосомная библиотека созреванию аффинности за первые четыре раунда отбора. Две из данных библиотек, библиотеки нацеленного мутагенеза V<sub>H</sub>CDR3 и V<sub>L</sub>CDR2, не проявили улучшения по сравнению с исходным клоном Abet0144-GL и в дальнейшем их не совершенствовали.

Оставшиеся четыре библиотеки нацеленного мутагенеза (охватывающие V<sub>H</sub>CDR1, V<sub>H</sub>CDR2, V<sub>L</sub>CDR1 и V<sub>L</sub>CDR3) проявили улучшения аффинности и их рекомбинировали попарно для получения шести “двухкомпонентных” рекомбинационных библиотек, в которых два из шести CDR были мутированы. Например, библиотеку с созревшей аффинностью, охватывающую V<sub>H</sub>CDR1, случайным образом рекомбинировали с библиотекой с созревшей аффинностью V<sub>H</sub>CDR2 с получением библиотеки V<sub>H</sub>1:V<sub>H</sub>2. Остальные библиотеки получали следующим образом: V<sub>H</sub>1:V<sub>L</sub>1, V<sub>H</sub>1:V<sub>L</sub>3, V<sub>H</sub>2:V<sub>L</sub>1, V<sub>H</sub>2:V<sub>L</sub>3 и V<sub>L</sub>1:V<sub>L</sub>3. Подгруппу из каждой рекомбинационной библиотеки клонировали, как описано ранее (раздел 3.2), и посылали на секвенирование для проверки надежности

каждой библиотеки.

Затем продолжали отборы, как описано ранее (раздел 3.2), в присутствии понижающихся концентраций биотинилированного синтетического человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида (5 нМ и 2 нМ для раундов 5 и 6, соответственно). Как и ранее, каждый результат отбора клонировали для целей скрининга (раздел 3.2).

Одну тысячу девятьсот тридцать шесть scFv, случайным образом выбранных из раундов отбора 5 и 6, подвергали скринингу в анализе конкуренции за эпитоп, как описано в разделе 3.3. Из-за повышения активности этих клонов неочищенные scFv вначале разводили до 25% перед внесением в планшеты для анализа. Как и ранее, клоны, которые показали значительные ингибиторные свойства, посылали на ДНК-секвенирование, и получали уникальные клоны и анализировали их в виде очищенных scFv (раздел 3.3). Наиболее сильный клон из этих отборов, Abet0303, характеризовался активностью 0,84 нМ и брал начало от рекомбинационной библиотеки V<sub>H</sub>1:V<sub>H</sub>2.

### 3.5 Рекомбинация результатов двухкомпонентного отбора для получения “трехкомпонентных” библиотек и последующая оптимизация их аффинности

Анализ конкуренции за эпитоп, описанный в разделе 3.3, применяли для составления мнения о том, подверглась ли каждая двухкомпонентная библиотека созреванию аффинности за предыдущие два раунда отбора (5 и 6). Все библиотеки проявили улучшения аффинности и, следовательно, их посчитали пригодными для дальнейшего созревания аффинности.

Шесть двухкомпонентных библиотек (раздел 3.4) попарно рекомбинировали с успешными результатами раунда 4 (раздел 3.2) с образованием четырех “трехкомпонентных” рекомбинационных библиотек, в которых три из шести CDR были мутированы. Например, двухкомпонентную библиотеку V<sub>H</sub>2:V<sub>L</sub>3 (результат раунда 6) рекомбинировали с библиотекой нацеленного мутагенеза V<sub>H</sub>CDR1 (результат раунда 4) с получением библиотеки V<sub>H</sub>1:V<sub>H</sub>2:V<sub>L</sub>3. Аналогичные конструкции также создавали посредством объединения двухкомпонентной библиотеки V<sub>H</sub>1:V<sub>H</sub>2 (результат раунда 6) с библиотекой нацеленного мутагенеза V<sub>L</sub>CDR3 (результат раунда 4). Эти две отдельные библиотеки объединяли для создания трехкомпонентной библиотеки V<sub>H</sub>1:V<sub>H</sub>2:V<sub>L</sub>3.

Уделялось внимание тому, чтобы не разрушить синергию между CDR, которые были совместно оптимизированы. Например, двухкомпонентную библиотеку V<sub>H</sub>1:V<sub>L</sub>3 не рекомбинировали с библиотекой нацеленного мутагенеза V<sub>H</sub>CDR2, поскольку данная манипуляция могла разрушить синергию между совместно оптимизированными последовательностями V<sub>H</sub>CDR1 и V<sub>L</sub>CDR3. Полный перечень всех трехкомпонентных библиотек и их производных приведен в таблице 3. Подгруппу из каждой рекомбинационной библиотеки клонировали, как описано ранее (раздел 3.2), и посылали на секвенирование для проверки надежности каждой библиотеки.

Трехкомпонентная библиотека	Составляющие библиотеки	Образована из	
		Результат раунда 6	Результат раунда 4
V <sub>H</sub> 1:V <sub>H</sub> 2:V <sub>L</sub> 1	V <sub>H</sub> 1:V <sub>H</sub> 2:V <sub>L</sub> 1 a	V <sub>H</sub> 1:V <sub>H</sub> 2	V <sub>L</sub> CDR1
	V <sub>H</sub> 1:V <sub>H</sub> 2:V <sub>L</sub> 1 b	V <sub>H</sub> 2:V <sub>L</sub> 1	CDR1 V <sub>H</sub>
V <sub>H</sub> 1:V <sub>H</sub> 2:V <sub>L</sub> 3	V <sub>H</sub> 1:V <sub>H</sub> 2:V <sub>L</sub> 3 a	V <sub>H</sub> 1:V <sub>H</sub> 2	CDR3 V <sub>L</sub>
	V <sub>H</sub> 1:V <sub>H</sub> 2:V <sub>L</sub> 3 b	V <sub>H</sub> 2:V <sub>L</sub> 3	CDR1 V <sub>H</sub>
V <sub>H</sub> 1:V <sub>L</sub> 1:V <sub>L</sub> 3	V <sub>H</sub> 1:V <sub>L</sub> 1:V <sub>L</sub> 3 a	V <sub>H</sub> 1:V <sub>L</sub> 1	CDR3 V <sub>L</sub>

	$V_{H1}:V_{L1}:V_{L3} b$	$V_{L1}:V_{L3}$	CDR1 $V_H$
$V_{H2}:V_{L1}:V_{L3}$	$V_{H2}:V_{L1}:V_{L3} a$	$V_{H2}:V_{L1}$	CDR3 $V_L$
	$V_{H2}:V_{L1}:V_{L3} b$	$V_{L1}:V_{L3}$	CDR2 $V_H$

5 **Таблица 3.** Описание четырех трехкомпонентных библиотек, которые подвергли созреванию в ходе раундов 7 и 8 второй операции по оптимизации лидерного антитела. Каждая библиотека состояла из двух составляющих библиотек, полученных в результате случайной попарной рекомбинации двухкомпонентной библиотеки, результата раунда 6, и библиотеки нацеленного мутагенеза, результата раунда 4.

10 Затем продолжали отборы, как описано ранее (раздел 3.2), в присутствии понижающихся концентраций биотинилированного синтетического человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида (500 нМ и 200 пМ для раундов 7 и 8, соответственно). Как и ранее, каждый результат отбора клонировали для целей скрининга (раздел 3.2).

15 Одну тысячу четыреста восемь scFv, случайным образом выбранных из раундов отбора 7 и 8, подвергали скринингу в анализе конкуренции за эпитоп, как описано в разделе 3.3. Как и в случае “двухкомпонентного” скрининга, неочищенные scFv вначале разводили до 25% перед внесением в планшеты для анализа. Как и ранее, клоны, которые показали значительные ингибиторные свойства, посылали на ДНК-секвенирование, и получали уникальные клоны и анализировали их в виде очищенных scFv (раздел 3.3).  
20 Наиболее сильный клон из этих отборов, Abet0343, характеризовался активностью 0,48 нМ и брал начало от рекомбинационной библиотеки  $V_{H1}:V_{H2}:V_{L3}$ .

### *3.6 Рекомбинация результатов трехкомпонентного отбора для получения “четырёхкомпонентных” библиотек и последующая оптимизация их аффинности*

25 Анализ конкуренции за эпитоп, описанный в разделе 3.3, применяли для составления мнения о том, подверглась ли каждая трехкомпонентная библиотека созреванию аффинности за предыдущие два раунда отбора (7 и 8). Все библиотеки проявили улучшения аффинности и, следовательно, их посчитали пригодными для дальнейшего созревания аффинности.

30 Трехкомпонентную библиотеку  $V_{H1}:V_{H2}:V_{L1}$  (результат раунда 8) рекомбинировали с библиотекой нацеленного мутагенеза  $V_L$ CDR3 (результат раунда 4), а трехкомпонентную библиотеку  $V_{H2}:V_{L1}:V_{L3}$  (результат раунда 8) рекомбинировали с библиотекой нацеленного мутагенеза  $V_H$ CDR1 (результат раунда 4). Дополнительно, двухкомпонентную библиотеку  $V_{H1}:V_{H2}$  (результат раунда 6) рекомбинировали с  
35 двухкомпонентной библиотекой  $V_{L1}:V_{L3}$  (результат раунда 6). Эти три отдельные библиотеки затем объединяли для создания одной “четырёхкомпонентной” библиотеки,  $V_{H1}:V_{H2}:V_{L1}:V_{L3}$ , в которой четыре из шести CDR были мутированы.

40 Уделялось внимание тому, чтобы не разрушить синергию между CDR, которые были совместно оптимизированы. Например, трехкомпонентную библиотеку  $V_{H1}:V_{L2}:V_{L3}$  не рекомбинировали с библиотекой нацеленного мутагенеза  $V_L$ CDR1, поскольку данная манипуляция могла бы разрушить синергию между совместно оптимизированными последовательностями  $V_H$ CDR1/ $V_H$ CDR2 и  $V_L$ CDR3. Подгруппу из каждой рекомбинационной библиотеки клонировали, как описано ранее (раздел 3.2), и посылали  
45 на секвенирование для проверки надежности каждой библиотеки.

Затем продолжали отборы, как описано ранее (раздел 3.2), в присутствии понижающихся концентраций биотинилированного синтетического человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида (от 50 нМ до 10 пМ для раундов 9-11). Как и ранее,

каждый результат отбора клонировали для целей скрининга (раздел 3.2).

Одну тысячу шестьсот семьдесят два scFv, случайным образом выбранных из раундов отбора 9-11, подвергали скринингу в анализе конкуренции за эпитоп, как описано в разделе 3.3. Из-за повышения активности этих клонов неочищенные scFv вначале разводили до 3,13% перед внесением в планшеты для анализа. Как и ранее, клоны, которые показали значительные ингибиторные свойства, посылали на ДНК-секвенирование, и получали уникальные клоны и анализировали их в виде очищенных scFv (раздел 3.3). Наиболее сильный клон из этих отборов, Abet0377, характеризовался активностью 0,32 нМ (данные n=2). Кривые ингибирования для образца показаны на фигуре 11, и данные для 24 клонов с самой высокой активностью показаны в таблице 4. Соответствующие белковые последовательности перечислены в таблицах 5 и 6.

Клон	Раунд отбора	IC <sub>50</sub> (нМ)	Диапазон	Количество повторов
Abet0144-GL	-	14	8,1 – 18	7
Abet0319	7	0,68	0,52 – 0,76	3
Abet0321b	7	0,73	0,69 – 0,76	2
Abet0322b	7	0,71	0,43 – 0,98	2
Abet0323b	8	0,67	0,57 – 0,76	2
Abet0328	8	0,55		1
Abet0329	8	0,63		1
Abet0332	8	0,91		1
Abet0342	8	0,59		1
Abet0343	8	0,48		1
Abet0344	7	0,77		1
Abet0368	11	0,55		1
Abet0369	10	0,36	0,30 – 0,41	3
Abet0370	10	0,76		1
Abet0371	11	0,50	0,46 – 0,53	2
Abet0372	10	0,38	0,26 – 0,49	2
Abet0373	10	0,84		1
Abet0374	10	0,42	0,41 – 0,43	2
Abet0377	10	0,32	0,29 – 0,35	2
Abet0378	9	0,97		1
Abet0379	9	0,69		1
Abet0380	10	0,43	0,38 – 0,47	2
Abet0381	10	0,47		1
Abet0382	10	0,66		1
Abet0383	11	0,75		1

**Таблица 4.** Типовые данные активности для оптимизированных клонов scFv при оценке в HTRF™-анализе конкуренции за эпитоп с Abet0144-GL. Если анализ осуществляли более одного раза, приведен абсолютный диапазон значений IC<sub>50</sub>.

**Таблица 5** (см. ниже): Выравнивание последовательностей VH-доменов оптимизированных не модифицированных на уровне генов зародышевого типа клонов, описанных в данном документе. Изменения относительно исходной последовательности (Abet0144-GL) выделены. Остатки обозначены согласно системе нумерации Kabat.

**Таблица 6** (см. ниже): Выравнивание последовательностей VL-доменов оптимизированных не модифицированных на уровне генов зародышевого типа клонов, описанных в данном документе. Изменения относительно исходной последовательности (Abet0144-GL) выделены. Остатки обозначены согласно системе нумерации Kabat. Обратите внимание, что Abet0378 имеет янтарный стоп-кодон “В”, присутствующий в VL-последовательности в положении 91, который был введен как замена глутамина





Аффинность связывания между каждым тестируемым scFv и человеческим бета-амилоидным пептидом 1-42 оценивали с применением анализов, в которых биотинилированный синтетический человеческий бета-амилоидный 1-42 пептид (rPeptide, США; № по кат.: A1117) был нековалентно связан через взаимодействие биотин/стрептавидин с проприетарным чипом со стрептавидином (NTA 176-5021) при пяти различных поверхностных плотностях. Поверхность чипа регенерировали между циклами при помощи однократной 60 секундной инъекции 10 mM глицина, pH 2.0, для удаления scFv, связавшегося с пептидом. Регенерация не приводила к значительной потере способности связывания scFv.

Каждый scFv из расчета 100 – 200 нМ последовательно пропускали поверх поверхности с пептидом в течение достаточного количества времени для наблюдения сенсограмм, которые можно было с достоверностью согласовать с подходящей моделью связывания. Данные несущественной холостой пробы с scFv вычитали из основного набора данных для снижения влияния любых артефактов от буфера или эффектов неспецифического связывания. Затем к данным подбирали подходящую модель связывания.

Для scFv Abet0380, константа скорости ассоциации ( $k_a$ ), константа скорости диссоциации ( $k_d$ ) и константа диссоциации ( $K_D$ ) составляют  $1,93 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ,  $2,85 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$  и 148 пМ, соответственно. Эти параметры получены на основании подбора модели Langmuir 1:1 к данным.

Клон	$k_a$ ( $\text{M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ )	$k_d$ ( $\text{c}^{-1}$ )	$K_D$ (M)
Abet0144-GL	1,16E+05	6,60E-03	5,87E-08
Abet0319	3,29E+05	1,29E-04	3,91E-10
Abet0321b	1,50E+05	3,33E-05	2,22E-10
Abet0322b	2,03E+05	1,65E-04	8,12E-10
Abet0323b	2,10E+05	1,88E-04	8,94E-10
Abet0328	1,41E+05	1,03E-04	7,29E-10
Abet0329	1,97E+05	1,38E-04	7,01E-10
Abet0332	3,29E+05	1,29E-04	3,91E-10
Abet0342	1,36E+05	5,73E-05	4,21E-10
Abet0343	1,20E+05	2,25E-05	1,88E-10
Abet0344	7,75E+04	5,73E-05	7,39E-10
Abet0368	1,87E+05	9,00E-05	4,82E-10
Abet0369	3,27E+05	4,34E-05	1,33E-10
Abet0370	1,19E+05	7,76E-05	6,51E-10
Abet0371	3,57E+05	2,72E-04	7,62E-10
Abet0372	2,43E+05	1,76E-04	7,24E-10
Abet0373	1,85E+05	8,92E-05	4,83E-10
Abet0374	2,56E+05	6,04E-05	2,36E-10
Abet0377	1,96E+05	3,02E-05	1,54E-10
Abet0378	1,36E+05	6,41E-05	4,72E-10
Abet0379	1,34E+05	4,39E-05	3,27E-10
Abet0380	1,93E+05	2,85E-05	1,48E-10
Abet0381	2,13E+05	5,14E-05	2,41E-10
Abet0382	2,25E+05	7,97E-05	3,54E-10
Abet0383	1,81E+05	3,94E-05	2,17E-10

**Таблица 7.** Типовые данные кинетических параметров для оптимизированных клонов scFv, связывающихся с синтетическим биотинилированным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

### 3.8 Переформатирование scFv с улучшенной аффинностью в IgG1-ТМ человека

Формат антитела IgG1-ТМ обсуждается в разделе 2.6. ScFv переформатировали в IgG1-ТМ путем субклонирования переменных доменов тяжелой цепи ( $V_H$ ) и переменных доменов легкой цепи ( $V_L$ ) в векторы, экспрессирующие целые тяжелые и легкие цепи человеческих антител, соответственно. Переменный домен тяжелой цепи клонировали в вектор экспрессии для млекопитающих (pEU 1.4), содержащий константные домены тяжелой цепи человека и регуляторные элементы для экспрессии целой тяжелой цепи IgG1-ТМ в клетках млекопитающих. Аналогично, переменный домен легкой цепи клонировали в вектор экспрессии для млекопитающих (pEU 4.4) для экспрессии константных доменов легкой цепи человека и регуляторных элементов для экспрессии целой легкой цепи IgG в клетках млекопитающих.

Для получения антител в виде IgG векторы экспрессии для тяжелой и легкой цепи IgG временно трансфицировали в клетки млекопитающих HEK293-EBNA (Invitrogen, Великобритания; № по кат.: R620-07), в которых IgG экспрессировались и секретируются в среду. Собранные среды объединяли и фильтровали перед очисткой. IgG очищали с применением хроматографии с белком А. Культуральные супернатанты загружали на подходящую керамическую колонку с белком А (BioSeptra – Pall, США) и промывали при помощи 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 250 mM NaCl. Связанный IgG элюировали из колонки с помощью 0,1 M цитрата натрия (pH 3,0) и нейтрализовали добавлением Tris-HCl (pH 9,0). Для элюированного материала проводили замену буфера на PBS с применением колонки для замены буфера NAP-10 (GE Healthcare, Великобритания; № по кат.: 17-0854-02) и очищенные IgG пропускали через 0,2 мкм фильтр. Концентрацию IgG определяли спектрофотометрическим способом с применением коэффициента экстинкции на основании аминокислотной последовательности IgG. Очищенные IgG анализировали в отношении агрегирования или разложения с применением SEC-HPLC и при помощи SDS-PAGE.

### 3.9 Модифицирование на уровне генов зародышевого типа

Пять наиболее сильных IgG отбирали для модифицирования на уровне генов зародышевого типа на основании экспериментальных характеристик их соответствующих scFv. Очищенные scFv всех клонов Abet0343, Abet0369, Abet0377, Abet0380 и Abet0382 проявляли значения  $IC_{50}$  меньше 750 пМ, как определяли при помощи анализа конкуренции за эпитоп (таблица 4), и все характеризовались экспериментальной константой диссоциации меньше 250 пМ, как определяли при помощи поверхностного плазмонного резонанса, таблица 7.

Процесс модифицирования на уровне генов зародышевого типа состоял из восстановления остатков каркасных участков в  $V_H$ - и  $V_L$ -доменах согласно самой близкой последовательности гена зародышевого типа для идентичного соответствия антителам человека. Для  $V_H$ -доменов оптимизированной линии антител это был Vh3-23 (DP-47), а для  $V_L$ -доменов это был Vl3-3r (DPL-23). Для Abet0380 требовалось изменение 1 остатка в  $V_H$ -доме в положении по Kabat 43 (таблица 8) и требовалось изменение 1 остатка в  $V_L$ -доме в положении по Kabat 81 (таблица 9). В остальных четырех последовательностях требовалось от двух до пяти изменений (таблицы 8 и 9). Остатки Вернье (Foote *et al.*, 1992) не модифицировали на уровне генов зародышевого типа, кроме остатка 2 в последовательности легкой цепи Abet0343, который был модифицирован на уровне генов зародышевого типа в то же самое время, что и фланкирующие остатки 1 и 3. Модифицирование на уровне генов зародышевого типа этих аминокислотных остатков проводили с применением стандартных методик сайт-



направленного мутагенеза с соответствующими мутагенными праймерами, как описано у Clackson and Lowman (Clackson *et al.*, 2004).

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45

Номера нуклеотидов	FW 1	CDR 1	FW 2	CDR 2
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
32				
33				
34				
35				
36				
37				
38				
39				
40				
41				
42				
43				
44				
45				
46				
47				
48				
49				
50				
51				
52				
53				
54				
55				
56				
57				
58				
59				
60				
61				
62				
63				
64				
65				

Номера нуклеотидов	FW 3	CDR 3	FW 4
66			
67			
68			
69			
70			
71			
72			
73			
74			
75			
76			
77			
78			
79			
80			
81			
82			
83			
84			
85			
86			
87			
88			
89			
90			
91			
92			
93			
94			
95			
96			
97			
98			
99			
100			
101			
102			
103			
104			
105			
106			
107			
108			
109			
110			
111			
112			
113			

Таблица 8. Выравнивание последовательностей V<sub>H</sub>-доменов пяти клонов, отобранных для модифицирования на уровне генов зародышевого типа. Два остатка, которые восстановили согласно гену зародышевого типа, обозначены затемненными полями. Положения остатков Вернье обозначены кружками (●).

5

10

15

20

25

30

35

40

45



восстановили согласно гену зародышевого типа, обозначены затемненными полями. Положения остатков Вернье обозначены кружками (●). Остаток Вернье 2 восстанавливали согласно гену зародышевого типа в то же самое время, что и остатки 1 и 3. Восстановление этого остатка не повлияло на активность антитела.

5 *3.10 Определение показателей кинетики связывания IgG, оптимизированных в отношении аффинности, с применением поверхностного плазмонного резонанса*

Поверхностный плазмонный резонанс применяли для анализа показателей кинетики связывания IgG, оптимизированных в отношении аффинности (раздел 3.8), и их модифицированных на уровне генов зародышевого типа аналогов (раздел 3.9). Вкратце, биосенсорный инструмент VIAcore T-100 (GE Healthcare, Великобритания) применяли для оценки кинетических параметров взаимодействия между каждым тестируемым IgG и синтетически полученным человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом. Эти эксперименты осуществляли, фактически, как описано у Karlsson *и соавт.* (Karlsson *et al.*, 1991). Подробнее см. раздел 1.7.

15 Аффинность связывания между каждым тестируемым IgG и человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом оценивали с применением анализов, в которых каждое антитело нековалентно захватывали с помощью поверхности с белком G, который сам по себе был связан аминным мостиком с проприетарным чипом CM5. Поверхность чипа регенерировали между циклами при помощи парных 40 секундных инъекций 10 мМ глицина, pH 2.0, для удаления лиганда и связавшегося антитела. Затем тестируемое антитело вновь применяли для каждого введения пептида.

20 Серию разведений синтетического человеческого бета-амилоидного 1-42 пептида (0,063–1024 нМ) последовательно пропускали поверх поверхности с антителом в течение достаточного количества времени для наблюдения сенсограмм, которые можно было с достоверностью согласовать с подходящей моделью связывания. Данные от холостой пробы для эталонной проточной кюветы вычитали из каждого набора данных для IgG и проводили двойное контрольное вычитание данных холостой пробы с буфером с нулевой концентрацией из основного набора данных. Затем подбирали подходящую модель связывания одновременно для данных от каждого титрования аналита с применением программного обеспечения VIAevaluation.

30 Правильность данных оценивали с применением рассчитанного значения  $\chi^2$  при допустимом значении ниже  $2 RU^2$ . Общую успешность подбора оценивали с применением остатков при допустимом отклонении менее 2 RU.

35 Типовые результаты для IgG1-TM Abet0380-GL (модифицированного на уровне генов зародышевого типа) показаны на фигуре 12. Константа скорости ассоциации ( $k_a$ ), константа скорости диссоциации ( $k_d$ ) и константа диссоциации (KD) составляют  $9,52 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ ,  $3,07 \times 10^{-4} s^{-1}$  и 322 пМ, соответственно. Эти параметры получены на основании подбора модели Langmuir 1:1 к данным.

40 *3.11 Определение профиля специфичности IgG, оптимизированных в отношении аффинности, с применением поверхностного плазмонного резонанса*

Поверхностный плазмонный резонанс применяли для проверки надежности специфичности оптимизированных в отношении аффинности IgG против человеческих бета-амилоидных 1-42 пептидов. Вкратце, биосенсорный инструмент VIAcore2000 (GE Healthcare, Великобритания) применяли для оценки кинетических параметров взаимодействия между каждым тестируемым IgG и рядом малых пептидов, в том числе синтетически полученными человеческим бета-амилоидным 1-42 пептидом и человеческим бета-амилоидным 1-40 пептидом. Эти эксперименты осуществляли,

фактически, как описано у Karlsson *и соавт.* (Karlsson *et al.*, 1991). Подробнее см. раздел 1.7.

Взаимодействие между каждым тестируемым IgG и каждым пептидом оценивали с применением анализов, в которых антитело нековалентно захватывали с помощью поверхности с белком G, который сам по себе был связан аминным мостиком с проприетарным чипом CM5. Взаимодействие между антителом и пептидом наблюдали с применением подхода с 5 применениями в одном цикле. Поверхность чипа регенерировали между циклами при помощи парных 40 секундных инъекций 10 мМ глицина, рН 2.0, для удаления лиганда и связавшегося антитела. Затем тестируемое антитело вновь применяли для каждого цикла введения пептида.

Каждый тестируемый пептид (от 64 до 1024 нМ) последовательно пропускали поверх поверхности с антителом в течение достаточного количества времени для наблюдения сенсограмм, на которых либо не показано связывание, либо которые можно было с достоверностью согласовать с подходящей моделью связывания. Данные от холостой пробы для эталонной проточной кюветы вычитали из каждого набора данных для IgG и проводили двойное контрольное вычитание данных холостой пробы с буфером с нулевой концентрацией из основного набора данных.

Типовые результаты для IgG1-ТМ Abet0380-GL (модифицированного на уровне генов зародышевого типа) показаны на фигуре 13. Два пептида (биотинилированный человеческий бета-амилоидный 1-42 (rPeptide, США; № по кат.: A1117) и немеченный мышинный бета-амилоидный 1-42 (rPeptide, США; № по кат.: A1008) демонстрировали сильное связывание с антителом, тогда как два пептида, биотинилированный человеческий бета-амилоидный 1-40 (rPeptide, США; № по кат.: A1111) и немеченный мышинный бета-амилоидный 1-40 (rPeptide, США; № по кат.: A1007) демонстрировали отсутствие связывания с антителом.

### 3.12 Аффинность самых сильных IgG в отношении нативного бета-амилоида с применением *in vitro* иммуногистохимии

Самые сильные IgG тестировали в отношении их способности связываться с бета-амилоидом, чтобы оценить аффинность этих клонов в отношении нативных форм бета-амилоидного пептида. Вкратце, лидерные антитела подвергали скринингу на срезах головного мозга людей с болезнью Альцгеймера и срезах головного мозга мышей Tg2576 для идентификации антител к бета-амилоиду 1-42, которые связывались с амилоидными бляшками *in vitro*. Эксперименты осуществляли, фактически, как описано в разделе 1.9.

В этих экспериментах, ткань головного мозга человека получали из лобной коры двух индивидуумов с тяжелой болезнью Альцгеймера (генотип ApoE 3/3, стадия по Braak 6 и генотип ApoE 4/3, стадия по Braak 5). В качестве контроля, эквивалентную ткань получали от одного индивидуума без деменции (генотип ApoE 3/3, стадия по Braak 1). Ткань головного мозга мыши вырезали из мышей Tg2576 в возрасте 15 месяцев (2 мыши) и 22 месяца (2 мыши). Антитела тестировали при концентрациях 2, 5, 10 и 20 мкг мл<sup>-1</sup>.

В одном эксперименте антитело IgG1-ТМ Abet0380-GL окрашивало плотные бляшки (CP) с баллом 4 на срезах головного мозга мышей Tg2576 и с баллом 3 на срезах головного мозга людей с AD. Оно также окрашивало диффузные бляшки (DP) и бляшки при церебральной амилоидной ангиопатии (САА), но в меньшей степени. Напротив, антитело положительного контроля давало балл 3-4 на всех бляшках (CP, DP, САА) на смежных срезах при таких же состояниях. Типичные фотографии показаны на фигуре 14.

### 3.13 Демонстрация профиля распознавания A $\beta$ 42 антителом IgG1-TM Abet0380-GL при помощи вестерн-блоттинга

Чтобы сшить A $\beta$ 42-олигомеры перед SDS-PAGE, PICUP (фотоиндуцированная сшивка пептидов) проводили следующим образом. 1 мМ раствор Ru(Bpy) получали добавлением 2 мкл исходного раствора (с концентрацией 10 мМ) к 18 мкл 1xPBS. Кроме того, 20 мМ раствор персульфата аммония (APS) получали добавлением 2 мкл исходного раствора (с концентрацией 200 мМ) к 18 мкл 1xPBS. Неиспользуемый исходный раствор сразу же замораживали на сухом льду и возвращали в морозилку при -80°C. В темной комнате 5 мкл Ru(Bpy) добавляли к 80 мкл агрегата (чистый 10 мкМ образец), а затем 5 мкл APS. Образцы облучали с помощью лампы в темной комнате в течение 10 секунд. Сразу же добавляли 30 мкл (4x) LDS буфера для образцов.

Затем осуществляли SDS-PAGE для сшитых (PICUP) и несшитых агрегатов A $\beta$ 1-42. Растворы инкубировали на водяной бане Hot Block при 70°C в течение 10 минут. Тем временем получали маркер путем комбинирования 5 мкл белкового стандарта для вестерн-блоттинга Magic Mark XP, 5 мкл предварительно окрашенного белкового стандарта Novex Sharp. После инкубации в течение десяти минут, образцы вместе с маркером загружали на гели NuPAGE Novex с 4-12% буфером Bis-Tris (1,0 мм, 15 лунок, 15 мкл на лунку) с буфером подвижной фазы MES. Хроматографию гелей проводили при 200 В в течение 35 минут.

Затем осуществляли блоттинг геля на PVDF-мембрану с применением аппарата iBlot от Invitrogen в течение 7 минут при 20 В (программа P3).

После окончания блоттинга слой геля убирали и PVDF-мембрану затем блокировали в 50 мл 4% MPBST (4% Marvel в PBST) в течение одного часа при комнатной температуре при легком вращении. Затем пятна вырезали скальпелем для исследования с помощью отдельных антител. Это исследование представляло собой инкубацию в течение 1 часа с раствором первичного антитела (2 мкг/мл в 10 мл 3% MPBST).

После этого мембрану промывали 5x с помощью PBST, по 5 минут каждый раз, и затем инкубировали в растворе вторичного антитела (1 мкл HRP-конъюгата антитела, специфичного к Fc человека, в 10 мл PBST) в течение 1 часа при комнатной температуре. Мембрану промывали 3x с помощью PBST и 2x с помощью PBS, по 5 минут каждый раз.

Во время последних промывок хемилюминисцентный субстрат SuperSignal West Dura (Thermo Scientific; 34075) оставляли нагреваться до комнатной температуры. Объединяли по 600 мкл каждого из 2 растворов. PBS декантировали от PVDF-мембраны, а затем для покрытия мембраны смешанными реagenтами Dura применяли пипетку. Обеспечивали осуществление реакции в течение ~5 минут (в это время настраивали систему визуализации VerscDoc) и затем получали фотографии с экспонированием 30 секунд (с усовершенствованием при применении трансформирующего фильтра). Типичная фотография показана на фигуре 15.

#### 40 Пример 4. Исследования, демонстрирующие специфичную функциональную реакцию антитела IgG1-TM Abet0380-GL in vivo

##### 4.1 Определение функциональных характеристик IgG1-TM Abet0380-GL в отношении снижения свободного бета-амилоидного 1-42 пептида in vivo

Самцам крыс-альбиносов Harlan Sprague-Dawley возрастом восемь недель ( $n = 8-12$ ) вводили однократную дозу антитела IgG1-TM Abet0380-GL при помощи внутривенной инъекции со средой для введения дозы из 25 мМ гистидина, 7% сахарозы, 0,02% поверхностно-активного вещества р80, pH 6,0, из расчета 5 мл/кг. Растворы для введения дозы готовили непосредственно перед введением дозы. В указанное время животным

вводили анестезию и спинномозговую жидкость (CSF) аспирировали из задней мозжечково-мозговой цистерны. Образцы CSF центрифугировали в течение 10 минут при приблизительно 3000 x g при 4°C не позже, чем через 20 минут после взятия образца, для удаления клеток или дебриса. Затем образцы замораживали на сухом льду и хранили при -70°C для последующего анализа.

Животных умерщвляли декапитацией, ткань головного мозга иссекали и бета-амилоидные пептиды экстрагировали из ткани головного мозга в диэтиламине (DEA; Fluka, Sigma, Великобритания; № по кат.: 31729). Вкратце, замороженную ткань головного мозга гомогенизировали в 0,2% DEA и 50 mM NaCl (Merck, США; № по кат.: 1.06404.1000). Гомогенаты головного мозга ультрацентрифугировали при 133000 x g в течение 1 часа. Полученные супернатанты нейтрализовали до pH 8,0 с помощью 2 M Tris-HCl (TRIZMA®-гидрохлорид; Sigma, Великобритания; № по кат.: 93363) и хранили при -70°C до проведения анализа. Эксперименты на животных осуществляли согласно соответствующим руководствам и инструкциям, предусмотренным Министерством сельского хозяйства Швеции. Разрешение согласно нормам этики было получено от совета по этике, специализирующегося на экспериментах на животных: Комитет по этике при исследованиях на животных Южного Стокгольма (Stockholm Södra Animal Research Ethical Board).

Измерения свободного бета-амилоидного 1-42 пептида в CSF крыс проводили с применением иммунопреципитации для удаления бета-амилоидного 1-42 пептида, связанного с Abet0380-GL, с последующим анализом при помощи коммерческого набора для ELISA, полученного от Invitrogen. Вкратце, раствор гранул с белком A (Dynabeads® Protein A; Invitrogen, Великобритания; № по кат.: 100-02D) вносили в 96-луночный неокаймленный планшет (полипропилен 0,2 мл; VWR International, Великобритания; № по кат.: 10732-4828) и дважды промывали с помощью TBST (50 mM TBS; Sigma, Великобритания; № по кат.: T6664 вместе с 0,1% Tween20), причем применяли магнит (DynaMag™ 96 секций; Invitrogen, Великобритания; № по кат.: 123.31D) для отделения гранул от раствора. Оттаявшие образцы CSF крысы (40 мкл) добавляли в каждую лунку и инкубировали при 40°C при вращении с наклоном в течение 1 часа. Затем гранулы осаждали при помощи магнита и по 30 мкл иммунопреципитированных образцов CSF переносили в 96-луночный планшет из набора для ELISA (набор для колориметического ELISA мышинового бета-амилоидного (1-42) пептида; Invitrogen, Великобритания; № по кат.: KMB3441) с 70 мкл уже внесенного стандартного буфера для разведений (дополненный ингибитором протеазы; Roche, Великобритания; № по кат.: 11836153001). Стандартные образцы для калибровки вносили в планшет в двух повторностях и планшет инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при покачивании. Планшет промывали 4 раза с помощью 400 мкл промывочного буфера, по 100 мкл раствора детекторного антитела добавляли в каждую лунку и планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при покачивании. Снова планшет промывали 4 раза с помощью 400 мкл промывочного буфера, по 100 мкл рабочего раствора вторичного антитела добавляли в каждую лунку и планшет инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре при покачивании. Наконец, планшет промывали 4 раза с помощью 400 мкл промывочного буфера, по 100 мкл стабилизированного хромогена добавляли в каждую лунку и планшет инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. Для остановки реакции по 100 мкл стоп-раствора добавляли в каждую лунку и планшет считывали не позднее чем через 2 часа при поглощении 450 нм. Анализировали одиночные образцы CSF и анализ данных осуществляли с применением Prism 4 (GraphPad, США) при помощи

однофакторного ANOVA на log-трансформированных данных без поправки на множественные сравнения.

Измерения общего (свободный и связанный с Abet0380-GL) бета-амилоидного 1-42 пептида в гомогенатах головного мозга крысы осуществляли с применением модификаций набора для колориметического ELISA мышинового бета-амилоидного (1-42) пептида (Invitrogen, Великобритания; № по кат.: KMB3441). Детекторное антитело набора заменяли избытком антитела IgG1-TM Abet0380-GL, а вторичное антитело антилелом к IgG человека, конъюгированным с HRP (Jackson ImmunoResearch, Великобритания; № по кат.: 109-035-098). Вкратце, оттаявшие гомогенаты головного мозга по 50 мкл, разведенные 1:2 в разбавителе для образцов (дополненном ингибитором протеазы; Roche, Великобритания; № по кат.: 11836153001), и стандартные образцы вносили в двух повторностях в 96-луночный планшет для ELISA. Избыток антитела IgG1-TM Abet0380-GL (50 мкл, 4 мкг/мл) добавляли в каждую лунку и планшет затем инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре. Планшет промывали 4 раза с помощью 400 мкл промывочного буфера, по 100 мкл рабочего раствора вторичного антитела добавляли в каждую лунку и планшет инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Наконец, планшет промывали 4 раза с помощью 400 мкл промывочного буфера, по 100 мкл стабилизированного хромогена добавляли в каждую лунку и планшет инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. Для остановки реакции по 100 мкл стоп-раствора добавляли в каждую лунку и планшет считывали не позднее чем через 2 часа при поглощении 450 нм. Анализ данных осуществляли с применением Prism 4 (GraphPad, США) при помощи однофакторного ANOVA на log-трансформированных данных без поправки на множественные сравнения.

Измерения общего бета-амилоидного 1-40 пептида в гомогенатах головного мозга крысы осуществляли с применением набора для колориметического ELISA мышинового бета-амилоидного (1-40) пептида (Invitrogen, Великобритания; № по кат.: KMB3481). Вкратце, оттаявшие гомогенаты головного мозга по 50 мкл и стандартные образцы, разведенные 1:2 в разбавителе для образцов (дополненном ингибитором протеазы; Roche, Великобритания; № по кат.: 11836153001), вносили в двух повторностях в 96-луночный планшет для ELISA. По 50 мкл раствора детекторного антитела добавляли в каждую лунку и планшет инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре. Планшет промывали 4 раза с помощью 400 мкл промывочного буфера, по 100 мкл рабочего раствора вторичного антитела добавляли в каждую лунку и планшет инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Наконец, планшет промывали 4 раза с помощью 400 мкл промывочного буфера, по 100 мкл стабилизированного хромогена добавляли в каждую лунку и планшет инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. Для остановки реакции по 100 мкл стоп-раствора добавляли в каждую лунку и планшет считывали не позднее чем через 2 часа при поглощении 450 нм. Анализ данных осуществляли с применением Prism 4 (GraphPad, США) при помощи однофакторного ANOVA на log-трансформированных данных без поправки на множественные сравнения.

#### *4.2 Определение функциональных характеристик IgG1-TM Abet0380-GL в отношении снижения свободного бета-амилоидного 1-42 пептида in vivo*

Однократная доза антитела IgG1-TM Abet0380-GL из расчета 20 мг/кг снижала уровни свободного бета-амилоидного 1-42 пептида в CSF у крыс до предела количественного определения через 72 или 168 часов после введения дозы в анализе, описанном в разделе 4.1 (данные не показаны). Для дальнейшего исследования эффекта антитела IgG1-TM



Abet0380-GL *in vivo*, крысам вводили еженедельные дозы по 0,25, 0,5, 1, 5 или 10 мг/кг на протяжении 14 дней. Животных умерщвляли через 168 часов после второй дозы для измерения уровней свободного бета-амилоидного 1-42 пептида в CSF, а также общих бета-амилоидного 1-42 или 1-40 пептидов в ткани головного мозга.

5 В CSF было показано дозозависимое снижение свободного бета-амилоидного 1-42 пептида (фигура 16А). Две самые большие дозы, 5 и 10 мг/кг, снижали бета-амилоидный 1-42 пептид до предела количественного определения в применяемом анализе, тогда как дозы 0,5 и 1 мг/кг значительно снижали содержание бета-амилоидного 1-42 пептида на 47% и 61%, соответственно, при сравнении с контролем-средой. Самая низкая доза, 10 0,25 мг/кг, приводила к 14% снижению свободного бета-амилоидного 1-42 пептида в CSF, но не достигла статистической значимости. Вследствие удаления бета-амилоидного 1-42 пептида при помощи антитела IgG1-ТМ Abet0380-GL в ткани головного мозга было показано дозозависимое повышение общего бета-амилоидного 1-42 пептида (фигура 16В). Однако, уровень общего бета-амилоидного 1-40 пептида в ткани головного 15 мозга не подвергался влиянию (фигура 16С), что, таким образом, демонстрирует специфичность IgG1-ТМ Abet0380-GL в отношении бета-амилоидного 1-42 пептида. Подводя итог, приведенные выше результаты исследований на крысах показали, что антитело IgG1-ТМ Abet0380-GL снижало уровень свободного бета-амилоидного 1-42 пептида в CSF с  $ED_{50}$  от 0,5 до 1 мг/кг.

20 *4.3 Определение функциональных характеристик IgG1ТМ Abet0380-GL – демонстрация связывания не с бляшками in vivo - отсутствие связывания IgG1-ТМ Abet0380-GL с бета-амилоидными бляшками in vivo через 168 часов после введения дозы в периферический сосуд пожилым мышам Tg2576*

25 IgG1-ТМ Abet0380-GL тестировали в отношении его способности связываться с бета-амилоидными бляшками у пожилых мышей Tg2576 после однократного введения дозы в периферический сосуд. Эксперименты на животных осуществляли согласно соответствующим руководствам и инструкциям, предусмотренным Министерством сельского хозяйства Швеции. Разрешение согласно нормам этики было получено от совета по этике, специализирующегося на экспериментах на животных: Комитет по 30 этике при исследованиях на животных Южного Стокгольма (Stockholm Södra Animal Research Ethical Board).

Самкам мышей Tg2576 возрастом семнадцать месяцев (n=5) вводили однократную дозу среды, антитело положительного контроля из расчета 30 мг/кг или антитело IgG1-ТМ Abet0380-GL из расчета 10 или 30 мг/кг путем внутривенной инъекции со средой 35 для введения дозы из 25 мМ гистидина, 7% сахарозы, 0,02% поверхностно-активного вещества р80, рН 6,0, из расчета 5 мл/кг. Через 168 часов после введения дозы животным вводили сильную анестезию и выполняли перфузию при помощи PBS комнатной температуры, с последующим холодным (4°C) 4% параформальдегидом, забуференным фосфатным буфером (PFA). Затем животных умерщвляли декапитацией и головной 40 мозг иссекали и фиксировали погружением в PFA при 4°C в течение 72 часов. Фиксатор заменяли на PBS, содержащий 0,1% азид натрия, и ткани хранили при 4°C до последующей обработки.

Иммуногистохимию проводили на срезах головного мозга для оценки степени связывания IgG1-ТМ Abet0380-GL с бета-амилоидными бляшками *in vivo*. Вкратце, 45 срезы головного мозга, залитого в парафин, готовили для иммуногистохимии, как описано в разделе 1.9. Выявление IgG1-ТМ Abet0380-GL или антитела положительного контроля, отложенных в паренхиме головного мозга, проводили с применением антитела кролика к IgG1 мыши и вторичного антитела, специфичного к IgG2, от Eptomics. Окраску

осуществляли на роботизированной системе Ventana с применением системы выявления OmniMap (Ventana Medical Systems, США). Для введения *ex vivo* смежные срезы ткани окрашивали *in vitro* с помощью инъецированного антитела IgG1-ТМ Abet0380-GL или антитела положительного контроля до излишества. Вторичные антитела и хромогены

5 были такими же, как упомянутые выше.

Количественную оценку окрашивания проводили слепым методом под оптическим увеличением 10х. Отмечали распределение покрытых бляшек. Интенсивность мечения бляшек оценивали количественно согласно шкале относительной интенсивности от 0 (отсутствует окрашивание бляшек) до 4 (интенсивное покрытие бляшек).

10 IgG1-ТМ Abet0380-GL не покрывало бета-амилоидные бляшки или бляшки при церебральной амилоидной ангиопатии (САА) *in vivo* через 168 часов после введения дозы 10 или 30 мг/кг в периферический сосуд. Антитело положительного контроля демонстрировало от сильного до низкого покрытия бляшек *in vivo*. Паттерн частичного и очагового распределения был различим, в случае плотных бляшек, диффузных бляшек

15 и САА у всех животных. Типичные фотографии показаны на фигуре 17. Введение *ex vivo* в ткани головного мозга от тех же животных IgG1-ТМ Abet0380-GL и антитела положительного контроля подтвердило ранее продемонстрированную способность к связыванию бляшек *ex vivo* у инъецированных антител (не показано).

#### Пример 5. Последовательности антител к A $\beta$ 1-42

20 Примеры последовательностей молекул антител перечислены в прилагаемом перечне последовательностей, в том числе типовые VH-домены, VL-домены, отдельные CDR-последовательности, наборы HCDR, наборы LCDR и каркасные области антител.

Сравнивали последовательности 24 оптимизированных клонов, перечисленных в таблице 7. В таблицах 10 и 11 показан % идентичности последовательности у VH- и VL- доменов, соответственно.

30

35

40

45



**Таблица 10.** Идентичность последовательности по полной V<sub>H</sub>-последовательности (остатки по Kabat 1→113) из двадцати четырех немодифицированных на уровне генов зародышевого типа и пяти модифицированных на уровне генов зародышевого типа антител, описанных в данном документе. Все последовательности находились в пределах 86,4% относительно лидерного клона Abet0380-GL (выделенные значения).

10

15

20

25

30

35

40

45



(остатки по Kabat 1→107) из двадцати четырех немодифицированных на уровне генов зародышевого типа и пяти модифицированных на уровне генов зародышевого типа антител, описанных в данном документе. Все последовательности находились в пределах 88,7% относительно лидерного клона Abet0380-GL (выделенные значения).

5

10

15

20

25

30

35

40

	Номер по Kabat	Abet0380-GL	Другие примеры остатков				
FW1 VH	26	M	G	S			
	27	G	F	D			
	28	N	T	D	H		
	29	F					
	30	N	S	K	P		
CDR1 VH	31	Y	V	R	E	T	
	32	Q	Y	D	S	E	
	33	T	P	I	V		
	34	M					
	35	W					
CDR2 VH	50	V					
	51	I					
	52	G					
	52a	K	S	A			
	53	T	S	N	D	G	Q
	54	N	G	T	P		
	55	E	G	N	K	T	
	56	N	T	R	K		
	57	I	T	K	V		
	58	A	V	T			
	59	Y					
	60	A					
	61	D					
	62	S					
	63	V					
64	K						
65	G						
CDR3 VH	95	E					
	96	W					
	97	M					
	98	D					
	99	H					
	100	S					
	100a	R					
	100b	P					
	100c	Y					
	100d	Y					
	100e	Y					
		Y					
	100g	G					
	100h	M					
	101	D					
102	V						

Таблица 12. Примеры остатков в каждом положении в CDR VH и остатков Вернье.

45

	Номер по Kabat	Abet0380-GL	Другие примеры остатков				
CDR1 VL	24	S					
	25	G					
	26	H					

5		27	N				
		28	L	I			
		29	E	G			
		30	D				
		31	K				
		32	F	W			
		33	A	V			
		34	S				
10	CDR2 VL	50	R				
		51	D				
		52	D				
		53	K				
		54	R				
		55	P				
15	CDR3 VL	89	S	Q			
		90	S	A			
		91	Q				
		92	D				
		93	T	S			
		94	V	T			
		95	T				
		96	R				
20		97	V				

Таблица 13. Примеры остатков в каждом положении в CDR VL.

	Номер по Kabat	0380-GL	Замены в других оптимизированных клонах	
25	FW1 VH	26	M	G, S, V, A, N, T, H
		27	G	F, S, Y, E, D, P
		28	N	Q, H, V, E, T, A, S, D, M, P
		29	F	I, Y, S, L, W
		30	N	S, T, Q, K, H, R, G, P, E, K, A, D
30	CDR1 VH	31	Y	H, K, E, N, T, R, V, P, M, F, I, D, W
		32	Q	Y, D, N, S, E, T
		33	T	P, I, V, A, I
		34	M	L
		35	W	
35	CDR2 VH	50	V	
		51	I	
		52	G	
		52a	K	S, P, A, N, G, E, D, V, T
		53	T	S, N, H, Q, D, G, E
		54	N	G, P, T, Q, E, M, K, A
		55	E	G, K, N, Q, T, H, D, A
		56	N	T, A, R, K
		57	I	T, N, S, K, F, Q, V, L
		58	A	V, S, T, N
		59	Y	
		60	A	
		61	D	
		62	S	A, T
		63	V	
64	K			
65	G			
45	CDR3	95	E	

5	VH	96	W	
		97	M	
		98	D	G
		99	H	R
		100	S	
		100a	R	
		100b	P	
		100c	Y	
		100d	Y	
		100e	Y	
			Y	
		100g	G	
		100h	M	I
		101	D	
		102	V	A

15 **Таблица 14.** Замены, наблюдаемые в CDR VH и FW1 в 24 оптимизированных клонах

	Номер по Kabat	0380-GL	Замены в других оптимизированных клонах
20	CDR1 VL	24	T
		25	T
		26	R, P
		27	H
		28	I, V, F, T
		29	M, G, S, N
		30	A, S, G, H
		31	S
		32	W
		33	V, M, T, I
34	T, A		
30	CDR2 VL	50	
		51	
		52	
		53	
		54	
		55	
56			
35	CDR3 VL	89	Q, A
		90	A, T
		91	
		92	G
		93	Q, S, N, K
		94	T, F
		95	
		96	
97	S, A		

40 **Таблица 15.** Замены, наблюдаемые в CDR VL у 24 оптимизированных клонов

**Таблица 16.** Соответствие между последовательностями антитела, упомянутыми в данном документе, и последовательностями в перечне последовательностей в конце этого документа.

45	1	Abet0007	VH ДНК
	2	Abet0007	VH БЕЛОК
	3	Abet0007	CDR1 БЕЛОК
	4	Abet0007	CDR2 БЕЛОК
	5	Abet0007	CDR3 БЕЛОК



	6	Abet0007	FW1 БЕЛОК
	7	Abet0007	FW2 БЕЛОК
	8	Abet0007	FW3 БЕЛОК
	9	Abet0007	FW4 БЕЛОК
5	10	Abet0007	VL ДНК
	11	Abet0007	VL БЕЛОК
	12	Abet0007	CDR1 БЕЛОК
	13	Abet0007	CDR2 БЕЛОК
	14	Abet0007	CDR3 БЕЛОК
	15	Abet0007	FW1 БЕЛОК
10	16	Abet0007	FW2 БЕЛОК
	17	Abet0007	FW3 БЕЛОК
	18	Abet0007	FW4 БЕЛОК
	19	Abet0144-GL	VH ДНК
	20	Abet0144-GL	VH БЕЛОК
	21	Abet0144-GL	CDR1 БЕЛОК
15	22	Abet0144-GL	CDR2 БЕЛОК
	23	Abet0144-GL	CDR3 БЕЛОК
	24	Abet0144-GL	FW1 БЕЛОК
	25	Abet0144-GL	FW2 БЕЛОК
	26	Abet0144-GL	FW3 БЕЛОК
	27	Abet0144-GL	FW4 БЕЛОК
20	28	Abet0144-GL	VL ДНК
	29	Abet0144-GL	VL БЕЛОК
	30	Abet0144-GL	CDR1 БЕЛОК
	31	Abet0144-GL	CDR2 БЕЛОК
	32	Abet0144-GL	CDR3 БЕЛОК
	33	Abet0144-GL	FW1 БЕЛОК
25	34	Abet0144-GL	FW2 БЕЛОК
	35	Abet0144-GL	FW3 БЕЛОК
	36	Abet0144-GL	FW4 БЕЛОК
	37	Abet0319	VH ДНК
	38	Abet0319	VH БЕЛОК
	39	Abet0319	CDR1 БЕЛОК
30	40	Abet0319	CDR2 БЕЛОК
	41	Abet0319	CDR3 БЕЛОК
	42	Abet0319	FW1 БЕЛОК
	43	Abet0319	FW2 БЕЛОК
	44	Abet0319	FW3 БЕЛОК
	45	Abet0319	FW4 БЕЛОК
35	46	Abet0319	VL ДНК
	47	Abet0319	VL БЕЛОК
	48	Abet0319	CDR1 БЕЛОК
	49	Abet0319	CDR2 БЕЛОК
	50	Abet0319	CDR3 БЕЛОК
	51	Abet0319	FW1 БЕЛОК
40	52	Abet0319	FW2 БЕЛОК
	53	Abet0319	FW3 БЕЛОК
	54	Abet0319	FW4 БЕЛОК
	55	Abet0321b	VH ДНК
	56	Abet0321b	VH БЕЛОК
45	57	Abet0321b	CDR1 БЕЛОК
	58	Abet0321b	CDR2 БЕЛОК
	59	Abet0321b	CDR3 БЕЛОК
	60	Abet0321b	FW1 БЕЛОК
	61	Abet0321b	FW2 БЕЛОК
	62	Abet0321b	FW3 БЕЛОК

	63	Abet0321b	FW4 БЕЛОК
	64	Abet0321b	VL ДНК
	65	Abet0321b	VL БЕЛОК
	66	Abet0321b	CDR1 БЕЛОК
5	67	Abet0321b	CDR2 БЕЛОК
	68	Abet0321b	CDR3 БЕЛОК
	69	Abet0321b	FW1 БЕЛОК
	70	Abet0321b	FW2 БЕЛОК
	71	Abet0321b	FW3 БЕЛОК
	72	Abet0321b	FW4 БЕЛОК
10	73	Abet0322b	VH ДНК
	74	Abet0322b	VH БЕЛОК
	75	Abet0322b	CDR1 БЕЛОК
	76	Abet0322b	CDR2 БЕЛОК
	77	Abet0322b	CDR3 БЕЛОК
	78	Abet0322b	FW1 БЕЛОК
15	79	Abet0322b	FW2 БЕЛОК
	80	Abet0322b	FW3 БЕЛОК
	81	Abet0322b	FW4 БЕЛОК
	82	Abet0322b	VL ДНК
	83	Abet0322b	VL БЕЛОК
	84	Abet0322b	CDR1 БЕЛОК
20	85	Abet0322b	CDR2 БЕЛОК
	86	Abet0322b	CDR3 БЕЛОК
	87	Abet0322b	FW1 БЕЛОК
	88	Abet0322b	FW2 БЕЛОК
	89	Abet0322b	FW3 БЕЛОК
25	90	Abet0322b	FW4 БЕЛОК
	91	Abet0323b	VH ДНК
	92	Abet0323b	VH БЕЛОК
	93	Abet0323b	CDR1 БЕЛОК
	94	Abet0323b	CDR2 БЕЛОК
	95	Abet0323b	CDR3 БЕЛОК
30	96	Abet0323b	FW1 БЕЛОК
	97	Abet0323b	FW2 БЕЛОК
	98	Abet0323b	FW3 БЕЛОК
	99	Abet0323b	FW4 БЕЛОК
	100	Abet0323b	VL ДНК
	101	Abet0323b	VL БЕЛОК
35	102	Abet0323b	CDR1 БЕЛОК
	103	Abet0323b	CDR2 БЕЛОК
	104	Abet0323b	CDR3 БЕЛОК
	105	Abet0323b	FW1 БЕЛОК
	106	Abet0323b	FW2 БЕЛОК
	107	Abet0323b	FW3 БЕЛОК
40	108	Abet0323b	FW4 БЕЛОК
	109	Abet0328	VH ДНК
	110	Abet0328	VH БЕЛОК
	111	Abet0328	CDR1 БЕЛОК
	112	Abet0328	CDR2 БЕЛОК
	113	Abet0328	CDR3 БЕЛОК
45	114	Abet0328	FW1 БЕЛОК
	115	Abet0328	FW2 БЕЛОК
	116	Abet0328	FW3 БЕЛОК
	117	Abet0328	FW4 БЕЛОК
	118	Abet0328	VL ДНК
	119	Abet0328	VL БЕЛОК

	120	Abet0328	CDR1 БЕЛОК
	121	Abet0328	CDR2 БЕЛОК
	122	Abet0328	CDR3 БЕЛОК
	123	Abet0328	FW1 БЕЛОК
5	124	Abet0328	FW2 БЕЛОК
	125	Abet0328	FW3 БЕЛОК
	126	Abet0328	FW4 БЕЛОК
	127	Abet0329	VH ДНК
	128	Abet0329	VH БЕЛОК
10	129	Abet0329	CDR1 БЕЛОК
	130	Abet0329	CDR2 БЕЛОК
	131	Abet0329	CDR3 БЕЛОК
	132	Abet0329	FW1 БЕЛОК
	133	Abet0329	FW2 БЕЛОК
	134	Abet0329	FW3 БЕЛОК
15	135	Abet0329	FW4 БЕЛОК
	136	Abet0329	VL ДНК
	137	Abet0329	VL БЕЛОК
	138	Abet0329	CDR1 БЕЛОК
	139	Abet0329	CDR2 БЕЛОК
	140	Abet0329	CDR3 БЕЛОК
20	141	Abet0329	FW1 БЕЛОК
	142	Abet0329	FW2 БЕЛОК
	143	Abet0329	FW3 БЕЛОК
	144	Abet0329	FW4 БЕЛОК
	145	Abet0332	VH ДНК
	146	Abet0332	VH БЕЛОК
25	147	Abet0332	CDR1 БЕЛОК
	148	Abet0332	CDR2 БЕЛОК
	149	Abet0332	CDR3 БЕЛОК
	150	Abet0332	FW1 БЕЛОК
	151	Abet0332	FW2 БЕЛОК
	152	Abet0332	FW3 БЕЛОК
30	153	Abet0332	FW4 БЕЛОК
	154	Abet0332	VL ДНК
	155	Abet0332	VL БЕЛОК
	156	Abet0332	CDR1 БЕЛОК
	157	Abet0332	CDR2 БЕЛОК
	158	Abet0332	CDR3 БЕЛОК
35	159	Abet0332	FW1 БЕЛОК
	160	Abet0332	FW2 БЕЛОК
	161	Abet0332	FW3 БЕЛОК
	162	Abet0332	FW4 БЕЛОК
	163	Abet0342	VH ДНК
	164	Abet0342	VH БЕЛОК
40	165	Abet0342	CDR1 БЕЛОК
	166	Abet0342	CDR2 БЕЛОК
	167	Abet0342	CDR3 БЕЛОК
	168	Abet0342	FW1 БЕЛОК
	169	Abet0342	FW2 БЕЛОК
	170	Abet0342	FW3 БЕЛОК
45	171	Abet0342	FW4 БЕЛОК
	172	Abet0342	VL ДНК
	173	Abet0342	VL БЕЛОК
	174	Abet0342	CDR1 БЕЛОК
	175	Abet0342	CDR2 БЕЛОК
	176	Abet0342	CDR3 БЕЛОК

	177	Abet0342	FW1 БЕЛОК
	178	Abet0342	FW2 БЕЛОК
	179	Abet0342	FW3 БЕЛОК
	180	Abet0342	FW4 БЕЛОК
5	181	Abet0343	VH ДНК
	182	Abet0343	VH БЕЛОК
	183	Abet0343	CDR1 БЕЛОК
	184	Abet0343	CDR2 БЕЛОК
	185	Abet0343	CDR3 БЕЛОК
10	186	Abet0343	FW1 БЕЛОК
	187	Abet0343	FW2 БЕЛОК
	188	Abet0343	FW3 БЕЛОК
	189	Abet0343	FW4 БЕЛОК
	190	Abet0343	VL ДНК
	191	Abet0343	VL БЕЛОК
15	192	Abet0343	CDR1 БЕЛОК
	193	Abet0343	CDR2 БЕЛОК
	194	Abet0343	CDR3 БЕЛОК
	195	Abet0343	FW1 БЕЛОК
	196	Abet0343	FW2 БЕЛОК
	197	Abet0343	FW3 БЕЛОК
	198	Abet0343	FW4 БЕЛОК
20	199	Abet0344	VH ДНК
	200	Abet0344	VH БЕЛОК
	201	Abet0344	CDR1 БЕЛОК
	202	Abet0344	CDR2 БЕЛОК
	203	Abet0344	CDR3 БЕЛОК
25	204	Abet0344	FW1 БЕЛОК
	205	Abet0344	FW2 БЕЛОК
	206	Abet0344	FW3 БЕЛОК
	207	Abet0344	FW4 БЕЛОК
	208	Abet0344	VL ДНК
	209	Abet0344	VL БЕЛОК
30	210	Abet0344	CDR1 БЕЛОК
	211	Abet0344	CDR2 БЕЛОК
	212	Abet0344	CDR3 БЕЛОК
	213	Abet0344	FW1 БЕЛОК
	214	Abet0344	FW2 БЕЛОК
	215	Abet0344	FW3 БЕЛОК
35	216	Abet0344	FW4 БЕЛОК
	217	Abet0368	VH ДНК
	218	Abet0368	VH БЕЛОК
	219	Abet0368	CDR1 БЕЛОК
	220	Abet0368	CDR2 БЕЛОК
	221	Abet0368	CDR3 БЕЛОК
40	222	Abet0368	FW1 БЕЛОК
	223	Abet0368	FW2 БЕЛОК
	224	Abet0368	FW3 БЕЛОК
	225	Abet0368	FW4 БЕЛОК
	226	Abet0368	VL ДНК
	227	Abet0368	VL БЕЛОК
45	228	Abet0368	CDR1 БЕЛОК
	229	Abet0368	CDR2 БЕЛОК
	230	Abet0368	CDR3 БЕЛОК
	231	Abet0368	FW1 БЕЛОК
	232	Abet0368	FW2 БЕЛОК
	233	Abet0368	FW3 БЕЛОК

	234	Abet0368	FW4 БЕЛОК
	235	Abet0369	VH ДНК
	236	Abet0369	VH БЕЛОК
	237	Abet0369	CDR1 БЕЛОК
5	238	Abet0369	CDR2 БЕЛОК
	239	Abet0369	CDR3 БЕЛОК
	240	Abet0369	FW1 БЕЛОК
	241	Abet0369	FW2 БЕЛОК
	242	Abet0369	FW3 БЕЛОК
	243	Abet0369	FW4 БЕЛОК
10	244	Abet0369	VL ДНК
	245	Abet0369	VL БЕЛОК
	246	Abet0369	CDR1 БЕЛОК
	247	Abet0369	CDR2 БЕЛОК
	248	Abet0369	CDR3 БЕЛОК
	249	Abet0369	FW1 БЕЛОК
15	250	Abet0369	FW2 БЕЛОК
	251	Abet0369	FW3 БЕЛОК
	252	Abet0369	FW4 БЕЛОК
	253	Abet0370	VH ДНК
	254	Abet0370	VH БЕЛОК
	255	Abet0370	CDR1 БЕЛОК
20	256	Abet0370	CDR2 БЕЛОК
	257	Abet0370	CDR3 БЕЛОК
	258	Abet0370	FW1 БЕЛОК
	259	Abet0370	FW2 БЕЛОК
	260	Abet0370	FW3 БЕЛОК
25	261	Abet0370	FW4 БЕЛОК
	262	Abet0370	VL ДНК
	263	Abet0370	VL БЕЛОК
	264	Abet0370	CDR1 БЕЛОК
	265	Abet0370	CDR2 БЕЛОК
	266	Abet0370	CDR3 БЕЛОК
	267	Abet0370	FW1 БЕЛОК
30	268	Abet0370	FW2 БЕЛОК
	269	Abet0370	FW3 БЕЛОК
	270	Abet0370	FW4 БЕЛОК
	271	Abet0371	VH ДНК
	272	Abet0371	VH БЕЛОК
	273	Abet0371	CDR1 БЕЛОК
35	274	Abet0371	CDR2 БЕЛОК
	275	Abet0371	CDR3 БЕЛОК
	276	Abet0371	FW1 БЕЛОК
	277	Abet0371	FW2 БЕЛОК
	278	Abet0371	FW3 БЕЛОК
	279	Abet0371	FW4 БЕЛОК
40	280	Abet0371	VL ДНК
	281	Abet0371	VL БЕЛОК
	282	Abet0371	CDR1 БЕЛОК
	283	Abet0371	CDR2 БЕЛОК
	284	Abet0371	CDR3 БЕЛОК
45	285	Abet0371	FW1 БЕЛОК
	286	Abet0371	FW2 БЕЛОК
	287	Abet0371	FW3 БЕЛОК
	288	Abet0371	FW4 БЕЛОК
	289	Abet0372	VH ДНК
	290	Abet0372	VH БЕЛОК

	291	Abet0372	CDR1 БЕЛОК
	292	Abet0372	CDR2 БЕЛОК
	293	Abet0372	CDR3 БЕЛОК
	294	Abet0372	FW1 БЕЛОК
5	295	Abet0372	FW2 БЕЛОК
	296	Abet0372	FW3 БЕЛОК
	297	Abet0372	FW4 БЕЛОК
	298	Abet0372	VL ДНК
	299	Abet0372	VL БЕЛОК
	300	Abet0372	CDR1 БЕЛОК
10	301	Abet0372	CDR2 БЕЛОК
	302	Abet0372	CDR3 БЕЛОК
	303	Abet0372	FW1 БЕЛОК
	304	Abet0372	FW2 БЕЛОК
	305	Abet0372	FW3 БЕЛОК
	306	Abet0372	FW4 БЕЛОК
15	307	Abet0373	VH ДНК
	308	Abet0373	VH БЕЛОК
	309	Abet0373	CDR1 БЕЛОК
	310	Abet0373	CDR2 БЕЛОК
	311	Abet0373	CDR3 БЕЛОК
	312	Abet0373	FW1 БЕЛОК
20	313	Abet0373	FW2 БЕЛОК
	314	Abet0373	FW3 БЕЛОК
	315	Abet0373	FW4 БЕЛОК
	316	Abet0373	VL ДНК
	317	Abet0373	VL БЕЛОК
	318	Abet0373	CDR1 БЕЛОК
25	319	Abet0373	CDR2 БЕЛОК
	320	Abet0373	CDR3 БЕЛОК
	321	Abet0373	FW1 БЕЛОК
	322	Abet0373	FW2 БЕЛОК
	323	Abet0373	FW3 БЕЛОК
	324	Abet0373	FW4 БЕЛОК
30	325	Abet0374	VH ДНК
	326	Abet0374	VH БЕЛОК
	327	Abet0374	CDR1 БЕЛОК
	328	Abet0374	CDR2 БЕЛОК
	329	Abet0374	CDR3 БЕЛОК
	330	Abet0374	FW1 БЕЛОК
35	331	Abet0374	FW2 БЕЛОК
	332	Abet0374	FW3 БЕЛОК
	333	Abet0374	FW4 БЕЛОК
	334	Abet0374	VL ДНК
	335	Abet0374	VL БЕЛОК
	336	Abet0374	CDR1 БЕЛОК
40	337	Abet0374	CDR2 БЕЛОК
	338	Abet0374	CDR3 БЕЛОК
	339	Abet0374	FW1 БЕЛОК
	340	Abet0374	FW2 БЕЛОК
	341	Abet0374	FW3 БЕЛОК
	342	Abet0374	FW4 БЕЛОК
45	343	Abet0377	VH ДНК
	344	Abet0377	VH БЕЛОК
	345	Abet0377	CDR1 БЕЛОК
	346	Abet0377	CDR2 БЕЛОК
	347	Abet0377	CDR3 БЕЛОК

	348	Abet0377	FW1 БЕЛОК
	349	Abet0377	FW2 БЕЛОК
	350	Abet0377	FW3 БЕЛОК
	351	Abet0377	FW4 БЕЛОК
5	352	Abet0377	VL ДНК
	353	Abet0377	VL БЕЛОК
	354	Abet0377	CDR1 БЕЛОК
	355	Abet0377	CDR2 БЕЛОК
	356	Abet0377	CDR3 БЕЛОК
10	357	Abet0377	FW1 БЕЛОК
	358	Abet0377	FW2 БЕЛОК
	359	Abet0377	FW3 БЕЛОК
	360	Abet0377	FW4 БЕЛОК
	361	Abet0378	VH ДНК
	362	Abet0378	VH БЕЛОК
15	363	Abet0378	CDR1 БЕЛОК
	364	Abet0378	CDR2 БЕЛОК
	365	Abet0378	CDR3 БЕЛОК
	366	Abet0378	FW1 БЕЛОК
	367	Abet0378	FW2 БЕЛОК
	368	Abet0378	FW3 БЕЛОК
	369	Abet0378	FW4 БЕЛОК
20	370	Abet0378	VL ДНК
	371	Abet0378	VL БЕЛОК
	372	Abet0378	CDR1 БЕЛОК
	373	Abet0378	CDR2 БЕЛОК
	374	Abet0378	CDR3 БЕЛОК
25	375	Abet0378	FW1 БЕЛОК
	376	Abet0378	FW2 БЕЛОК
	377	Abet0378	FW3 БЕЛОК
	378	Abet0378	FW4 БЕЛОК
	379	Abet0379	VH ДНК
	380	Abet0379	VH БЕЛОК
30	381	Abet0379	CDR1 БЕЛОК
	382	Abet0379	CDR2 БЕЛОК
	383	Abet0379	CDR3 БЕЛОК
	384	Abet0379	FW1 БЕЛОК
	385	Abet0379	FW2 БЕЛОК
	386	Abet0379	FW3 БЕЛОК
35	387	Abet0379	FW4 БЕЛОК
	388	Abet0379	VL ДНК
	389	Abet0379	VL БЕЛОК
	390	Abet0379	CDR1 БЕЛОК
	391	Abet0379	CDR2 БЕЛОК
	392	Abet0379	CDR3 БЕЛОК
40	393	Abet0379	FW1 БЕЛОК
	394	Abet0379	FW2 БЕЛОК
	395	Abet0379	FW3 БЕЛОК
	396	Abet0379	FW4 БЕЛОК
	397	Abet0380	VH ДНК
	398	Abet0380	VH БЕЛОК
45	399	Abet0380	CDR1 БЕЛОК
	400	Abet0380	CDR2 БЕЛОК
	401	Abet0380	CDR3 БЕЛОК
	402	Abet0380	FW1 БЕЛОК
	403	Abet0380	FW2 БЕЛОК
	404	Abet0380	FW3 БЕЛОК

	405	Abet0380	FW4 БЕЛОК
	406	Abet0380	VL ДНК
	407	Abet0380	VL БЕЛОК
	408	Abet0380	CDR1 БЕЛОК
5	409	Abet0380	CDR2 БЕЛОК
	410	Abet0380	CDR3 БЕЛОК
	411	Abet0380	FW1 БЕЛОК
	412	Abet0380	FW2 БЕЛОК
	413	Abet0380	FW3 БЕЛОК
	414	Abet0380	FW4 БЕЛОК
10	415	Abet0381	VH ДНК
	416	Abet0381	VH БЕЛОК
	417	Abet0381	CDR1 БЕЛОК
	418	Abet0381	CDR2 БЕЛОК
	419	Abet0381	CDR3 БЕЛОК
	420	Abet0381	FW1 БЕЛОК
15	421	Abet0381	FW2 БЕЛОК
	422	Abet0381	FW3 БЕЛОК
	423	Abet0381	FW4 БЕЛОК
	424	Abet0381	VL ДНК
	425	Abet0381	VL БЕЛОК
	426	Abet0381	CDR1 БЕЛОК
20	427	Abet0381	CDR2 БЕЛОК
	428	Abet0381	CDR3 БЕЛОК
	429	Abet0381	FW1 БЕЛОК
	430	Abet0381	FW2 БЕЛОК
	431	Abet0381	FW3 БЕЛОК
	432	Abet0381	FW4 БЕЛОК
25	433	Abet0382	VH ДНК
	434	Abet0382	VH БЕЛОК
	435	Abet0382	CDR1 БЕЛОК
	436	Abet0382	CDR2 БЕЛОК
	437	Abet0382	CDR3 БЕЛОК
	438	Abet0382	FW1 БЕЛОК
30	439	Abet0382	FW2 БЕЛОК
	440	Abet0382	FW3 БЕЛОК
	441	Abet0382	FW4 БЕЛОК
	442	Abet0382	VL ДНК
	443	Abet0382	VL БЕЛОК
	444	Abet0382	CDR1 БЕЛОК
35	445	Abet0382	CDR2 БЕЛОК
	446	Abet0382	CDR3 БЕЛОК
	447	Abet0382	FW1 БЕЛОК
	448	Abet0382	FW2 БЕЛОК
	449	Abet0382	FW3 БЕЛОК
	450	Abet0382	FW4 БЕЛОК
40	451	Abet0383	VH ДНК
	452	Abet0383	VH БЕЛОК
	453	Abet0383	CDR1 БЕЛОК
	454	Abet0383	CDR2 БЕЛОК
	455	Abet0383	CDR3 БЕЛОК
45	456	Abet0383	FW1 БЕЛОК
	457	Abet0383	FW2 БЕЛОК
	458	Abet0383	FW3 БЕЛОК
	459	Abet0383	FW4 БЕЛОК
	460	Abet0383	VL ДНК
	461	Abet0383	VL БЕЛОК



	462	Abet0383	CDR1 БЕЛОК
	463	Abet0383	CDR2 БЕЛОК
	464	Abet0383	CDR3 БЕЛОК
	465	Abet0383	FW1 БЕЛОК
5	466	Abet0383	FW2 БЕЛОК
	467	Abet0383	FW3 БЕЛОК
	468	Abet0383	FW4 БЕЛОК
	469	Abet0343-GL	VH ДНК
	470	Abet0343-GL	VH БЕЛОК
	471	Abet0343-GL	CDR1 БЕЛОК
10	472	Abet0343-GL	CDR2 БЕЛОК
	473	Abet0343-GL	CDR3 БЕЛОК
	474	Abet0343-GL	FW1 БЕЛОК
	475	Abet0343-GL	FW2 БЕЛОК
	476	Abet0343-GL	FW3 БЕЛОК
	477	Abet0343-GL	FW4 БЕЛОК
15	478	Abet0343-GL	VL ДНК
	479	Abet0343-GL	VL БЕЛОК
	480	Abet0343-GL	CDR1 БЕЛОК
	481	Abet0343-GL	CDR2 БЕЛОК
	482	Abet0343-GL	CDR3 БЕЛОК
	483	Abet0343-GL	FW1 БЕЛОК
20	484	Abet0343-GL	FW2 БЕЛОК
	485	Abet0343-GL	FW3 БЕЛОК
	486	Abet0343-GL	FW4 БЕЛОК
	487	Abet0369-GL	VH ДНК
	488	Abet0369-GL	VH БЕЛОК
	489	Abet0369-GL	CDR1 БЕЛОК
25	490	Abet0369-GL	CDR2 БЕЛОК
	491	Abet0369-GL	CDR3 БЕЛОК
	492	Abet0369-GL	FW1 БЕЛОК
	493	Abet0369-GL	FW2 БЕЛОК
	494	Abet0369-GL	FW3 БЕЛОК
	495	Abet0369-GL	FW4 БЕЛОК
30	496	Abet0369-GL	VL ДНК
	497	Abet0369-GL	VL БЕЛОК
	498	Abet0369-GL	CDR1 БЕЛОК
	499	Abet0369-GL	CDR2 БЕЛОК
	500	Abet0369-GL	CDR3 БЕЛОК
	501	Abet0369-GL	FW1 БЕЛОК
35	502	Abet0369-GL	FW2 БЕЛОК
	503	Abet0369-GL	FW3 БЕЛОК
	504	Abet0369-GL	FW4 БЕЛОК
	505	Abet0377-GL	VH ДНК
	506	Abet0377-GL	VH БЕЛОК
	507	Abet0377-GL	CDR1 БЕЛОК
40	508	Abet0377-GL	CDR2 БЕЛОК
	509	Abet0377-GL	CDR3 БЕЛОК
	510	Abet0377-GL	FW1 БЕЛОК
	511	Abet0377-GL	FW2 БЕЛОК
	512	Abet0377-GL	FW3 БЕЛОК
45	513	Abet0377-GL	FW4 БЕЛОК
	514	Abet0377-GL	VL ДНК
	515	Abet0377-GL	VL БЕЛОК
	516	Abet0377-GL	CDR1 БЕЛОК
	517	Abet0377-GL	CDR2 БЕЛОК
	518	Abet0377-GL	CDR3 БЕЛОК

	519	Abet0377-GL	FW1 БЕЛОК
	520	Abet0377-GL	FW2 БЕЛОК
	521	Abet0377-GL	FW3 БЕЛОК
	522	Abet0377-GL	FW4 БЕЛОК
5	523	Abet0380-GL	VH ДНК
	524	Abet0380-GL	VH БЕЛОК
	525	Abet0380-GL	CDR1 БЕЛОК
	526	Abet0380-GL	CDR2 БЕЛОК
	527	Abet0380-GL	CDR3 БЕЛОК
	528	Abet0380-GL	FW1 БЕЛОК
10	529	Abet0380-GL	FW2 БЕЛОК
	530	Abet0380-GL	FW3 БЕЛОК
	531	Abet0380-GL	FW4 БЕЛОК
	532	Abet0380-GL	VL ДНК
	533	Abet0380-GL	VL БЕЛОК
	534	Abet0380-GL	CDR1 БЕЛОК
15	535	Abet0380-GL	CDR2 БЕЛОК
	536	Abet0380-GL	CDR3 БЕЛОК
	537	Abet0380-GL	FW1 БЕЛОК
	538	Abet0380-GL	FW2 БЕЛОК
	539	Abet0380-GL	FW3 БЕЛОК
	540	Abet0380-GL	FW4 БЕЛОК
20	541	Abet0382-GL	VH ДНК
	542	Abet0382-GL	VH БЕЛОК
	543	Abet0382-GL	CDR1 БЕЛОК
	544	Abet0382-GL	CDR2 БЕЛОК
	545	Abet0382-GL	CDR3 БЕЛОК
	546	Abet0382-GL	FW1 БЕЛОК
25	547	Abet0382-GL	FW2 БЕЛОК
	548	Abet0382-GL	FW3 БЕЛОК
	549	Abet0382-GL	FW4 БЕЛОК
	550	Abet0382-GL	VL ДНК
	551	Abet0382-GL	VL БЕЛОК
	552	Abet0382-GL	CDR1 БЕЛОК
30	553	Abet0382-GL	CDR2 БЕЛОК
	554	Abet0382-GL	CDR3 БЕЛОК
	555	Abet0382-GL	FW1 БЕЛОК
	556	Abet0382-GL	FW2 БЕЛОК
	557	Abet0382-GL	FW3 БЕЛОК
35	558	Abet0382-GL	FW4 БЕЛОК

***Пример 6. Специфичность IgG1-ТМ Abet0380-GL в экспериментах по конкурентному СВЯЗЫВАНИЮ***

Специфичность IgG1-ТМ Abet0380-GL проверяли в экспериментах по конкурентному связыванию. Вкратце, IgG1-ТМ Abet0380-GL (0,5 нМ) инкубировали (в течение 1 часа при комнатной температуре) с панелью из человеческих Abeta пептидов полной длины, усечений и пиро-пептидов (Abeta 1-42, Abeta 1-43, Abeta 1-16, Abeta 12-28, Abeta 17-42, Abeta пиро-3-42 или Abeta пиро-11-42), имеющих диапазон различных концентраций (от 10 мкМ с понижением до 0,17 нМ).

После инкубации между IgG1-ТМ Abet0380-GL и Abeta пептидами, добавляли Abeta 1-42 (1,5 нМ) с биотином N-конце, а затем антитело к Fc человека, меченное криптоатом европия (0,8 нМ) (CisBio № по кат. 61HFCKLB) и стрептавидин-XL<sup>ent</sup> (5 нМ) (CisBio № по кат. 611SAXLB). Затем анализ инкубировали в течение дополнительных 2 часов при комнатной температуре перед считыванием на планшет-ридере EnVision (PerkinElmer)

с применением стандартного протокола считывания гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF). В отсутствие конкуренции взаимодействие Abeta 1-42 с биотином N-конце с IgG1-ТМ Abet0380-GL (в комплексе со стрептавидином-XL<sup>ent1</sup> и антителом к Fc человека, меченным криптатом европия, соответственно) можно было затем измерять посредством резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением (TR-FRET) из-за непосредственной близости донора криптата европия и акцепторных флуорофоров XL<sup>665</sup>. Конкуренция IgG1-ТМ Abet0380-GL: взаимодействие Abeta 1-42 с биотином N-конце с тестируемыми пептидами, следовательно, приводило к снижению сигнала анализа. Результаты выражали как % специфического связывания, где 100% специфического связывания получали на основании лунок, содержащих стрептавидин-XL<sup>ent1</sup> (5 нМ), Abeta 1-42 с биотином N-конце (1,5 нМ), IgG1-ТМ Abet0380-GL (0,5 нМ) и антитело к Fc человека, меченное криптатом европия (0,8 нМ). 0% специфического связывания получали на основании лунок, в которых IgG1-ТМ Abet0380-GL не вносили.

Конечный объем анализа составлял 20 мкл и все реагенты готовили в буфере для анализа, содержащем MOPS, pH 7,4 (50 мМ), фторид калия (0,4 М), tween 20 (0,1%) и BSA, не содержащий жирных кислот (0,1%). Анализ осуществляли в 384-луночных планшетах для анализа с черными лунками малого объема (Costar 3676).

И наконец, ингибирование IgG1-ТМ Abet0380-GL: связывание Abeta 1-42 с N-концевым биотином наблюдали в случае Abeta 1-42, Abeta 1-43, Abeta 17-42, Abeta пиро-3-42 и Abeta пиро-11-42 со значениями IC<sub>50</sub>, варьирующими в диапазоне от 10<sup>-8</sup> до 10<sup>-9</sup> М для этой группы. Отсутствие ингибирования IgG1-ТМ Abet0380-GL: связывание с Abeta 1-42 с N-концевым биотином наблюдали в случае Abeta 1-16 или Abeta 12-28 (фигура 18).

*Пример 7. Способность антитела Abet0144-GL удалять бета-амилоид 1-42 в РК-PD исследовании на нормальных крысах*

Способность антитела Abet0144-GL к удалению бета-амилоида 1-42 изучали в РК-PD исследовании на нормальных крысах. Крысам внутривенно вводили Abet0144-GL (10 или 40 мг/кг) или среду еженедельно в течение 2 недель (в дни 0 и 7), и умерщвляли через неделю после 2 дозы. Отбирали образцы CSF для измерения свободного и общего бета-амилоида 1-42 и отбирали образцы головного мозга для измерения общего бета-амилоида 1-42. Уровни свободного и общего бета-амилоида 1-42 измеряли с применением анализов, описанных выше.

Как показано на фигуре 19, уровень свободного бета-амилоида 1-42 в CSF незначительно изменялся под действием либо 10, либо 40 мг/кг Abet0144-GL (повышение на 5 и 18%, соответственно, при сравнении со средой). Уровень общего бета-амилоида 1-42 в CSF значительно повышался на 38% при 10 мг/кг, и на 139% при 40 мг/кг. Уровень общего бета-амилоида 1-42 в ткани головного мозга также значительно повышался, на 16% и 50% при 10 и 40 мг/кг, соответственно. Подводя итог, данные из этого исследования на нормальных крысах продемонстрировали, что Abet0144-GL не оказывал значительного влияния на уровни свободного бета-амилоида 1-42 в CSF, и в то же время повышал уровни общего бета-амилоида 1-42 как в CSF, так и в головном мозге. Это был профиль, который, как можно было ожидать, характерен для антитела с аффинностью в отношении мишени в диапазоне десятков нМ.

*Список литературы*

Bannister, D., Wilson, A., Prowse, L., Walsh, M., Holgate, R., Jermutus, L. and Wilkinson, T. (2006). Parallel, high-throughput purification of recombinant antibodies for in vivo cell assays. *Biotechnol. Bioeng.*94, 931-937.

- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R. L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D. and Yednock, T. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.*6, 916-919.
- Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C. M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H. H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A. I., Gandy, S. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L., Younkin, S. G. and Sisodia, S. S. (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*17, 1005-1013.
- Citron, M., Eckman, C. B., Diehl, T. S., Corcoran, C., Ostaszewski, B. L., Xia, W., Levesque, G., St George Hyslop, P., Younkin, S. G. and Selkoe, D. J. (1998). Additive effects of PS1 and APP mutations on secretion of the 42-residue amyloid beta-protein. *Neurobiol. Dis.*5, 107-116.
- Clackson, T. and Lowman, H. B. (2004). *Phage display: a practical approach*, Oxford University Press.
- De Strooper, B. (2007). Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep.*8, 141-146.
- DeMattos, R. B., Bales, K. R., Cummins, D. J., Dodart, J. C., Paul, S. M. and Holtzman, D. M. (2001). Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*98, 8850-8855.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C. M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M. N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J. and Younkin, S. (1996). Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*383, 710-713.
- Foote, J. and Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J. Mol. Biol.*224, 487-499.
- Gilman, S., Koller, M., Black, R. S., Jenkins, L., Griffith, S. G., Fox, N. C., Eisner, L., Kirby, L., Rovira, M. B., Forette, F. and Orgogozo, J. M. (2005). Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*64, 1553-1562.
- Glabe, C. (2000). Does Alzheimer disease tilt the scales of amyloid degradation versus accumulation? *Nat. Med.*6, 133-134.
- Golde, T. E., Das, P. and Levites, Y. (2009). Quantitative and Mechanistic Studies of Ab Immunotherapy. *CNS & Neuro. Dis. - Drug Targets* 8, 31-49
- Greeve, I., Kretschmar, D., Tschape, J. A., Beyn, A., Brellinger, C., Schweizer, M., Nitsch, R. M. and Reifegerste, R. (2004). Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila*. *J. Neurosci.*24, 3899-3906.
- Groves, M. A. and Osbourn, J. K. (2005). Applications of ribosome display to antibody drug discovery. *Expert Opin. Biol. Ther.*5, 125-135.
- Hanes, J., Jermutus, L. and Pluckthun, A. (2000). Selecting and evolving functional proteins in vitro by ribosome display. *Methods Enzymol.*328, 404-430.
- Hanes, J. and Pluckthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*94, 4937-4942.
- Hawkins, R. E., Russell, S. J. and Winter, G. (1992). Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.*226, 889-896.
- Hoet, R. M., Cohen, E. H., Kent, R. B., Rookey, K., Schoonbroodt, S., Hogan, S., Rem, L., Frans, N., Daukandt, M., Pieters, H., van Hegelsom, R., Neer, N. C., Nastri, H. G., Rondon, I. J.,

Leeds, J. A., Hufton, S. E., Huang, L., Kashin, I., Devlin, M., Kuang, G., Steukers, M., Viswanathan, M., Nixon, A. E., Sexton, D. J., Hoogenboom, H. R. and Ladner, R. C. (2005). Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. *Nat. Biotechnol.***23**, 344-348.

5 Iijima, K., Liu, H. P., Chiang, A. S., Hearn, S. A., Konsolaki, M. and Zhong, Y. (2004). Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA***101**, 6623-6628.

Karlsson, R., Michaelsson, A. and Mattsson, L. (1991). Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J. Immunol Methods***145**, 229-240.

Kuperstein, I., Broersen, K., Benilova, I., Rozenski, J., Jonckheere, W., Debulpaep, M., Vandersteen, A., Segers-Nolten, I., Van Der Werf, K., Subramaniam, V., Braeken, D., Callewaert, G., Bartic, C., D'Hooge, R., Martins, I. C., Rousseau, F., Schymkowitz, J. and De Strooper, B. (2010). Neurotoxicity of Alzheimer's disease Abeta peptides is induced by small changes in the  
15 Abeta42 to Abeta40 ratio. *EMBO J.***29**, 3408-3420.

Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A. and Klein, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA***95**, 6448-6453.

20 Levites, Y., Das, P., Price, R. W., Rochette, M. J., Kostura, L. A., McGowan, E. M., Murphy, M. P. and Golde, T. E. (2006). Anti-Abeta42- and anti-Abeta40-specific mAbs attenuate amyloid deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.***116**, 193-201.

Matsuoka, Y., Saito, M., LaFrancois, J., Saito, M., Gaynor, K., Olm, V., Wang, L., Casey, E., Lu, Y., Shiratori, C., Lemere, C. and Duff, K. (2003). Novel therapeutic approach for the treatment  
25 of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid. *J. Neurosci.***23**, 29-33.

McCafferty, J., Fitzgerald, K. J., Earnshaw, J., Chiswell, D. J., Link, J., Smith, R. and Kenten, J. (1994). Selection and rapid purification of murine antibody fragments that bind a transition-state analog by phage display. *на патент CIIIA Biochem. Biotechnol.***47**, 157-171; discussion  
30 171-153.

McGowan, E., Pickford, F., Kim, J., Onstead, L., Eriksen, J., Yu, C., Skipper, L., Murphy, M. P., Beard, J., Das, P., Jansen, K., Delucia, M., Lin, W. L., Dolios, G., Wang, R., Eckman, C. B., Dickson, D. W., Hutton, M., Hardy, J. and Golde, T. (2005). Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron***47**, 191-199.

35 Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K. and McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.***20**, 4050-4058.

Oganesyan, V., Gao, C., Shirinian, L., Wu, H. and Dall'Acqua, W. F. (2008). Structural  
40 characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.***64**, 700-704.

Orgogozo, J. M., Gilman, S., Dartigues, J. F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L. C., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Flitman, S., Michel, B. F., Boada, M., Frank, A. and Hock, C. (2003). Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization.  
45 *Neurology***61**, 46-54.

Osborn, J. K., Field, A., Wilton, J., Derbyshire, E., Earnshaw, J. C., Jones, P. T., Allen, D. and McCafferty, J. (1996). Generation of a panel of related human scFv antibodies with high affinities for human CEA. *Immunotechnology***2**, 181-196.

Persic, L., Roberts, A., Wilton, J., Cattaneo, A., Bradbury, A. and Hoogenboom, H. R. (1997). An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. *Gene*187, 9-18.

5 Portelius, E., Bogdanovic, N., Gustavsson, M. K., Volkman, I., Brinkmalm, G., Zetterberg, H., Winblad, B. and Blennow, K. (2010). Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*120, 185-193.

Pride, M., Seubert, P., Grundman, M., Hagen, M., Eldridge, J. and Black, R. S. (2008). Progress in the active immunotherapeutic approach to Alzheimer's disease: clinical investigations into AN1792-associated meningoencephalitis. *Neurodegener. Dis.*5, 194-196.

Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandever, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D. and Seubert, P. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*400, 173-177.

Schenk, D. B., Seubert, P., Lieberburg, I. and Wallace, J. (2000). beta-peptide immunization: a possible new treatment for Alzheimer disease. *Arch. Neurol.*57, 934-936.

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. and Younkin, S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.*2, 864-870.

Schier, R., Bye, J., Apell, G., McCall, A., Adams, G. P., Malmqvist, M., Weiner, L. M. and Marks, J. D. (1996). Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J. Mol. Biol.*255, 28-43.

Selkoe, D. J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*399, A23-31.

30 Thompson, J., Pope, T., Tung, J. S., Chan, C., Hollis, G., Mark, G. and Johnson, K. S. (1996). Affinity maturation of a high-affinity human monoclonal antibody against the third hypervariable loop of human immunodeficiency virus: use of phage display to improve affinity and broaden strain reactivity. *J. Mol. Biol.*256, 77-88.

Tomlinson, I. M., Walter, G., Marks, J. D., Llewelyn, M. B. and Winter, G. (1992). The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *J. Mol. Biol.*227, 776-798.

40 Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. and Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*286, 735-741.

Vaughan, T. J., Williams, A. J., Pritchard, K., Osbourn, J. K., Pope, A. R., Earnshaw, J. C., McCafferty, J., Hodits, R. A., Wilton, J. and Johnson, K. S. (1996). Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotechnol.*14, 309-314.

45 Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J. and Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*416, 535-539.

Walsh, D. M., Klyubin, I., Shankar, G. M., Townsend, M., Fadeeva, J. V., Betts, V., Podlisny,

M. B., Cleary, J. P., Ashe, K. H., Rowan, M. J. and Selkoe, D. J. (2005a). The role of cell-derived oligomers of Abeta in Alzheimer's disease and avenues for therapeutic intervention. *Biochem. Soc. Trans.*33, 1087-1090.

Walsh, D. M., Townsend, M., Podlisny, M. B., Shankar, G. M., Fadeeva, J. V., El Agnaf, O., Hartley, D. M. and Selkoe, D. J. (2005b). Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (Abeta) fibrillogenesis block oligomerization of natural Abeta and thereby rescue long-term potentiation. *J. Neurosci.*25, 2455-2462.

Wang, H. W., Pasternak, J. F., Kuo, H., Ristic, H., Lambert, M. P., Chromy, B., Viola, K. L., Klein, W. L., Stine, W. B., Krafft, G. A. and Trommer, B. L. (2002). Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res.*924, 133-140.

Weller, R. O. and Nicoll, J. A. (2003). Cerebral amyloid angiopathy: pathogenesis and effects on the ageing and Alzheimer brain. *Neurol. Res.*25, 611-616.

Wilcock, D. M., Alamed, J., Gottschall, P. E., Grimm, J., Rosenthal, A., Pons, J., Ronan, V., Symmonds, K., Gordon, M. N. and Morgan, D. (2006). Deglycosylated anti-amyloid-beta antibodies eliminate cognitive deficits and reduce parenchymal amyloid with minimal vascular consequences in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci.*26, 5340-5346.

Wilcock, D. M. and Colton, C. A. (2009). Immunotherapy, vascular pathology, and microhemorrhages in transgenic mice. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.*8, 50-64.

Younkin, S. G. (1995). Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*37, 287-288.

Younkin, S. G. (1998). The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J. Physiol. Paris*92, 289-292.

Остальные литературные источники включены в текст.

25

#### (57) Формула изобретения

1. Выделенная молекула антитела или фрагмента антитела, которые селективно связываются с бета-амилоидным 1-42 пептидом (A $\beta$ 1-42) человека по сравнению с бета-амилоидным 1-40 пептидом (A $\beta$ 1-40), которые содержат:

30 (i) VH-домен, содержащий следующие HCDR:

HCDR1 SEQ ID NO:525,  
HCDR2 SEQ ID NO:526 и  
HCDR3 SEQ ID NO:527; и

35 (ii) VL-домен, содержащий следующие LCDR:

LCDR1 SEQ ID NO:534  
LCDR2 SEQ ID NO:535 и  
LCDR3 SEQ ID NO:536;

40 и где VL-домен имеет треонин в аминокислотном положении, соответствующем положению 81 по Kabat в SEQ ID NO:29.

2. Выделенная молекула антитела или фрагмента антитела по п.1, где в VH-домене аргинин в аминокислотном положении соответствует положению 43 по Kabat в SEQ ID NO:20.

45 3. Выделенная молекула антитела или фрагмента антитела по п.1 или п.2, которые способны связываться с растворимым мономерным A $\beta$ 1-42 человека с константой диссоциации (KD) 500 пМ.

4. Выделенная молекула антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-3, которые способны связываться с n-олигомером с небольшим количеством звеньев (до

пентамера) A $\beta$ 1-42 человека с константой диссоциации (KD) 500 пМ.

5. Выделенная молекула антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-4, которые либо не связываются с A $\beta$ 1-40, либо связываются с A $\beta$ 1-40 с KD более чем 1 мМ.

5 6. Выделенная молекула антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-5, причем молекула антитела представляет собой моноклональное антитело.

7. Выделенная молекула антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-5, где фрагмент антитела представляет собой scFv.

10 8. Выделенная молекула антитела или фрагмент антитела по любому из пп.1-5, где фрагмент антитела представляет собой Fab.

9. Способ лечения человека или животного, нуждающегося в этом, включающий введение человеку или животному антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-8, причем лечение по меньшей мере снижает амилоидоз; лечит болезнь Альцгеймера; улучшает когнитивное состояние или замедляет когнитивное ухудшение при болезни  
15 Альцгеймера или болезни Дауна; или лечит макулярную дегенерацию.

10. Способ по п.9, где лечение предназначено для лечения болезни Альцгеймера.

11. Способ по п.9, где способ предназначен для снижения амилоидоза.

20

25

30

35

40

45



1

<110> MedImmune Limited

<120> антитела к бета-амилоиду

<160> 558

<170> Патентное программное обеспечение Medimmune Ltd, релиз марта 2010 года. Окончательная верификация с помощью USPTO Checker версия 4.4.0.

<210> 1  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0007

<400> 1  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc gtttatacta tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attggttcta gtggtggtac  
 gacagtttac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240

ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagaaggg 300

cagcagctgg tacgccccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 2  
 <211> 125  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0007

<400> 2  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

2

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

Thr Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Val Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gln Gln Leu Val Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 3  
 <211> 5  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0007

<400> 3  
 Val Tyr Thr Met Trp  
 5

<210> 4  
 <211> 17  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0007

<400> 4  
 Val Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 5  
 <211> 16

<212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0007  
  
 <400> 5  
 Glu Gly Gln Gln Leu Val Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15  
  
 <210> 6  
 <211> 30  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0007  
  
 <400> 6  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30  
  
 <210> 7  
 <211> 14  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0007  
  
 <400> 7  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10  
  
 <210> 8  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0007  
  
 <400> 8  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 9  
 <211> 11  
 <212> БЕЖЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0007

<400> 9  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 10  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0007

<400> 10  
 cagagcgtct tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60

acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttctt ggtatcaaca  
 gaagtcaggc 120

cagtcccctg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctacg 240

gatgaggctg actattactg tcaggcgcag gacagtagca ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 11  
 <211> 106  
 <212> БЕЖЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0007

<400> 11

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
 20 25 30

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

Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 12  
 <211> 11  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0007

<400> 12  
 Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
 5 10

<210> 13  
 <211> 7  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0007

<400> 13  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5

<210> 14  
 <211> 9  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0007

<400> 14

Gln Ala Gln Asp Ser Thr Thr Arg Val

5

<210> 15

<211> 22

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0007

<400> 15

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

5

10

15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 16

<211> 15

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0007

<400> 16

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

5

10

15

<210> 17

<211> 32

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0007

<400> 17

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr

5

10

15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 18  
 <211> 10  
 <212> ББЖЮК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0007

<400> 18  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 19  
 <211> 375  
 <212> ДНН  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 19  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc  
 cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc gtttatacta tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attgggttcta gtggtggtac  
 gacagtttac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240

ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300

atggaccact cccgccccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 20  
 <211> 125  
 <212> ББЖЮК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 20

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

<210> 21  
 <211> 5  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 21  
 Val Tyr Thr Met Trp  
 5

<210> 22  
 <211> 17  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 22  
 Val Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly



<210> 23  
 <211> 16  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 23  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 24  
 <211> 30  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 24  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30

<210> 25  
 <211> 14  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 25  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 26  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 26  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 27  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 27  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 28  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 28  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60  
  
 acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttctt ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120  
  
 cagtcccttg tcctggatcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180  
  
 ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctatg 240  
  
 gatgaggctg actattactg tcaggcgag gacagtacca ctcgagtgtt  
 cggcgaggag 300  
  
 accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 29  
 <211> 106  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0144-GL  
 <400> 29  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
 20 25 30  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60  
 Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Gln Asp Ser Thr Thr Arg Val  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 30  
 <211> 11  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL  
 <400> 30  
 Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
 5 10

<210> 31  
 <211> 7  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL  
 <400> 31  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5

<210> 32  
 <211> 9

<212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 32  
 Gln Ala Gln Asp Ser Thr Thr Arg Val  
 5

<210> 33  
 <211> 22  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 33  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 34  
 <211> 15  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 34  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 35  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 35  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15

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

20 25 30

<210> 36  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0144-GL

<400> 36  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 37  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0319

<400> 37  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60

tcctgtgagg cctctgtctc cgtgtacaac aaggacacta tgtggtgggt  
 ccgcccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attgggttcta gtggtggcac  
 gacagtctac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300

atggaccact cccgccccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 38  
 <211> 125  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0319

<400> 38

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15

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

Thr Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Val Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 39

<211> 5

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0319

<400> 39

Lys Asp Thr Met Trp  
5

<210> 40

<211> 17

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0319

<400> 40

Val Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
5 10 15

Gly

<210> 41  
 <211> 16  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0319

<400> 41  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 42  
 <211> 30  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0319

<400> 42  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Val Ser Val Tyr Asn  
 20 25 30

<210> 43  
 <211> 14  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0319

<400> 43  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 44  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0319

<400> 44  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15

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

<210> 45  
 <211> 11  
 <212> БЕЖЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0319

<400> 45  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 46  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0319

<400> 46  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60

acctgctctg gacataacat catggacaag tgggtctctt ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120

cgggcccttg ccctggtaat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctacg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 47  
 <211> 106  
 <212> БЕЖЛОК



<213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> Abet0319  
 <400> 47  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Ile Met Asp Lys Trp Val  
 20 25 30  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ser Pro Ala Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60  
 Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 48  
 <211> 11  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0319  
 <400> 48  
 Ser Gly His Asn Ile Met Asp Lys Trp Val Ser  
 5 10

<210> 49  
 <211> 7  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0319  
 <400> 49  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5

<210> 50  
 <211> 9  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0319

<400> 50  
 Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 5

<210> 51  
 <211> 22  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0319

<400> 51  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 52  
 <211> 15  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0319

<400> 52  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ser Pro Ala Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 53  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0319

<400> 53  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr

5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 54  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0319

<400> 54  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 55  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0321b

<400> 55  
 gaggtgcagc tgttgagtc tggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctgcgta ccaactcgaac cacgacccta tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120

ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcagtt attggttcta gtggtggtac  
 gacagcttac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagata attccaagaa  
 cacgctgtat 240

ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300

atggaccact cccgccccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 56  
 <211> 125  
 <212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0321b

<400> 56  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Tyr His Ser Asn His Asp  
 20 25 30  
 Pro Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Val Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 57  
 <211> 5  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0321b

<400> 57  
 His Asp Pro Met Trp  
 5

<210> 58  
 <211> 17  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0321b

<400> 58

Val Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 59  
 <211> 16  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0321b

<400> 59  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 60  
 <211> 30  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0321b

<400> 60  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Tyr His Ser Asn  
 20 25 30

<210> 61  
 <211> 14  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0321b

<400> 61  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 62  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0321b  
  
 <400> 62  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 63  
 <211> 11  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0321b  
  
 <400> 63  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 64  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0321b  
  
 <400> 64  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 gccagcatc 60  
  
 acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttctt ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120  
  
 cagtcccctg tcttgatcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180  
  
 ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctacg 240  
  
 gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300  
  
 accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 65  
 <211> 106  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0321b  
  
 <400> 65  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
 20 25 30  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Ile Ile Tyr  
 35 40 45  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60  
 Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 66  
 <211> 11  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0321b

<400> 66  
 Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
 5 10

<210> 67  
 <211> 7  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0321b

<400> 67

Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
5

<210> 68  
<211> 9  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0321b

<400> 68  
Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
5

<210> 69  
<211> 22  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0321b

<400> 69  
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
20

<210> 70  
<211> 15  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0321b

<400> 70  
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Ile Ile Tyr  
5 10 15

<210> 71  
<211> 32  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0321b



<400> 71  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 72  
 <211> 10  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0321b

<400> 72  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 73  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0322b

<400> 73  
 gaggtgcagc tgttgagtc tggaggaggc ctggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctaacga agagttccag tacaacccta tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attggttcta gtggtggtgc  
 gacagtttac 180

gcagacgccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccgagaa  
 cacgctgtat 240

ctgcaaatac acagcctaag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300

atggaccact cccgcccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 74  
 <211> 125  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0322b  
  
 <400> 74  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asn Glu Glu Phe Gln Tyr Asn  
 20 25 30  
 Pro Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Val Ile Gly Ser Ser Gly Gly Ala Thr Val Tyr Ala Asp Ala Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 75  
 <211> 5  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0322b

<400> 75  
 Tyr Asn Pro Met Trp  
 5

<210> 76  
 <211> 17  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0322b

<400> 76

Val Ile Gly Ser Ser Gly Gly Ala Thr Val Tyr Ala Asp Ala Val Lys  
5 10 15

Gly

<210> 77

<211> 16

<212> BEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0322b

<400> 77

Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
5 10 15

<210> 78

<211> 30

<212> BEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0322b

<400> 78

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asn Glu Glu Phe Gln  
20 25 30

<210> 79

<211> 14

<212> BEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0322b

<400> 79

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
5 10

<210> 80

```

<211>      32
<212>      EEJIOK
<213>      Homo sapiens

<220>
<223>      Abet0322b

<400>      80
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
5              10              15

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

<210>      81
<211>      11
<212>      EEJIOK
<213>      Homo sapiens

<220>
<223>      Abet0322b

<400>      81
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5              10

<210>      82
<211>      318
<212>      ДНК
<213>      Homo sapiens

<220>
<223>      Abet0322b

<400>      82
tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac
ggccagcatc          60

acctgctctg gacataactt gggagataaa tttgcttctt ggtatcaaca
gaagccaggc          120

cagtcccttg tcctggatcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagagat
ccctgagcga          180

ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac
ccaggctacg          240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt
cggcggaggg          300

```

accaagctga ccgtcctg  
318

<210> 83  
<211> 106  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0322b

<400> 83  
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15  
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Gly Asp Lys Phe Ala  
20 25 30  
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45  
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Glu Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
50 55 60  
Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
85 90 95  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 84  
<211> 11  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0322b

<400> 84  
Ser Gly His Asn Leu Gly Asp Lys Phe Ala Ser  
5 10

<210> 85  
<211> 7  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0322b

<400> 85

Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
5

<210> 86

<211> 9

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0322b

<400> 86

Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
5

<210> 87

<211> 22

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0322b

<400> 87

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
20

<210> 88

<211> 15

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0322b

<400> 88

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
5 10 15

<210> 89

<211> 32

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0322b

<400> 89  
 Glu Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 90  
 <211> 10  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0322b

<400> 90  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 91  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0323b

<400> 91  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctaccag cacgttccag gaagacacta tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120  
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attggtccca acccgaagaa  
 caacgcctac 180  
 gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240  
 ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300  
 atgaccact cccgccccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
375

<210> 92  
<211> 125  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0323b

<400> 92  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Thr Ser Thr Phe Gln Glu Asp  
20 25 30  
Thr Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ser Val Ile Gly Pro Asn Pro Lys Asn Asn Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
100 105 110  
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 93  
<211> 5  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0323b

<400> 93  
Glu Asp Thr Met Trp  
5

<210> 94  
<211> 17



<212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0323b  
  
 <400> 94  
 Val Ile Gly Pro Asn Pro Lys Asn Asn Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 95  
 <211> 16  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0323b  
  
 <400> 95  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 96  
 <211> 30  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0323b  
  
 <400> 96  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Thr Ser Thr Phe Gln  
 20 25 30

<210> 97  
 <211> 14  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0323b  
  
 <400> 97  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

5 10

<210> 98  
 <211> 32  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0323b

<400> 98  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15

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

<210> 99  
 <211> 11  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0323b

<400> 99  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 100  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0323b

<400> 100  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagta tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60

acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttcct ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120

cagtcccctg tcctggatcat ctatcgagat gacaagcggc cctctggggg  
 ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctacg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggta ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300

accaagctga tcgtccta  
 318

<210> 101  
 <211> 106  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0323b

<400> 101  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
 20 25 30  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60  
 Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ile Val Leu  
 100 105

<210> 102  
 <211> 11  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0323b

<400> 102  
 Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
 5 10

<210> 103  
 <211> 7

<212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0323b

<400> 103  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5

<210> 104  
 <211> 9  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0323b

<400> 104  
 Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 5

<210> 105  
 <211> 22  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0323b

<400> 105  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 106  
 <211> 15  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0323b

<400> 106  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

```

<210>      107
<211>      32
<212>      EEJIOK
<213>      Homo sapiens

<220>
<223>      Abet0323b

<400>      107
Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr
5                               10                               15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20                               25                               30

<210>      108
<211>      10
<212>      EEJIOK
<213>      Homo sapiens

<220>
<223>      Abet0323b

<400>      108
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ile Val Leu
5                               10

<210>      109
<211>      375
<212>      ДНК
<213>      Homo sapiens

<220>
<223>      Abet0328

<400>      109
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc
cctgagactc          60

tcctgtgcag cctccagaga ccccttcaag gcggacacta tgtggtgggt
cgcagcagct          120

ccaaggaaga ggctggagtg ggtctcagtt attggtgccc acaccaccaa
cagcgcgtac          180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa
cagcgtgtat          240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc
gagagagtgg          300

```

atggaccgct cccgcccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 110  
 <211> 125  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

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

<210> 111  
 <211> 5  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

<400> 111  
 Ala Asp Thr Met Trp  
 5

<210> 112  
 <211> 17  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

<400> 112  
 Val Ile Gly Ala His Thr Thr Asn Ser Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 113  
 <211> 16  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

<400> 113  
 Glu Trp Met Asp Arg Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 114  
 <211> 30  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

<400> 114  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Asp Pro Phe Lys  
 20 25 30

<210> 115  
 <211> 14  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

<400> 115  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Arg Lys Arg Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 116  
 <211> 32  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

<400> 116  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15

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

<210> 117  
 <211> 11  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

<400> 117  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 118  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

<400> 118  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggtcagcatc 60

acctgctctg gacgtaactt ggaagataaa tttgcttctt ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120

cagtcccttg tcctgggcat ctatcgagat gacaagcggc cctcaggggt  
 ccctgagcga 180



ttctctgect ccaactccgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
ccaggctacg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
318

<210> 119  
<211> 106  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0328

<400> 119  
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15  
Thr Val Ser Ile Thr Cys Ser Gly Arg Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
20 25 30  
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45  
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
50 55 60  
Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
85 90 95  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 120  
<211> 11  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0328

<400> 120  
Ser Gly Arg Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
5 10

<210> 121  
 <211> 7  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

<400> 121  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5

<210> 122  
 <211> 9  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

<400> 122  
 Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 5

<210> 123  
 <211> 22  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

<400> 123  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
 Thr Val Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 124  
 <211> 15  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

<400> 124  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

5 10 15

<210> 125  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

<400> 125  
 Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 126  
 <211> 10  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0328

<400> 126  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 127  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0329

<400> 127  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctacgtt taacctcaag cgcgagacta tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120  
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctccggt attggttccc accaggagcg  
 cacgagctac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
gagagagtgg 300

atggaccact cccgcccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
ggggaccctg 360

gtcacctgt cctca  
375

<210> 128  
<211> 125  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0329

<400> 128  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Thr Phe Asn Leu Lys Arg Glu  
20 25 30  
Thr Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ser Val Ile Gly Ser His Gln Glu Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
100 105 110  
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 129  
<211> 5  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0329

<400> 129

Arg Glu Thr Met Trp  
5

<210> 130  
<211> 17  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0329

<400> 130  
Val Ile Gly Ser His Gln Glu Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
5 10 15

Gly

<210> 131  
<211> 16  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0329

<400> 131  
Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
5 10 15

<210> 132  
<211> 30  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0329

<400> 132  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Thr Phe Asn Leu Lys  
20 25 30

<210> 133  
<211> 14  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0329  
  
 <400> 133  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 134  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0329  
  
 <400> 134  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 135  
 <211> 11  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0329  
  
 <400> 135  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 136  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0329  
  
 <400> 136  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60  
  
 acctgctctg gacataacgt gagcgacaag tggatgacgt ggtatcagca  
 gaagccaggc 120

cagtcccctg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
ccaagctacg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtggt  
cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
318

<210> 137  
<211> 106  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0329

<400> 137  
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15  
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Val Ser Asp Lys Trp Met  
20 25 30  
Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45  
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
50 55 60  
Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
85 90 95  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 138  
<211> 11  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0329

<400> 138

Ser Gly His Asn Val Ser Asp Lys Trp Met Thr  
5 10

<210> 139  
<211> 7  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0329

<400> 139  
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
5

<210> 140  
<211> 9  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0329

<400> 140  
Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
5

<210> 141  
<211> 22  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0329

<400> 141  
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
20

<210> 142  
<211> 15  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0329



<400> 142  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 143  
 <211> 32  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0329

<400> 143  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 144  
 <211> 10  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0329

<400> 144  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 145  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0332

<400> 145  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggagtc  
 cctgagactc 60

tcctgtgcag cctcttccga ctctggcac accgacatta tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120

ccaggaaga ggctggagtg ggtctcagtt attggtaact cgaacaagaa  
 gatcgctac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
cacgctgtat 240

ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
gagagagtgg 300

atggaccact cccgccccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
ggggaccctg 360

gtcaccgtct catca  
375

<210> 146  
<211> 125  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0332

<400> 146  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu  
5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Asp Ser Trp His Thr Asp  
20 25 30  
Ile Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ser Val Ile Gly Asn Ser Asn Lys Lys Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
100 105 110  
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 147  
<211> 5  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0332

<400> 147  
 Thr Asp Ile Met Trp  
 5

<210> 148  
 <211> 17  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0332

<400> 148  
 Val Ile Gly Asn Ser Asn Lys Lys Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 149  
 <211> 16  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0332

<400> 149  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 150  
 <211> 30  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0332

<400> 150  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Asp Ser Trp His  
 20 25 30

<210> 151

<211> 14  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0332

<400> 151  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 152  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0332

<400> 152  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15

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

<210> 153  
 <211> 11  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0332

<400> 153  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 154  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0332

<400> 154  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc cagggcagac  
 ggccagcatc 60

acctgctctg gacataacat cggcgcgaag tgggtgagct ggtatcaaca  
gaagccaggc 120

cagtcaccta tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
ccctgagcga 180

ttctctgect ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
ccaggctacg 240

gatgaggctg actattactg tcaggcgcag ggccagggtga ccaggtcggt  
cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
318

<210> 155  
<211> 106  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0332

<400> 155  
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15  
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Ile Gly Ala Lys Trp Val  
20 25 30  
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Ile Leu Val Ile Tyr  
35 40 45  
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
50 55 60  
Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Gln Gly Gln Val Thr Arg Ser  
85 90 95  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 156  
<211> 11  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0332

<400> 156

Ser Gly His Asn Ile Gly Ala Lys Trp Val Ser  
5 10

<210> 157

<211> 7

<212> BEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0332

<400> 157

Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
5

<210> 158

<211> 9

<212> BEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0332

<400> 158

Gln Ala Gln Gly Gln Val Thr Arg Ser  
5

<210> 159

<211> 22

<212> BEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0332

<400> 159

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
20

<210> 160

<211> 15

<212> BEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0332

<400> 160

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Ile Leu Val Ile Tyr  
5 10 15

<210> 161

<211> 32

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0332

<400> 161

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 162

<211> 10

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0332

<400> 162

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
5 10

<210> 163

<211> 375

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0342

<400> 163

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgactttcgc aggtccgtca tgtggtgggt  
ccgccagct 120

ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcagtt attggtgccc agaccagaa  
caaggcgtac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
gagagagtgg 300

atggaccact cccgcccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
375

<210> 164  
<211> 125  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0342

<400> 164  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Arg Arg Ser  
20 25 30  
Val Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ser Val Ile Gly Ala Gln Thr Gln Asn Lys Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
100 105 110  
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 165  
<211> 5  
<212> BEJOK



<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0342

<400> 165

Arg Ser Val Met Trp

5

<210> 166

<211> 17

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0342

<400> 166

Val Ile Gly Ala Gln Thr Gln Asn Lys Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 167

<211> 16

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0342

<400> 167

Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

5

10

15

<210> 168

<211> 30

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0342

<400> 168

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

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Arg

20

25

30

<210> 169  
 <211> 14  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0342

<400> 169  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 170  
 <211> 32  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0342

<400> 170  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 171  
 <211> 11  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0342

<400> 171  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 172  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0342

<400> 172

tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
ggccagcatc 60

acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttcct ggtatcaaca  
gaagccaggc 120

cagtcccccg tcctgggtcat ctatcgggat gacaagcggc cctcagggat  
ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactctgg ggacactgcc actctgacca tcagcgggac  
ccaggctatg 240

gatgaggctg actattactg tcaggcgcag gacagtacca ctcgagtgtt  
cggcggaggg 300

actaagctga ccgtccta  
318

<210> 173  
<211> 106  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0342

<400> 173  
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15  
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
20 25 30  
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45  
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
50 55 60  
Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Gln Asp Ser Thr Thr Arg Val  
85 90 95  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 174  
<211> 11  
<212> BEJOK

<213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> Abet0342  
 <400> 174  
 Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
 5 10  
 <210> 175  
 <211> 7  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> Abet0342  
 <400> 175  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5  
 <210> 176  
 <211> 9  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> Abet0342  
 <400> 176  
 Gln Ala Gln Asp Ser Thr Thr Arg Val  
 5  
 <210> 177  
 <211> 22  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> Abet0342  
 <400> 177  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20  
 <210> 178

<211> 15  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0342

<400> 178  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 179  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0342

<400> 179  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr  
 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 180  
 <211> 10  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0342

<400> 180  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 181  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 181  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caactttaac caccaggtga tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attggtaaga ccaacgagaa  
 catcgcctac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300

atggaccact ctgccccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcacctct cctca  
 375

<210> 182  
 <211> 125  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 182  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn His Gln  
 20 25 30  
 Val Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Val Ile Gly Lys Thr Asn Glu Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 183  
 <211> 5  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 183  
 His Gln Val Met Trp  
 5

<210> 184  
 <211> 17  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 184  
 Val Ile Gly Lys Thr Asn Glu Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 185  
 <211> 16  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 185  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 186  
 <211> 30  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 186  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn  
 20 25 30

<210> 187  
 <211> 14  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 187  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 188  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 188  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15

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

<210> 189  
 <211> 11  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 189  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 190  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>



<223> Abet0343  
 <400> 190  
 cagagcgtct tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60  
 acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttctt ggtatcaaca  
 gaagtcaggc 120  
 cagtcccctg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180  
 ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctacg 240  
 gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300  
 accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 191  
 <211> 106  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343  
 <400> 191  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
 20 25 30  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60  
 Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 192  
 <211> 11  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 192  
 Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
 5 10

<210> 193  
 <211> 7  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 193  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5

<210> 194  
 <211> 9  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 194  
 Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 5

<210> 195  
 <211> 22  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 195  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 196  
 <211> 15  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 196  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 197  
 <211> 32  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 197  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 198  
 <211> 10  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343

<400> 198  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 199  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0344

<400> 199

gaggtgcagc tattggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
cctgagtctc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc gtttatacta tgtggtgggt  
ccgccaggct 120

ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcagtt attggtggga acgagacccg  
gaaggcctac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagggaca attccaagaa  
caggctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
gagagagtgg 300

atggaccact cccgccccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
375

<210> 200  
<211> 125  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0344

<400> 200  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15  
Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr  
20 25 30  
Thr Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ser Val Ile Gly Gly Asn Glu Thr Arg Lys Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Arg Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
100 105 110  
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115		120		125
<210>	201			
<211>	5			
<212>	BEJIOK			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<223>	Abet0344			
<400>	201			
	Val Tyr Thr Met Trp			
	5			
<210>	202			
<211>	17			
<212>	BEJIOK			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<223>	Abet0344			
<400>	202			
	Val Ile Gly Gly Asn Glu Thr Arg Lys Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys			
	5	10		15
	Gly			
<210>	203			
<211>	16			
<212>	BEJIOK			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<223>	Abet0344			
<400>	203			
	Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val			
	5	10		15
<210>	204			
<211>	30			
<212>	BEJIOK			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<223>	Abet0344			

<400> 204  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30

<210> 205  
 <211> 14  
 <212> БЕЖЮК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0344

<400> 205  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 206  
 <211> 32  
 <212> БЕЖЮК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0344

<400> 206  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Arg Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15

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

<210> 207  
 <211> 11  
 <212> БЕЖЮК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0344

<400> 207  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 208  
 <211> 318  
 <212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0344

<400> 208

cagagcgtct tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
ggccagcatc 60

acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttcct ggtatcaaca  
gaagtcaggc 120

cagtcccctg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
ccctgagcga 180

ttctctgect ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
ccaggctacg 240

gatgaggctg actattactg tgcgaccag gacaacttca ctcgagtgtt  
cggcggaggc 300

accaagctga ccgtccta  
318

<210> 209

<211> 106

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0344

<400> 209

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
20 25 30

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

Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Gln Asp Asn Phe Thr Arg Val  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 210  
 <211> 11  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0344

<400> 210  
 Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
 5 10

<210> 211  
 <211> 7  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0344

<400> 211  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5

<210> 212  
 <211> 9  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0344

<400> 212  
 Ala Thr Gln Asp Asn Phe Thr Arg Val  
 5

<210> 213  
 <211> 22  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0344

<400> 213  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15



Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
20

<210> 214  
<211> 15  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0344

<400> 214  
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
5 10 15

<210> 215  
<211> 32  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0344

<400> 215  
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 216  
<211> 10  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0344

<400> 216  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
5 10

<210> 217  
<211> 375  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0368

<400> 217

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttagtacagc cgggggggtc  
cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgactttggg ccgagcccta tgtggtgggt  
ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attggtaagg acaccagaa  
cagcacgtac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagga  
cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgaa agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
gagagagtgg 300

atggaccact cccgccccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
ggggaccctg 360

gtcacctgtc cctca  
375

<210> 218

<211> 125

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0368

<400> 218

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Gly Pro Ser  
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met

100 105 110  
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 219  
<211> 5  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0368

<400> 219  
Pro Ser Pro Met Trp  
5

<210> 220  
<211> 17  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0368

<400> 220  
Val Ile Gly Lys Asp Thr Gln Asn Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
5 10 15

Gly

<210> 221  
<211> 16  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0368

<400> 221  
Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
5 10 15

<210> 222  
<211> 30  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0368  
  
 <400> 222  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Gly  
 20 25 30

<210> 223  
 <211> 14  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0368  
  
 <400> 223  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 224  
 <211> 32  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0368  
  
 <400> 224  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 225  
 <211> 11  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0368  
  
 <400> 225  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 226  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0368

<400> 226  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60

acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttacttctt ggtatcaaca  
 gaagtcaggc 120

cagtcccttg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcggggc  
 ccaggctacg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 227  
 <211> 106  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0368

<400> 227  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Thr  
 20 25 30

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

Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Thr  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val

85		90		95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu				
100		105		
<210>	228			
<211>	11			
<212>	EEJOK			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<223>	Abet0368			
<400>	228			
Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Thr Ser				
5		10		
<210>	229			
<211>	7			
<212>	EEJOK			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<223>	Abet0368			
<400>	229			
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser				
5				
<210>	230			
<211>	9			
<212>	EEJOK			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<223>	Abet0368			
<400>	230			
Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val				
5				
<210>	231			
<211>	22			
<212>	EEJOK			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<223>	Abet0368			

<400> 231  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 232  
 <211> 15  
 <212> БЕЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0368

<400> 232  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 233  
 <211> 32  
 <212> БЕЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0368

<400> 233  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 234  
 <211> 10  
 <212> БЕЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0368

<400> 234  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 235  
 <211> 375  
 <212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0369

<400> 235

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ctggtacagc ctggggggtc  
cctgagactc 60

tcctgtgcag cctcttcggt ccagatctcg aagaacacta tgtggtgggt  
ccgccgggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attggtaagg acgagaccgc  
cttcaactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
caccctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
gagagagtgg 300

atggaccact cccgcccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
ggggaccctg 360

gtcacctctt cctca  
375

<210> 236

<211> 125

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0369

<400> 236

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Phe Gln Ile Ser Lys Asn  
20 25 30

Thr Met Trp Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Val Ile Gly Lys Asp Glu Thr Arg Phe Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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



RU 2 689 674 C2

85		90		95										
Ala	Arg	Glu	Trp	Met	Asp	His	Ser	Arg	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly Met
100					105					110				
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
115					120					125				

<210>	237			
<211>	5			
<212>	EEJOK			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<223>	Abet0369			
<400>	237			
Lys	Asn	Thr	Met	Trp
5				

<210>	238														
<211>	17														
<212>	EEJOK														
<213>	Homo sapiens														
<220>															
<223>	Abet0369														
<400>	238														
Val	Ile	Gly	Lys	Asp	Glu	Thr	Arg	Phe	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
5					10					15					
		Gly													

<210>	239														
<211>	16														
<212>	EEJOK														
<213>	Homo sapiens														
<220>															
<223>	Abet0369														
<400>	239														
Glu	Trp	Met	Asp	His	Ser	Arg	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
5					10						15				

<210>	240
<211>	30

<212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0369  
  
 <400> 240  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Phe Gln Ile Ser  
 20 25 30  
  
 <210> 241  
 <211> 14  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0369  
  
 <400> 241  
 Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10  
  
 <210> 242  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0369  
  
 <400> 242  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30  
  
 <210> 243  
 <211> 11  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0369  
  
 <400> 243  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

5 10

<210> 244  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0369

<400> 244  
 tcgtacgggt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60

acctgctctg gacgtaacat cggggacagc tgggtcgcgt ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120

cagtcccctg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctacg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 245  
 <211> 106  
 <212> БЕЖЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0369

<400> 245  
 Ser Tyr Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Arg Asn Ile Gly Asp Ser Trp Val  
 20 25 30

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

Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr

```

65               70               75               80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val
85               90               95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100              105

```

```

<210>      246
<211>      11
<212>      EEJIOK
<213>      Homo sapiens

```

```

<220>
<223>      Abet0369

```

```

<400>      246
Ser Gly Arg Asn Ile Gly Asp Ser Trp Val Ala
5               10

```

```

<210>      247
<211>      7
<212>      EEJIOK
<213>      Homo sapiens

```

```

<220>
<223>      Abet0369

```

```

<400>      247
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser
5

```

```

<210>      248
<211>      9
<212>      EEJIOK
<213>      Homo sapiens

```

```

<220>
<223>      Abet0369

```

```

<400>      248
Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val
5

```

```

<210>      249
<211>      22
<212>      EEJIOK
<213>      Homo sapiens

```

<220>  
 <223> Abet0369  
  
 <400> 249  
 Ser Tyr Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20  
  
 <210> 250  
 <211> 15  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0369  
  
 <400> 250  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15  
  
 <210> 251  
 <211> 32  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0369  
  
 <400> 251  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15  
  
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30  
  
 <210> 252  
 <211> 10  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0369  
  
 <400> 252  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 253  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0370

<400> 253  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60

tctgtgcag cctctggatt ccactttccc atgagcgcca tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtc attggtgaga cccgggagag  
 gcaggcctac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagag  
 cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300

atggaccact cccgccccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 254  
 <211> 125  
 <212> БЕЖЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0370

<400> 254  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe His Phe Pro Met Ser  
 20 25 30

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

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

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

RU 2 689 674 C2

65		70		75		80									
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85					90					95					

Ala	Arg	Glu	Trp	Met	Asp	His	Ser	Arg	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met
100					105					110					

Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
115					120					125		

<210> 255  
 <211> 5  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0370

<400> 255  
 Met Ser Ala Met Trp  
 5

<210> 256  
 <211> 17  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0370

<400> 256  
 Val Ile Gly Glu Thr Pro Glu Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 257  
 <211> 16  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0370

<400> 257  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 258  
 <211> 30  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0370

<400> 258  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe His Phe Pro  
 20 25 30

<210> 259  
 <211> 14  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0370

<400> 259  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 260  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0370

<400> 260  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 261  
 <211> 11  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0370



<400> 261  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 262  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0370

<400> 262  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60

acctgcacga ccccgcaactt caacagcaaa tttgcttctt ggtatcaaca  
 gaagccgggc 120

cagtcccctg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcggggac  
 ccaggctatg 240

gatgaggctg actattactg tcaggcgcag gatagtacca ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300

accaggctga ccgtccta  
 318

<210> 263  
 <211> 106  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0370

<400> 263  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Thr Thr Pro His Phe Asn Ser Lys Phe Ala  
 20 25 30

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

Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser

```

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

```

```

<210>    264
<211>    11
<212>    BEJIOK
<213>    Homo sapiens

```

```

<220>
<223>    Abet0370

```

```

<400>    264
Thr Thr Pro His Phe Asn Ser Lys Phe Ala Ser
5                10

```

```

<210>    265
<211>    7
<212>    BEJIOK
<213>    Homo sapiens

```

```

<220>
<223>    Abet0370

```

```

<400>    265
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser
5

```

```

<210>    266
<211>    9
<212>    BEJIOK
<213>    Homo sapiens

```

```

<220>
<223>    Abet0370

```

```

<400>    266
Gln Ala Gln Asp Ser Thr Thr Arg Val
5

```

```

<210>    267
<211>    22

```

<212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0370  
  
 <400> 267  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20  
  
  
 <210> 268  
 <211> 15  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0370  
  
 <400> 268  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15  
  
  
 <210> 269  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0370  
  
 <400> 269  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15  
  
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30  
  
  
 <210> 270  
 <211> 10  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0370  
  
 <400> 270  
 Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu

5 10

<210> 271  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0371

<400> 271  
 gaggtgcagc tgtcggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60

tctgtgcag cctctcacga cgccttcccc ttcgacacta tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attggttcta gtggtggtac  
 gacagtttac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccgtt tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300

atggaccact cccgcccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 272  
 <211> 125  
 <212> БЕЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0371

<400> 272  
 Glu Val Gln Leu Ser Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser His Asp Ala Phe Pro Phe Asp  
 20 25 30

Thr Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

<210> 273  
<211> 5  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0371

<400> 273  
Phe Asp Thr Met Trp  
5

<210> 274  
<211> 17  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0371

<400> 274  
Val Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
5 10 15

Gly

<210> 275  
<211> 16  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0371

<400> 275

Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 276  
 <211> 30  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0371

<400> 276  
 Glu Val Gln Leu Ser Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser His Asp Ala Phe Pro  
 20 25 30

<210> 277  
 <211> 14  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0371

<400> 277  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 278  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0371

<400> 278  
 Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15

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

<210> 279  
 <211> 11  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0371

<400> 279

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
5 10

<210> 280

<211> 318

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0371

<400> 280

tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
ggccagcatc 60

acctgctccg gacataacat ctcgtcgagc tgggtctcct ggtatcaaca  
gaagccaggc 120

cagtccctg tcctggatc ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
ccctgagcga 180

ttctctgct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
ccaggctacg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggta ctcgagtctt  
cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
318

<210> 281

<211> 106

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0371

<400> 281

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Ile Ser Ser Ser Trp Val  
20 25 30

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

```

35              40              45
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser
50              55              60

Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr
65              70              75              80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100              105

```

```

<210>      282
<211>      11
<212>      BEJOK
<213>      Homo sapiens

```

```

<220>
<223>      Abet0371

```

```

<400>      282
Ser Gly His Asn Ile Ser Ser Ser Trp Val Ser
5              10

```

```

<210>      283
<211>      7
<212>      BEJOK
<213>      Homo sapiens

```

```

<220>
<223>      Abet0371

```

```

<400>      283
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser
5

```

```

<210>      284
<211>      9
<212>      BEJOK
<213>      Homo sapiens

```

```

<220>
<223>      Abet0371

```

```

<400>      284
Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val
5

```



<210> 285  
 <211> 22  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0371

<400> 285  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 286  
 <211> 15  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0371

<400> 286  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 287  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0371

<400> 287  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 288  
 <211> 10  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0371

<400> 288  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
5 10

<210> 289  
<211> 375  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0372

<400> 289  
gaggtgcagc tgttgagtc tggggggggc ttggtacagc ctggggggtc  
cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctagcga catgttcaac atcgagacca tgtggtgggt  
ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attggtaagg ggatgaacaa  
cgtctcgtac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
gagagagtgg 300

atggaccact cccgcccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
ggggaccctg 360

gtcacctct cctca  
375

<210> 290  
<211> 125  
<212> БЕЛОК  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0372

<400> 290  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Asp Met Phe Asn Ile Glu  
20 25 30

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

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

<210> 291  
 <211> 5  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0372

<400> 291  
 Ile Glu Thr Met Trp  
 5

<210> 292  
 <211> 17  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0372

<400> 292  
 Val Ile Gly Lys Gly Met Asn Asn Val Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 293  
 <211> 16  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0372

<400> 293  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 294  
 <211> 30  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0372

<400> 294  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Asp Met Phe Asn  
 20 25 30

<210> 295  
 <211> 14  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0372

<400> 295  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 296  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0372

<400> 296  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15

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

<210> 297

<211> 11  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0372

<400> 297  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 298  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0372

<400> 298  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60

acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttctt ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120

cagtcccctg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca ttagcgggac  
 ccaggctacg 240

gatgaggctg attattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 299  
 <211> 106  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0372

<400> 299  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala

```

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

```

```

<210>      300
<211>      11
<212>      EEJIOK
<213>      Homo sapiens

```

```

<220>
<223>      Abet0372

```

```

<400>      300
Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser
5          10

```

```

<210>      301
<211>      7
<212>      EEJIOK
<213>      Homo sapiens

```

```

<220>
<223>      Abet0372

```

```

<400>      301
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser
5

```

```

<210>      302
<211>      9
<212>      EEJIOK
<213>      Homo sapiens

```

```

<220>
<223>      Abet0372

```

```

<400>      302

```

Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
5

<210> 303  
<211> 22  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0372

<400> 303  
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
20

<210> 304  
<211> 15  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0372

<400> 304  
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
5 10 15

<210> 305  
<211> 32  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0372

<400> 305  
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 306  
<211> 10  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0372

<400> 306

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
5 10

<210> 307

<211> 375

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0373

<400> 307

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
cctgagactc 60

tcctgtgtag cctccggatt cgactttgag cggctccgtca tgtggtgggt  
ccgccaggct 120

ccaggaaga ggctggagtg ggtctcagtt attggtagcg ggaagaccaa  
catcacctac 180

gcagactccg tgaagggccg gttaccatc tccagagaca attccaagaa  
cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
gagagagtgg 300

atggaccact cccgccccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca

375

<210> 308

<211> 125

<212> БЕЖОК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0373

<400> 308

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Asp Phe Glu Arg Ser



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

<210> 309  
 <211> 5  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0373

<400> 309  
 Arg Ser Val Met Trp  
 5

<210> 310  
 <211> 17  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0373

<400> 310  
 Val Ile Gly Ser Gly Lys Thr Asn Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 311  
 <211> 16  
 <212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0373

<400> 311  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 312  
 <211> 30  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0373

<400> 312  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Asp Phe Glu  
 20 25 30

<210> 313  
 <211> 14  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0373

<400> 313  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 314  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0373

<400> 314  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 315  
 <211> 11  
 <212> БЕЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0373

<400> 315  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 316  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0373

<400> 316  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc cagggcagac  
 ggccagcatc 60

acctgctctg gtcataactt ggaggataaa tttgcttcct ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120

cagtccccg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagagat  
 ccctgagcga 180

ttctctgect ccaactctgg gcacaccgcc actctgacca tcagcggggac  
 ccaggctacg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 317  
 <211> 106  
 <212> БЕЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0373

<400> 317  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

RU 2 689 674 C2

5                          10                          15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
20                          25                          30

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

Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Glu Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
50                          55                          60

Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
65                          70                          75                          80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100                          105

<210>            318  
 <211>            11  
 <212>            BEJOK  
 <213>            Homo sapiens

<220>  
 <223>            Abet0373

<400>            318  
 Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
5                          10

<210>            319  
 <211>            7  
 <212>            BEJOK  
 <213>            Homo sapiens

<220>  
 <223>            Abet0373

<400>            319  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
5

<210>            320  
 <211>            9  
 <212>            BEJOK  
 <213>            Homo sapiens

<220>

<223> Abet0373

<400> 320  
 Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 5

<210> 321  
 <211> 22  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0373

<400> 321  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 322  
 <211> 15  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0373

<400> 322  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 323  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0373

<400> 323  
 Glu Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 324

<211> 10  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0373

<400> 324  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 325  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0374

<400> 325  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60

tctgtgcag cctctggatt ccagtttaag gacacgccca tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120

ccaggaagg ggctagagtg ggtctcagtt attggtgacc agaaccacaa  
 gaaggcctac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300

atggaccact cccgcccta ctactactac ggtatggacg cctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 326  
 <211> 125  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0374

<400> 326  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

```

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

```

```

<210>      327
<211>      5
<212>      BEJOK
<213>      Homo sapiens

```

```

<220>
<223>      Abet0374

```

```

<400>      327
Asp Thr Pro Met Trp
5

```

```

<210>      328
<211>      17
<212>      BEJOK
<213>      Homo sapiens

```

```

<220>
<223>      Abet0374

```

```

<400>      328
Val Ile Gly Asp Gln Asn His Lys Lys Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
5              10              15

```

Gly

<210> 329  
 <211> 16  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0374  
  
 <400> 329  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Ala  
 5 10 15  
  
 <210> 330  
 <211> 30  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0374  
  
 <400> 330  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Gln Phe Lys  
 20 25 30  
  
 <210> 331  
 <211> 14  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0374  
  
 <400> 331  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10  
  
 <210> 332  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0374  
  
 <400> 332  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15



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

<210> 333  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0374

<400> 333  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 334  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0374

<400> 334  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgacct caggacagac  
 ggccagcatc 60

acctgctctg gacataactt gggaggtaaa tttgcttctt ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120

cagtcccttg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactttgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctacg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 335  
 <211> 106  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0374

<400> 335  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Thr Pro Gly Gln  
 5 10 15  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Gly Gly Lys Phe Ala  
 20 25 30  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60  
 Asn Phe Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 336  
 <211> 11  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0374

<400> 336  
 Ser Gly His Asn Leu Gly Gly Lys Phe Ala Ser  
 5 10

<210> 337  
 <211> 7  
 <212> БЕЖОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0374

<400> 337  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5

<210> 338  
 <211> 9  
 <212> БЕЖОК

<213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> Abet0374  
 <400> 338  
 Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 5  
 <210> 339  
 <211> 22  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> Abet0374  
 <400> 339  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Thr Pro Gly Gln  
 5 10 15  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20  
 <210> 340  
 <211> 15  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> Abet0374  
 <400> 340  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15  
 <210> 341  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> Abet0374  
 <400> 341  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Phe Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 342  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0374

<400> 342  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 343  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377

<400> 343  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caactttaac gagcagacc tctggtgggt  
 ccgccaagcc 120

ccagggaaag ggctggagtg ggtctcagtt attggtgtgg ggaccaagaa  
 catcgcctac 180

gcagacaccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300

atggaccact cccgcccta ctactactac ggtatggacg tctggggaca  
 ggggaccctg 360

gtcacctct cctca  
 375

<210> 344  
 <211> 125  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377

<400> 344  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Glu Gln  
 20 25 30  
 Thr Leu Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Val Ile Gly Val Gly Thr Lys Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 345  
 <211> 5  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377

<400> 345  
 Glu Gln Thr Leu Trp  
 5

<210> 346  
 <211> 17  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377

<400> 346  
 Val Ile Gly Val Gly Thr Lys Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Thr Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 347  
 <211> 16  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0377  
  
 <400> 347  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15  
  
 <210> 348  
 <211> 30  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0377  
  
 <400> 348  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn  
 20 25 30  
  
 <210> 349  
 <211> 14  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0377  
  
 <400> 349  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10  
  
 <210> 350  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0377

<400> 350  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15

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

<210> 351  
 <211> 11  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377

<400> 351  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 352  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377

<400> 352  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60

acctgctctg gacataaacac cgagcacaag tggatctctgt ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120

cagtcccctg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180

ttctctgcca ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctacg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 353  
 <211> 106  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377

<400> 353  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Thr Glu His Lys Trp Ile  
 20 25 30  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Thr  
 50 55 60  
 Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 354  
 <211> 11  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377

<400> 354  
 Ser Gly His Asn Thr Glu His Lys Trp Ile Ser  
 5 10

<210> 355  
 <211> 7  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377

<400> 355  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5



<210> 356  
 <211> 9  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377

<400> 356  
 Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 5

<210> 357  
 <211> 22  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377

<400> 357  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 358  
 <211> 15  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377

<400> 358  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 359  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377

<400> 359  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Thr Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 360  
 <211> 10  
 <212> БЕЖИОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377

<400> 360  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 361  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0378

<400> 361  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60

tctgtgcag cctctggatt ccctttgag accgacatca tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attggtacca acaccgacaa  
 cgtcgcttac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300

atggaccact cccgccccta ctactactac ggtatggacg tctggggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 362  
 <211> 125  
 <212> БЕЖИОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0378

<400> 362  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Glu Thr Asp  
 20 25 30  
 Ile Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Val Ile Gly Thr Asn Thr Asp Asn Val Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 363  
 <211> 5  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0378

<400> 363  
 Thr Asp Ile Met Trp  
 5

<210> 364  
 <211> 17  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0378

<400> 364  
 Val Ile Gly Thr Asn Thr Asp Asn Val Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5		10									15				
Gly															
<210>	365														
<211>	16														
<212>	BEJOK														
<213>	Homo sapiens														
<220>															
<223>	Abet0378														
<400>	365														
Glu	Trp	Met	Asp	His	Ser	Arg	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
5					10						15				
<210>	366														
<211>	30														
<212>	BEJOK														
<213>	Homo sapiens														
<220>															
<223>	Abet0378														
<400>	366														
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
5					10							15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Pro	Phe	Glu		
20					25					30					
<210>	367														
<211>	14														
<212>	BEJOK														
<213>	Homo sapiens														
<220>															
<223>	Abet0378														
<400>	367														
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser		
5					10										
<210>	368														
<211>	32														
<212>	BEJOK														
<213>	Homo sapiens														

<220>  
 <223> Abet0378  
  
 <400> 368  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 369  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0378  
  
 <400> 369  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 370  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0378  
  
 <400> 370  
 tcgtacgagt tgaccagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60  
 acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttcct ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120  
 cagtcccctg tcctggatcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180  
 ttctctgect ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctacg 240  
 gatgaggctg actattactg ctcgctcctag gacacgggtga ctcggtgttt  
 cggcggaggg 300  
 accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 371

<211> 106  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0378  
  
 <400> 371  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
 20 25 30  
  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60  
  
 Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
 65 70 75 80  
  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Ter Asp Thr Val Thr Arg Val  
 85 90 95  
  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 372  
 <211> 11  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0378  
  
 <400> 372  
 Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
 5 10

<210> 373  
 <211> 7  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0378

<400> 373  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser

5

<210> 374  
 <211> 9  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0378

<400> 374  
 Ser Ser Ter Asp Thr Val Thr Arg Val  
 5

<210> 375  
 <211> 22  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0378

<400> 375  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 376  
 <211> 15  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0378

<400> 376  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 377  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0378

<400> 377  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 378  
 <211> 10  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0378

<400> 378  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 379  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0379

<400> 379  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60

tctgtgcag cctctggatt cgactttgcc gagacgcctt tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120

ccaggggaga ggctggagtg ggtctcagtt attggtagca accagaacaa  
 gaccgcctac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagga  
 cagctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300

atggaccact cccgcccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 380



<211> 125  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0379  
  
 <400> 380  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ala Glu Thr  
 20 25 30  
 Pro Leu Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Val Ile Gly Ser Asn Gln Asn Lys Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 381  
 <211> 5  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0379

<400> 381  
 Glu Thr Pro Leu Trp  
 5

<210> 382  
 <211> 17  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0379

<400> 382  
 Val Ile Gly Ser Asn Gln Asn Lys Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 383  
 <211> 16  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0379

<400> 383  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 384  
 <211> 30  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0379

<400> 384  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ala  
 20 25 30

<210> 385  
 <211> 14  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0379

<400> 385  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Arg Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 386  
 <211> 32

<212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0379  
  
 <400> 386  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30  
  
 <210> 387  
 <211> 11  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0379  
  
 <400> 387  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10  
  
 <210> 388  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0379  
  
 <400> 388  
 cagagcgtct tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60  
  
 acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttcct ggtatcaaca  
 gaagtcaggc 120  
  
 cagtccctg tcctggatcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180  
  
 ttctctgct ccaactccgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctacg 240  
  
 gatggggctg actattactg tgcgaccag gacaacttca ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300  
  
 accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 389  
 <211> 106  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0379  
  
 <400> 389  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
 20 25 30  
  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60  
  
 Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
 65 70 75 80  
  
 Asp Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Gln Asp Asn Phe Thr Arg Val  
 85 90 95  
  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 390  
 <211> 11  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0379

<400> 390  
 Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
 5 10

<210> 391  
 <211> 7  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0379

<400> 391  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5

<210> 392  
 <211> 9  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0379

<400> 392  
 Ala Thr Gln Asp Asn Phe Thr Arg Val  
 5

<210> 393  
 <211> 22  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0379

<400> 393  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 394  
 <211> 15  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0379

<400> 394  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 395  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0379  
  
 <400> 395  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 396  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0379  
  
 <400> 396  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 397  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380  
  
 <400> 397  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctatggg caacttcaac taccagacta tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120  
 ccagggaggg ggctggagtg ggtctcagtt attggtaaga ccaacgagaa  
 catcgcctac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300  
 atggaccact cccgcccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360  
 gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 398  
 <211> 125  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0380  
  
 <400> 398  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Met Gly Asn Phe Asn Tyr Gln  
 20 25 30  
  
 Thr Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
  
 Ser Val Ile Gly Lys Thr Asn Glu Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
  
 Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110  
  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 399  
 <211> 5  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380

<400> 399  
 Tyr Gln Thr Met Trp  
 5

<210> 400  
 <211> 17  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380  
  
 <400> 400  
 Val Ile Gly Lys Thr Asn Glu Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15  
  
 Gly

<210> 401  
 <211> 16  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380  
  
 <400> 401  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 402  
 <211> 30  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380  
  
 <400> 402  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Met Gly Asn Phe Asn  
 20 25 30

<210> 403  
 <211> 14  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380  
  
 <400> 403  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10



```

<210>      404
<211>      32
<212>      БЕЖОК
<213>      Homo sapiens

<220>
<223>      Abet0380

<400>      404
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 5                               10                               15

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

<210>      405
<211>      11
<212>      БЕЖОК
<213>      Homo sapiens

<220>
<223>      Abet0380

<400>      405
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5                               10

<210>      406
<211>      318
<212>      ДНК
<213>      Homo sapiens

<220>
<223>      Abet0380

<400>      406
tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac
ggccagcatc          60

acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttctt ggtatcaaca
gaagccaggc          120

cagtcccctg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat
ccctgagcga          180

ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac
ccaggctacg          240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt
cggcggaggg          300

```

accaagctga ccgtccta  
318

<210> 407  
<211> 106  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0380

<400> 407  
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15  
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
20 25 30  
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45  
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
50 55 60  
Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
85 90 95  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 408  
<211> 11  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0380

<400> 408  
Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
5 10

<210> 409  
<211> 7  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380  
  
 <400> 409  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5  
  
 <210> 410  
 <211> 9  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0380  
  
 <400> 410  
 Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 5  
  
 <210> 411  
 <211> 22  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0380  
  
 <400> 411  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20  
  
 <210> 412  
 <211> 15  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0380  
  
 <400> 412  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15  
  
 <210> 413  
 <211> 32

<212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0380  
  
 <400> 413  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30  
  
 <210> 414  
 <211> 10  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0380  
  
 <400> 414  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10  
  
 <210> 415  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0381  
  
 <400> 415  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
 cttgagactc 60  
 tcctgtgcag cctcttcccc gtcggtcccg cgggagacca tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120  
 ccaggaaggg ggcttgagtg ggtctcagtt attggtaccc agccgaaccg  
 cttgacgtac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240  
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300  
 atggaccact cccgccccta ctactactac ggtatagacg tctggggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cccca  
375

<210> 416  
<211> 125  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0381

<400> 416  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Pro Ser Phe Pro Arg Glu  
20 25 30  
Thr Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ser Val Ile Gly Thr Gln Pro Asn Arg Leu Thr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ile  
100 105 110  
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Pro  
115 120 125

<210> 417  
<211> 5  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0381

<400> 417  
Arg Glu Thr Met Trp  
5

<210> 418

<211> 17  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0381  
  
 <400> 418  
 Val Ile Gly Thr Gln Pro Asn Arg Leu Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15  
  
 Gly  
  
 <210> 419  
 <211> 16  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0381  
  
 <400> 419  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ile Asp Val  
 5 10 15  
  
 <210> 420  
 <211> 30  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0381  
  
 <400> 420  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Pro Ser Phe Pro  
 20 25 30  
  
 <210> 421  
 <211> 14  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0381  
  
 <400> 421

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
5 10

<210> 422  
<211> 32  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0381

<400> 422  
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
5 10 15

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

<210> 423  
<211> 11  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0381

<400> 423  
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Pro  
5 10

<210> 424  
<211> 318  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0381

<400> 424  
tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgcgtccc caggacagac  
ggccagcatc 60

acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgtttcct ggtatcaaca  
gaagccaggc 120

cagtcccctg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcgac cctcagggat  
ccctgagcga 180

ttctctgect ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
ccaggctacg 240

gatgaggcta actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagcgtt  
 cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 425  
 <211> 106  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0381

<400> 425  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Val  
 20 25 30  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60  
 Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asn Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Ala  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 426  
 <211> 11  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0381

<400> 426  
 Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Val Ser  
 5 10

<210> 427



<211> 7  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0381

<400> 427  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5

<210> 428  
 <211> 9  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0381

<400> 428  
 Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Ala  
 5

<210> 429  
 <211> 22  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0381

<400> 429  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 430  
 <211> 15  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0381

<400> 430  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

```

<210>      431
<211>      32
<212>      БЕЖОК
<213>      Homo sapiens

<220>
<223>      Abet0381

<400>      431
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr
5                               10                               15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asn Tyr Tyr Cys
20                               25                               30

<210>      432
<211>      10
<212>      БЕЖОК
<213>      Homo sapiens

<220>
<223>      Abet0381

<400>      432
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
5                               10

<210>      433
<211>      375
<212>      ДНК
<213>      Homo sapiens

<220>
<223>      Abet0382

<400>      433
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc
cctgaggctc          60

tctgtgcag cctctggatt ccactttacc aactccatca tgtggtgggt
ccgccaggct          120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attggtagcg aggcgcaccg
cgtcacgtac          180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa
cacgctgtat          240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc
gagagagtgg          300

```

atggaccact cccgccccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 434  
 <211> 125  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382

<400> 434  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe His Phe Thr Asn Ser  
 20 25 30  
 Ile Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Val Ile Gly Ser Glu Ala His Arg Val Thr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 435  
 <211> 5  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382

<400> 435  
 Asn Ser Ile Met Trp  
 5

<210> 436  
 <211> 17  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382

<400> 436  
 Val Ile Gly Ser Glu Ala His Arg Val Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 437  
 <211> 16  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382

<400> 437  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 438  
 <211> 30  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382

<400> 438  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe His Phe Thr  
 20 25 30

<210> 439  
 <211> 14  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0382

<400> 439

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
5 10

<210> 440

<211> 32

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0382

<400> 440

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
5 10 15

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

<210> 441

<211> 11

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0382

<400> 441

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
5 10

<210> 442

<211> 318

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0382

<400> 442

tcgtacgagt tgattcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
agccagcatc 60

acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttctt ggtatcaaca  
gaagccaggc 120

cagtcccttg tcctggatcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
ccctgagcga 180

ttctctgcc ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
ccaggctacg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gactcgggtga ctcgagtgtt  
cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
318

<210> 443  
<211> 106  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0382

<400> 443  
Ser Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15  
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
20 25 30  
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45  
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Thr  
50 55 60  
Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Ser Val Thr Arg Val  
85 90 95  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 444  
<211> 11  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0382

<400> 444  
Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
5 10

<210> 445  
 <211> 7  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382

<400> 445  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5

<210> 446  
 <211> 9  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382

<400> 446  
 Ser Ser Gln Asp Ser Val Thr Arg Val  
 5

<210> 447  
 <211> 22  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382

<400> 447  
 Ser Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 448  
 <211> 15  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382

<400> 448

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 449  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382

<400> 449  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Thr Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 450  
 <211> 10  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382

<400> 450  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 451  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0383

<400> 451  
 gaggtgcagc tgttgagtc cgggggagc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacgtttgac tggtagccga tgtggtgggt  
 ccgccaggct 120

ccaggaaga ggctggagtg gatctcagtt attggtgcgg acaacgcca  
 gatcgcctac 180

gcagactccg tgaagggcgg gtttaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240



ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
gagagagtgg 300

atgggccact cccgccccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
ggggaccccg 360

gtcaccgtct cctca  
375

<210> 452  
<211> 125  
<212> EEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0383

<400> 452  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15  
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Trp Tyr  
20 25 30  
Pro Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Ser Val Ile Gly Ala Asp Asn Ala Lys Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Glu Trp Met Gly His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
100 105 110  
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 453  
<211> 5  
<212> EEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0383

<400> 453  
 Trp Tyr Pro Met Trp  
 5

<210> 454  
 <211> 17  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0383

<400> 454  
 Val Ile Gly Ala Asp Asn Ala Lys Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 455  
 <211> 16  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0383

<400> 455  
 Glu Trp Met Gly His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 456  
 <211> 30  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0383

<400> 456  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp  
 20 25 30

<210> 457  
 <211> 14  
 <212> BEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0383

<400> 457

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile Ser  
5 10

<210> 458

<211> 32

<212> БЕЖЮК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0383

<400> 458

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
5 10 15

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

<210> 459

<211> 11

<212> БЕЖЮК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0383

<400> 459

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
5 10

<210> 460

<211> 318

<212> ДНХ

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0383

<400> 460

tcgtacgagt tgactcagcc accctcagta tccgtgtccc caggacagac  
ggccagcatc 60

acctgctctg gacataactt gggagataaa tttgcttctt ggtatcaaca  
gaagccaggc 120

cagtccctg tcctggatcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca ttagcgggac  
 ccaggctacg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300

accaagctga ccgtcctg  
 318

<210> 461  
 <211> 106  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0383

<400> 461  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Gly Asp Lys Phe Ala  
 20 25 30  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60  
 Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 462  
 <211> 11  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0383

<400> 462  
 Ser Gly His Asn Leu Gly Asp Lys Phe Ala Ser  
 5 10

<210> 463  
 <211> 7  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0383

<400> 463  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5

<210> 464  
 <211> 9  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0383

<400> 464  
 Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 5

<210> 465  
 <211> 22  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0383

<400> 465  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 466  
 <211> 15  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0383

<400> 466

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
5 10 15

<210> 467

<211> 32

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0383

<400> 467

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Thr Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 468

<211> 10

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0383

<400> 468

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
5 10

<210> 469

<211> 375

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0343-GL

<400> 469

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
cctgagactc 60

tctgtgcag cctctggatt caactttaac caccaggtga tgtggtgggt  
ccgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attggtaaga ccaacgagaa  
catcgctac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
cagcgtgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
gagagagtgg 300

atggaccact ctgccccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
375

<210> 470  
<211> 125  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0343-GL

<400> 470  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn His Gln  
20 25 30

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

Ser Val Ile Gly Lys Thr Asn Glu Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 471  
<211> 5  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0343-GL

<400> 471

His Gln Val Met Trp

5

<210> 472

<211> 17

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0343-GL

<400> 472

Val Ile Gly Lys Thr Asn Glu Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 473

<211> 16

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0343-GL

<400> 473

Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

5

10

15

<210> 474

<211> 30

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0343-GL

<400> 474

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

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn

20

25

30



<210> 475  
 <211> 14  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343-GL

<400> 475  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 476  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343-GL

<400> 476  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15

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

<210> 477  
 <211> 11  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343-GL

<400> 477  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 478  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343-GL

<400> 478  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60

acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttcct ggtatcaaca  
gaagccaggc 120

cagtcccctg tcttggatcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
ccaggctatg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
318

<210> 479  
<211> 106  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0343-GL

<400> 479  
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
5 10 15  
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
20 25 30  
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45  
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
50 55 60  
Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
85 90 95  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 480  
<211> 11  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343-GL  
  
 <400> 480  
 Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
 5 10

<210> 481  
 <211> 7  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343-GL  
  
 <400> 481  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5

<210> 482  
 <211> 9  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343-GL  
  
 <400> 482  
 Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 5

<210> 483  
 <211> 22  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0343-GL  
  
 <400> 483  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 484  
 <211> 15  
 <212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0343-GL

<400> 484

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
5 10 15

<210> 485

<211> 32

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0343-GL

<400> 485

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 486

<211> 10

<212> EEJIOK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0343-GL

<400> 486

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
5 10

<210> 487

<211> 375

<212> ДHK

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Abet0369-GL

<400> 487

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
cctgagactc 60

tcctgtgcag cctcttcggt ccagatctcg aagaacacta tgttggtgggt  
ccgccaggct 120

ccaggaag ggctggagtg ggtctcagtt attggtaagg acgagaccgc  
 cttcaactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240

ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300

atggaccact cccgcccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 488  
 <211> 125  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0369-GL

<400> 488  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Phe Gln Ile Ser Lys Asn  
 20 25 30  
 Thr Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Val Ile Gly Lys Asp Glu Thr Arg Phe Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 489  
 <211> 5

<212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0369-GL

<400> 489  
 Lys Asn Thr Met Trp  
 5

<210> 490  
 <211> 17  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0369-GL

<400> 490  
 Val Ile Gly Lys Asp Glu Thr Arg Phe Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 491  
 <211> 16  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0369-GL

<400> 491  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 492  
 <211> 30  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0369-GL

<400> 492  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Phe Gln Ile Ser

20		25		30
<210>	493			
<211>	14			
<212>	BEJIOK			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<223>	Abet0369-GL			
<400>	493			
	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser			
	5	10		
<210>	494			
<211>	32			
<212>	BEJIOK			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<223>	Abet0369-GL			
<400>	494			
	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln			
	5	10	15	
	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg			
	20	25	30	
<210>	495			
<211>	11			
<212>	BEJIOK			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<223>	Abet0369-GL			
<400>	495			
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	5	10		
<210>	496			
<211>	318			
<212>	ДНК			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<223>	Abet0369-GL			

<400> 496  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60  
 acctgctctg gacgtaacat cggggacagc tgggtcgcgt ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120  
 cagtcccctg tcctggatcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180  
 ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctatg 240  
 gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300  
 accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 497  
 <211> 106  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0369-GL

<400> 497  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Arg Asn Ile Gly Asp Ser Trp Val  
 20 25 30  
 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60  
 Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 498  
 <211> 11



<212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0369-GL  
  
 <400> 498  
 Ser Gly Arg Asn Ile Gly Asp Ser Trp Val Ala  
 5 10  
  
 <210> 499  
 <211> 7  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0369-GL  
  
 <400> 499  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5  
  
 <210> 500  
 <211> 9  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0369-GL  
  
 <400> 500  
 Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 5  
  
 <210> 501  
 <211> 22  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> Abet0369-GL  
  
 <400> 501  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 502  
 <211> 15  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0369-GL

<400> 502  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 503  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0369-GL

<400> 503  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 504  
 <211> 10  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0369-GL

<400> 504  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 505  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL

<400> 505  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgagactc 60

tctgtgcag cctctggatt caactttaac gagcagaccc tctgggtgggt  
 ccgccaagcc 120

ccagggaaag ggctggagtg ggtctcagtt attgggtgtgg ggaccaagaa  
 catcgcctac 180

gcagacaccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300

atggaccact cccgcccta ctactactac ggtatggacg tctggggaca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca  
 375

<210> 506  
 <211> 125  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL

<400> 506  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Glu Gln  
 20 25 30  
 Thr Leu Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Val Ile Gly Val Gly Thr Lys Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 507  
 <211> 5  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL

<400> 507  
 Glu Gln Thr Leu Trp  
 5

<210> 508  
 <211> 17  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL

<400> 508  
 Val Ile Gly Val Gly Thr Lys Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Thr Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 509  
 <211> 16  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL

<400> 509  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 510  
 <211> 30  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL

<400> 510  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

5                               10                               15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn  
 20                               25                               30

<210>       511  
 <211>       14  
 <212>       БЕЖОК  
 <213>       Homo sapiens

<220>  
 <223>       Abet0377-GL

<400>       511  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5                               10

<210>       512  
 <211>       32  
 <212>       БЕЖОК  
 <213>       Homo sapiens

<220>  
 <223>       Abet0377-GL

<400>       512  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5                               10                               15

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

<210>       513  
 <211>       11  
 <212>       БЕЖОК  
 <213>       Homo sapiens

<220>  
 <223>       Abet0377-GL

<400>       513  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5                               10

<210>       514  
 <211>       318  
 <212>       ДНК  
 <213>       Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL  
  
 <400> 514  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60  
  
 acctgctctg gacataacac cgagcacaag tggatctctg ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120  
  
 cagtcccttg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180  
  
 ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctatg 240  
  
 gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300  
  
 accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 515  
 <211> 106  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL  
  
 <400> 515  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15  
  
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Thr Glu His Lys Trp Ile  
 20 25 30  
  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60  
  
 Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
 65 70 75 80  
  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 85 90 95  
  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 516  
 <211> 11  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL

<400> 516  
 Ser Gly His Asn Thr Glu His Lys Trp Ile Ser  
 5 10

<210> 517  
 <211> 7  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL

<400> 517  
 Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
 5

<210> 518  
 <211> 9  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL

<400> 518  
 Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
 5

<210> 519  
 <211> 22  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL

<400> 519  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 520  
 <211> 15  
 <212> БЕЖЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL

<400> 520  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 521  
 <211> 32  
 <212> БЕЖЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL

<400> 521  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 522  
 <211> 10  
 <212> БЕЖЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0377-GL

<400> 522  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

<210> 523  
 <211> 375  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380-GL



<400> 523  
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc  
cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctatggg caacttcaac taccagacta tgtggtgggt  
ccgccaggct 120  
ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcagtt attggtaaga ccaacgagaa  
catcgcctac 180  
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
gagagagtgg 300  
atggaccact cccgcccta ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
ggggaccctg 360  
gtcaccgtct cctca  
375

<210> 524  
<211> 125  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0380-GL

<400> 524  
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Met Gly Asn Phe Asn Tyr Gln  
20 25 30  
Thr Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ser Val Ile Gly Lys Thr Asn Glu Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 525  
 <211> 5  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380-GL

<400> 525  
 Tyr Gln Thr Met Trp  
 5

<210> 526  
 <211> 17  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380-GL

<400> 526  
 Val Ile Gly Lys Thr Asn Glu Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 527  
 <211> 16  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380-GL

<400> 527  
 Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 10 15

<210> 528  
 <211> 30  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380-GL

<400> 528  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Met Gly Asn Phe Asn  
 20 25 30

<210> 529  
 <211> 14  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380-GL

<400> 529  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 530  
 <211> 32  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380-GL

<400> 530  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15

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

<210> 531  
 <211> 11  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380-GL

<400> 531  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 532  
 <211> 318

<212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380-GL

<400> 532  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60

acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttctt ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120

cagtcccctg tcctgggtcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctatg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta  
 318

<210> 533  
 <211> 106  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0380-GL

<400> 533  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
 20 25 30

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

Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 534  
<211> 11  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0380-GL

<400> 534  
Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
5 10

<210> 535  
<211> 7  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0380-GL

<400> 535  
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
5

<210> 536  
<211> 9  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0380-GL

<400> 536  
Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
5

<210> 537  
<211> 22  
<212> BEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0380-GL

<400> 537  
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

5		10		15											
Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys										
20															
<210>	538														
<211>	15														
<212>	БЕЛЮК														
<213>	Homo sapiens														
<220>															
<223>	Abet0380-GL														
<400>	538														
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr	
5					10					15					
<210>	539														
<211>	32														
<212>	БЕЛЮК														
<213>	Homo sapiens														
<220>															
<223>	Abet0380-GL														
<400>	539														
Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser	Gly	His	Thr	Ala	Thr
5									10						15
Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Met	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys
20															30
<210>	540														
<211>	10														
<212>	БЕЛЮК														
<213>	Homo sapiens														
<220>															
<223>	Abet0380-GL														
<400>	540														
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu						
5															10
<210>	541														
<211>	375														
<212>	ДНК														
<213>	Homo sapiens														

<220>  
 <223> Abet0382-GL

<400> 541  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc  
 cctgaggctc 60

tctgtgagc cctctggatt ccactttacc aactccatca tgtggtgggt  
 ccgcccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attggtagcg aggcgcaccg  
 cgtcacgtac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa  
 cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc  
 gagagagtgg 300

atggaccact cccgcccca ctactactac ggtatggacg tctgggggca  
 ggggaccctg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 542  
 <211> 125  
 <212> BEJOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382-GL

<400> 542  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe His Phe Thr Asn Ser  
 20 25 30

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

Ser Val Ile Gly Ser Glu Ala His Arg Val Thr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Trp Met Asp His Ser Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met





<220>  
 <223> Abet0382-GL  
  
 <400> 546  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15  
  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe His Phe Thr  
 20 25 30

<210> 547  
 <211> 14  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382-GL  
  
 <400> 547  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 5 10

<210> 548  
 <211> 32  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382-GL  
  
 <400> 548  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 5 10 15  
  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 549  
 <211> 11  
 <212> BEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382-GL  
  
 <400> 549  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

<210> 550  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382-GL

<400> 550  
 tcgtacgagt tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac  
 ggccagcatc 60

acctgctctg gacataactt ggaagataaa tttgcttcct ggtatcaaca  
 gaagccaggc 120

cagtcccttg tcctggatcat ctatcgagat gacaagcggc cctcagggat  
 ccctgagcga 180

ttctctgcct ccaactctgg gcacactgcc actctgacca tcagcgggac  
 ccaggctatg 240

gatgaggctg actattactg ttcgtcccag gacacgggtga ctcgagtgtt  
 cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta 318

<210> 551  
 <211> 106  
 <212> EEJIOK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382-GL

<400> 551  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala  
 20 25 30

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

Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly His Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 552  
<211> 11  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0382-GL

<400> 552  
Ser Gly His Asn Leu Glu Asp Lys Phe Ala Ser  
5 10

<210> 553  
<211> 7  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0382-GL

<400> 553  
Arg Asp Asp Lys Arg Pro Ser  
5

<210> 554  
<211> 9  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0382-GL

<400> 554  
Ser Ser Gln Asp Thr Val Thr Arg Val  
5

<210> 555  
<211> 22  
<212> EEJIOK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Abet0382-GL

<400> 555

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
 20

<210> 556  
 <211> 15  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382-GL

<400> 556  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 5 10 15

<210> 557  
 <211> 32  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382-GL

<400> 557  
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser Gly His Thr Ala Thr  
 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 558  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Abet0382-GL

<400> 558  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 5 10

**Последовательности человеческого Аβ1-42, человеческого Аβ1-40, человеческого Аβ17-42, человеческого Аβ1-43, мышинного Аβ1-42 и усечений**

Биотинилированный человеческий бета-амилоидный 1-42 пептид:  
Биотин-DAEFRHDSGYEVNHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 559).

Человеческий бета-амилоидный 1-42 пептид:  
DAEFRHDSGYEVNHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 560).

Биотинилированный человеческий бета-амилоидный 1-40 пептид:  
Биотин-DAEFRHDSGYEVNHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO: 561).

Человеческий бета-амилоидный 1-40 пептид:  
DAEFRHDSGYEVNHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO: 562).

Мышиный бета-амилоидный 1-42 пептид:  
DAEFGHDSGFVVRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 563).

Биотинилированный мышиный бета-амилоидный 1-42 пептид:  
Биотин-DAEFGHDSGFVVRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 564).

Биотинилированный-LC-мышинный бета-амилоидный 1-42 пептид:  
Биотин-(линкерная цепь)-  
DAEFGHDSGFVVRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 565).

Мышиный бета-амилоидный 1-40 пептид:  
DAEFGHDSGFVVRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO: 566).

Биотинилированный-LC-мышинный бета-амилоидный 1-40 пептид:  
Биотин-(линкерная цепь)-DAEFGHDSGFVVRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV  
(SEQ ID NO: 567).

Биотинилированный скремблированный бета-амилоидный 1-42 пептид:  
Биотин-AIAEGDSHVLKEGAYMEIFDVQGHVFGGLIFRVVDLGSNNVA (SEQ ID NO: 568).

Человеческий бета-амилоидный 1-43 пептид:  
DAEFRHDSGYEVNHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT (SEQ ID NO: 569).

Человеческий бета-амилоидный 29-42 усеченный пептид:  
KKKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 570).

Человеческий бета-амилоидный 29-40 усеченный пептид:  
KKKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO: 571).

Человеческий бета-амилоидный 1-16 усеченный пептид:  
DAEFRHDSGYEVNHQK (SEQ ID NO: 572).

Человеческий бета-амилоидный 11-22 усеченный пептид:  
EVRHQKLVFFAE (SEQ ID NO: 573).

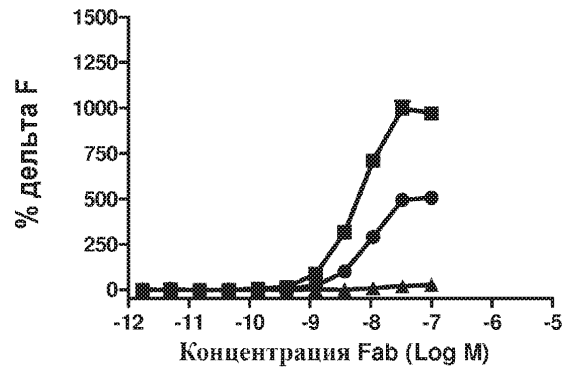
Человеческий бета-амилоидный 12-28 усеченный пептид:  
VRHQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 574).

Человеческий бета-амилоидный 17-42 усеченный пептид:  
LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 575).

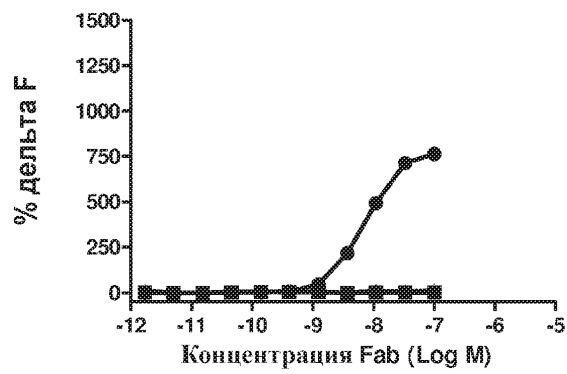
Человеческий бета-амилоидный 11-42 усеченный пептид:  
EVRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 576).

Человеческий бета-амилоидный 3-42 усеченный пептид:  
EFRHDSGYEVHMQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 577).

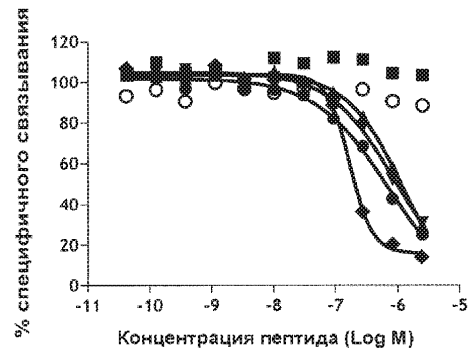
A



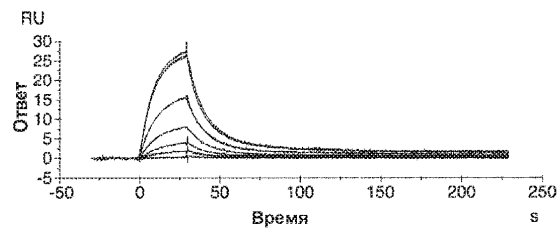
B



Фигура 1

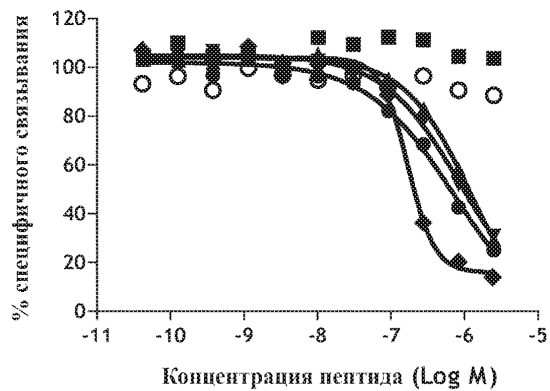


Фигура 2

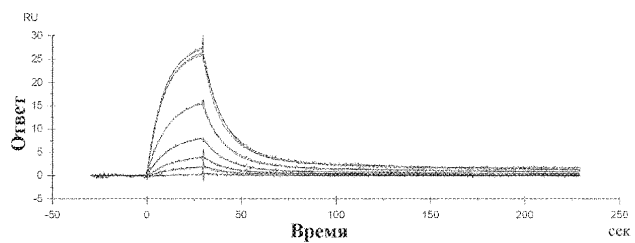


Фигура 3





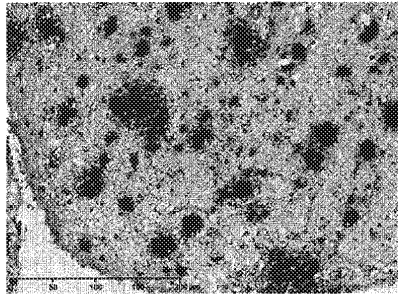
Фигура 2



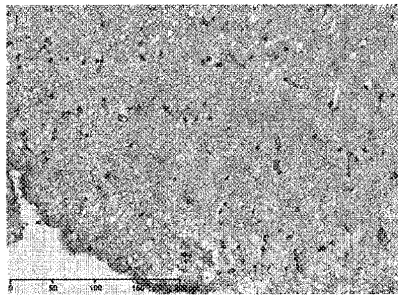
Фигура 3

A

A

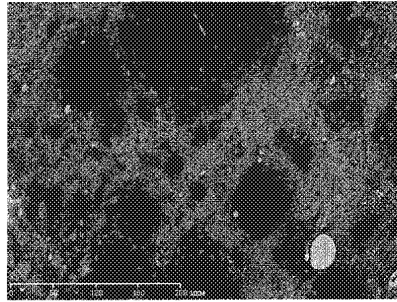


B

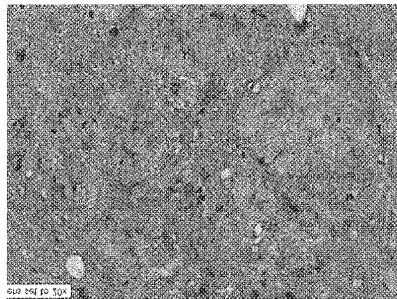


Фигура 4

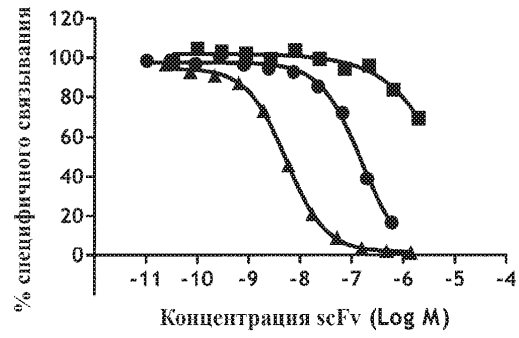
c



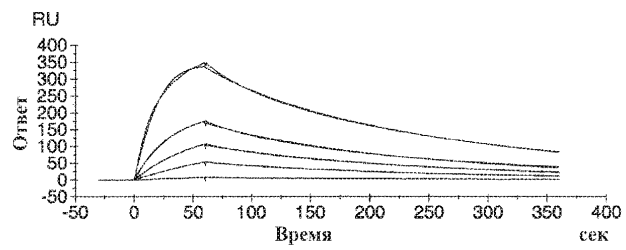
d



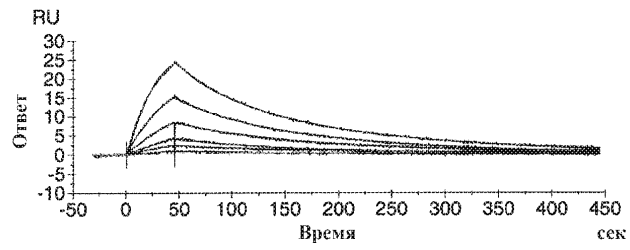
Фигура 4



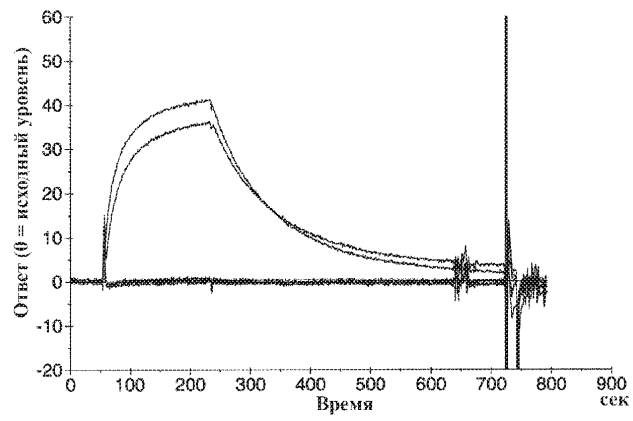
Фигура 5



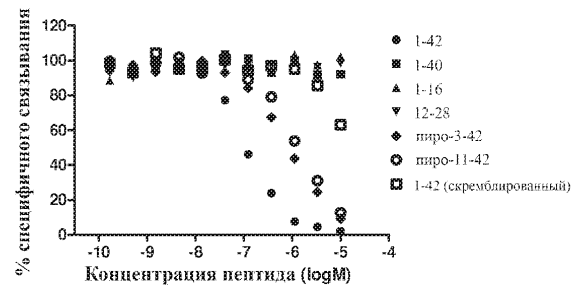
Фигура 6



фигура 7

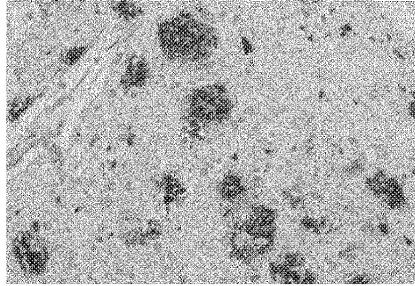


фигура 8

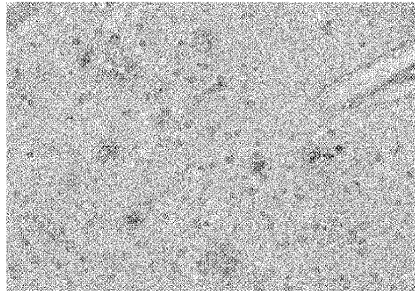


Фигура 9

А

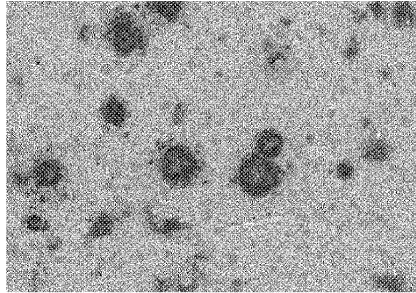


Б

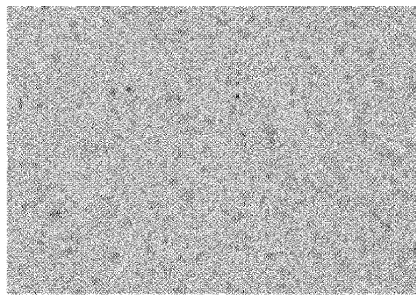


Фигура 10

c



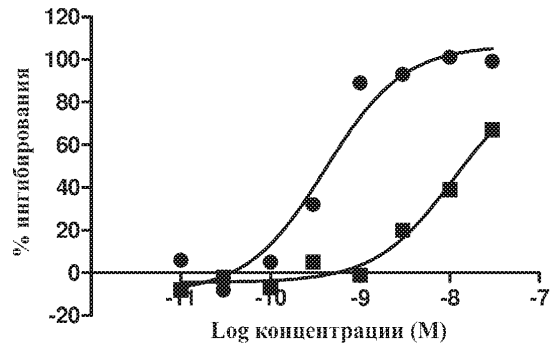
d



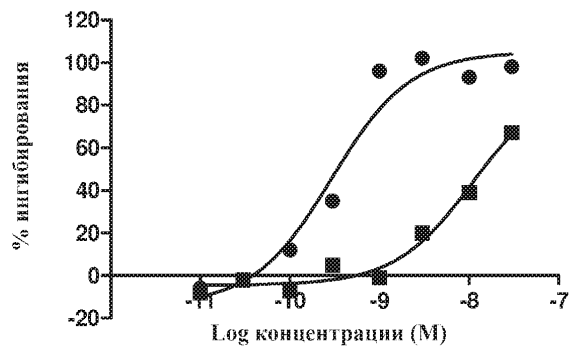
Фигура 10



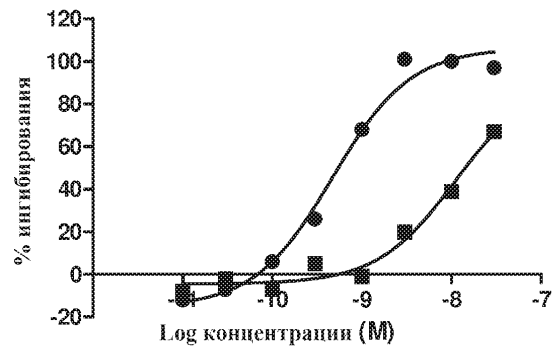
A



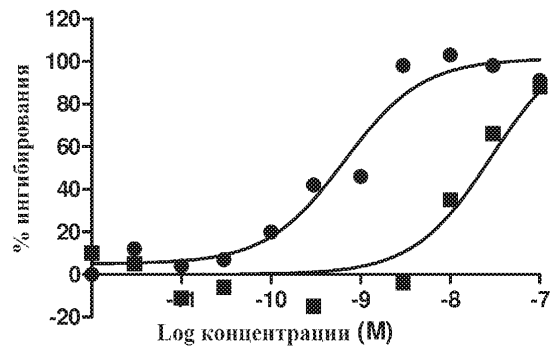
B



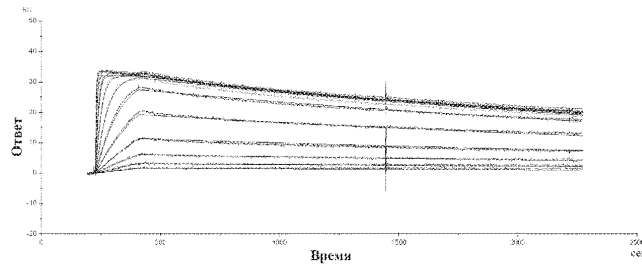
Фигура 11



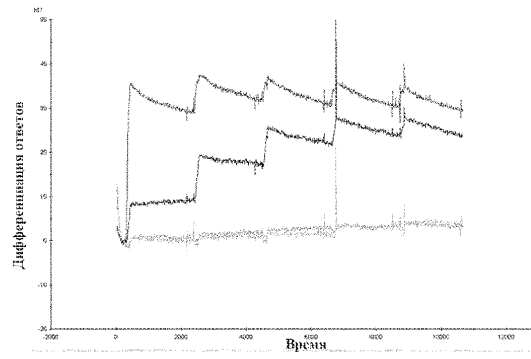
c  
d



Фигура 11

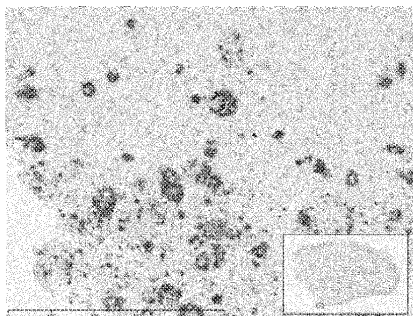


Фигура 12

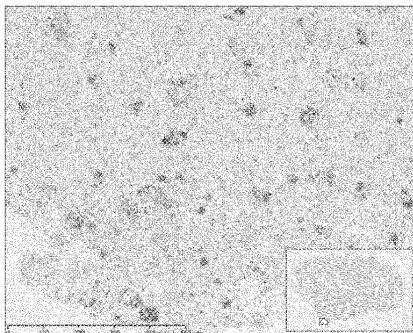


Фигура 13

A

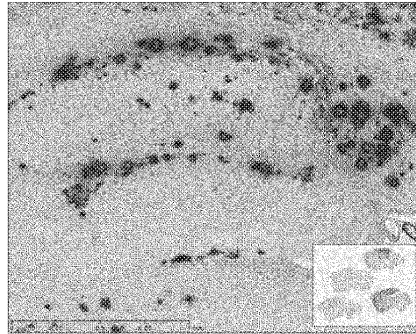


B

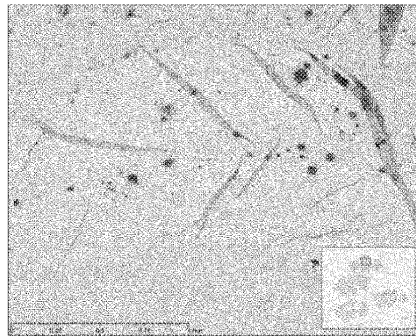


фигура 14

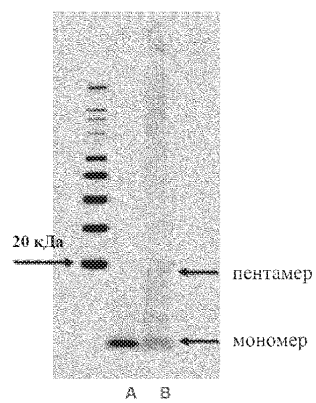
с



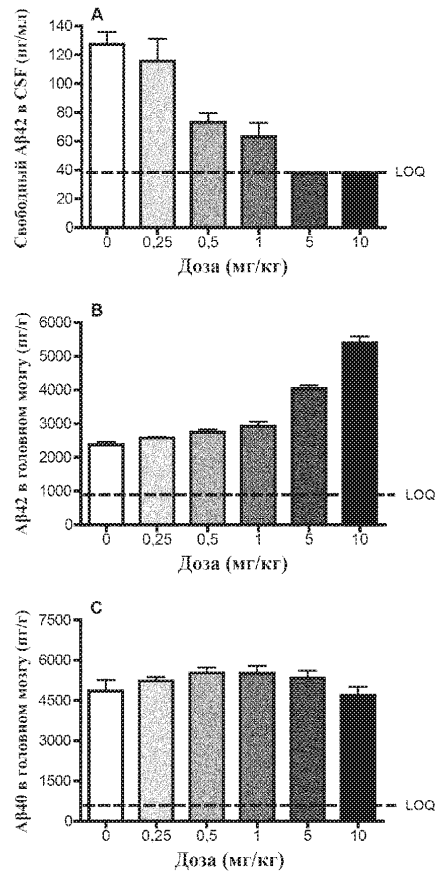
д



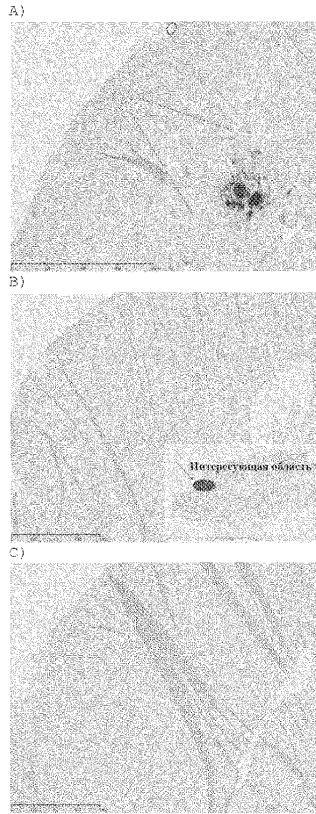
Фигура 14



Фигура 15

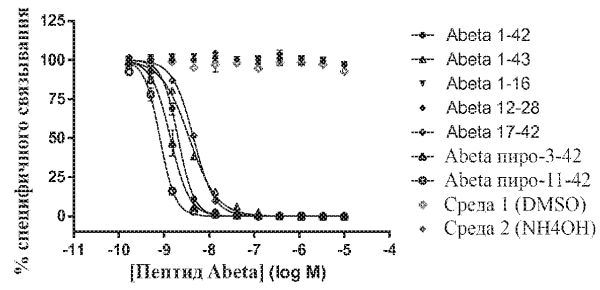


Фигура 16

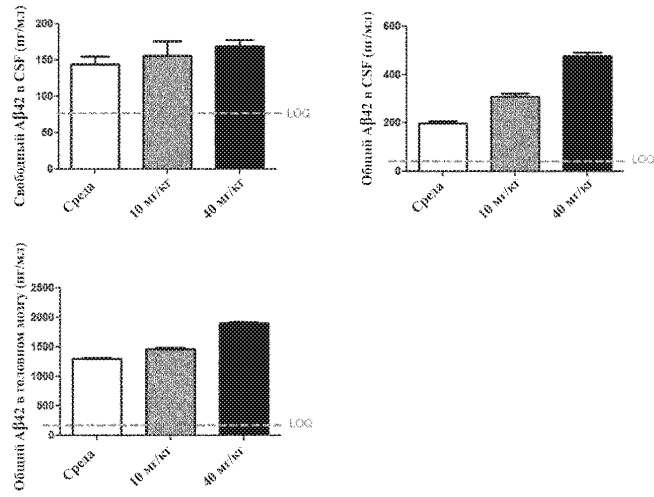


Фигура 17





Фигура 18



Фигура 19