

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение в основном касается гуманизированных антител, специфических в отношении рецептора лимфотоксина- β (LT- β -R).

Уровень техники

Рецептор лимфотоксина- β (в данном контексте обозначаемый LT- β -R) является представителем семейства фактора некроза опухолей, которое играет хорошо охарактеризованную роль как в развитии иммунной системы, так и в функциональной поддержке ряда клеток иммунной системы, включая фолликулярные дендритные клетки и некоторые типы стромальных клеток (см. статью Matsumoto и соавт., *Immunol. Rev.*, 156:137, (1997)). Известные лиганды LT- β -R включают в себя LT α 1/ β 2 и второй лиганд, называемый LIGHT (см. статью Maugl и соавт., *Immunity*, 8:21, (1998)). Было показано, что активация LT- β -R индуцирует апоптотическую гибель некоторых линий раковых клеток *in vivo* (PCT/US96/01386). Воздействие агентов, активирующих агонист LT- β -R, таких как специфические гуманизированные антитела против LT- β -R, было бы, таким образом, эффективным для лечения или уменьшения риска развития, тяжести или последствий новообразования у субъектов (например, человека).

Сущность изобретения

В данном изобретении представлены гуманизированные антитела против рецептора лимфотоксина- β (LT- β -R) и способы применения данных антител для лечения или уменьшения риска развития, тяжести или последствий неоплазии у субъектов (например, человека).

В частности, изобретение охватывает гуманизированное антитело, которое специфически связывает LT- β -R (например, человеческий LT- β -R). Данное антитело содержит гипервариабельные участки (т.е. участки, определяющие комплементарность) легкой цепи, определенные остатками аминокислот 24-34, 50-56 и 89-97 последовательности SEQ ID NO:1 и/или гипервариабельные участки тяжелой цепи, определенные остатками аминокислот 31-35, 50-66 и 99-109 последовательности SEQ ID NO:2 и, кроме того, в своей легкой цепи содержит по меньшей мере один (например, 1, 2, 3, 4 или 5) из следующих остатков: K3, W41, I46, Q69 и Y71, или в своей тяжелой цепи содержит по меньшей мере один (например, 1, 2, 3, 4 или 5) из следующих остатков: F37, T40, A49, M89 и V93 (соглашение о нумерации Kabat).

Гуманизированное антитело, соответствующее данному изобретению, может содержать последовательность вариабельного домена легкой цепи, определенного остатками аминокислот 1-107 последовательности SEQ ID NO:8 и/или последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, определенного остатками аминокислот 1-120 последовательности SEQ ID NO:16. Гуманизированное антитело может также содержать такие же полипептидные последовательности тяжелой и/или легкой цепей, как у антитела, продуцируемого клеточной линией E46.4 (наименование патентного депозита ATCC PTA-3357) или клеточной линией E77.4 (наименование патентного депозита ATCC PTA-3765).

В другом варианте осуществления изобретения гуманизированное антитело, соответствующее данному изобретению, практически сохраняет связывающие свойства исходного антитела. В одном из вариантов осуществления гуманизированное антитело, соответствующее данному изобретению, связывает LT- β -R с функциональной аффинностью, например от приблизительно 1 до приблизительно 10 пМ, альтернативно, от приблизительно 10 до приблизительно 20 пМ, альтернативно, от приблизительно 20 до приблизительно 30 пМ, альтернативно, от приблизительно 30 до приблизительно 40 пМ, альтернативно, от приблизительно 40 до приблизительно 50 пМ, альтернативно, от приблизительно 50 до приблизительно 60 пМ, альтернативно, от приблизительно 60 до приблизительно 70 пМ, альтернативно, от приблизительно 70 до приблизительно 80 пМ и, альтернативно, от приблизительно 80 до приблизительно 90 пМ, где функциональную аффинность измеряют с помощью FACS (флуоресцентный способ разделения клеток лимфоцитов) в соответствии с примером 8.

В другом варианте осуществления изобретения гуманизированное антитело, соответствующее данному изобретению, связывают с иммунотоксином (например, цепью рицина А и токсином *Pseudomonas*). Гуманизированное антитело, соответствующее данному изобретению, может быть также связано с химиотерапевтическим лекарственным веществом (например, адриамицином, 5FU (5-фторурацилом), винбластином, актиномицином D, этопозидом, цисплатином, метотрексатом и доксорубицином) или с радиоактивным изотопом. Данное изобретение охватывает также комбинированную терапию, например терапию, при которой гуманизированное антитело, соответствующее данному изобретению, связанное с иммунотоксином, используют в комбинации с гуманизированным антителом, соответствующим данному изобретению, которое связано с химиотерапевтическим агентом. Кроме того, данное изобретение охватывает композицию, пригодную для введения млекопитающему (т.е. человеку), имеющему опухоль, которая характеризуется сверхэкспрессией LT β R. Композиция содержит а) гуманизированное антитело против LT β R либо в виде монокомпонента, либо связанное с иммунотоксином или химиотерапевтическим лекарством, и б) цитотоксический фактор, при этом каждый из компонентов присутствует в количествах, эффективных для уменьшения объема опухоли при введении млекопитающему. Цитотоксический фактор может включать в себя, например, TNF- α , TNF- β , ИЛ-1, INF- γ , ИЛ-2. Альтернативно цитотоксический фактор может быть представлен химиотерапевтическим лекарственным веществом. Химиотерапевтическое лекарственное вещество может включать в себя, например, адриамицин, 5FU, винбла-

стин, актиномицин D, этопозид, цисплатин, метотрексат и доксорубин.

Антитело, соответствующее данному изобретению, может быть представлено, например, целым антителом (т.е. имеющим две легкие цепи полной длины и две тяжелые цепи полной длины) любого изотипа и подтипов (например, IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 и IgA2); альтернативно оно может являться антиген-связывающим фрагментом (например, Fab, (F(ab')₂ и Fv) целого антитела. Данным изобретением охвачена также композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель; выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую SEQ ID NO:8, выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую SEQ ID NO:16, выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую легкую цепь антитела, продуцируемого клеточной линией E46.4 (наименование патентного депозита ATCC PTA-3357), или клеточной линией E77.4 (наименование патентного депозита ATCC PTA-3765); выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела, продуцируемого клеточной линией E46.4 (наименование патентного депозита ATCC PTA-3357), или клеточной линией E77.4 (наименование патентного депозита ATCC PTA-3765); выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую остатки 1-107 последовательности SEQ ID NO:8 и выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую остатки 1-120 последовательности SEQ ID NO:16.

Данное изобретение охватывает также клетки из клеточных линий, которые продуцируют гуманизованное антитело против LTβR, включая, например, клеточную линию E46.4 (наименование патентного депозита ATCC PTA-3357) и клеточную линию E77.4 (наименование патентного депозита ATCC PTA-3765). В одном варианте осуществления изобретения клеточная линия продуцирует от приблизительно 250 до приблизительно 300 мг/л данного антитела, альтернативно клеточная линия продуцирует от приблизительно 300 до приблизительно 350 мг/л данного антитела, альтернативно клеточная линия продуцирует от приблизительно 350 до приблизительно 400 мг/л данного антитела, альтернативно клеточная линия продуцирует от приблизительно 400 до приблизительно 450 мг/л данного антитела, альтернативно клеточная линия продуцирует от приблизительно 450 до приблизительно 500 мг/л данного антитела, альтернативно клеточная линия продуцирует от приблизительно 500 до приблизительно 550 мг/л данного антитела и альтернативно клеточная линия продуцирует от приблизительно 550 до приблизительно 600 мг/л данного антитела. Концентрацию антитела, продуцируемого клеточными линиями, измеряют как титр при сборе из 10-суточной культуры с подпиткой.

В данном изобретении представляют также способ лечения или уменьшения риска развития, тяжести или последствий неоплазии у субъекта (например, человека), предусматривающий введение субъекту эффективного количества антитела, соответствующего изобретению. Эффективное количество композиции может быть введено в одной или более дозах. В другом варианте осуществления данное изобретение представляет способ лечения или уменьшения риска развития, тяжести или последствий неоплазии у субъекта (например, человека), предусматривающий введение субъекту эффективного количества антитела, соответствующего изобретению, и цитотоксического фактора. Цитотоксический фактор может включать в себя, например, TNF-α, TNF-β, ИЛ-1, INF-γ, ИЛ-2. Альтернативно цитотоксический фактор может быть представлен химиотерапевтическим лекарственным веществом. Химиотерапевтическое лекарственное вещество может включать в себя, например, адриамицин, 5FU, винбластин, актиномицин D, этопозид, цисплатин, метотрексат и доксорубин.

Перечень фигур чертежей и иных материалов

На фиг. 1 (связанные антитела) и 2 (растворимые антитела) представлены графики цитотоксичности в отношении клеток WiDr. На графиках показаны mCBE11 (мышинное антитело) (ромбы), huCBE11#2 (гуманизованное антитело против LT-β-R, содержащее вариант 2 легкой цепи (VL#2) и вариант 2 тяжелой цепи (VH#2)) (кружки), huCBE11#4 (гуманизованное антитело против LT-β-R, содержащее вариант 3 легкой цепи (VL#3) и вариант 4 тяжелой цепи (VH#4)) (звездочки).

На фиг. 3 (связанные антитела) и 4 (растворимые антитела) представлены графики, показывающие агонистический эффект ИЛ-8 в отношении клеток A375. На графиках показаны антитела mCBE11 (ромбы), huCBE11 #2 (гуманизованное антитело против LT-β-R, содержащее вариант 2 легкой цепи (VL#2) и вариант 2 тяжелой цепи (VH#2)) (кружки), huCBE11#4 (гуманизованное антитело против LT-β-R, содержащее вариант 3 легкой цепи (VL#3) и вариант 4 тяжелой цепи (VH#4)) (звездочки).

На фиг. 5 представлен график зависимости объема опухоли от дней введения. На графике показаны mCBE11 (треугольники), huCBE11#4 (гуманизованное антитело против LT-β-R, содержащее вариант 3 легкой цепи (VL#3) и вариант 4 тяжелой цепи (VH#4)) (кружки), а также группа, не получающая лечение (квадраты).

На фиг. 6 представлен график зависимости выживаемости животных (в процентах) от дней после прививания опухоли. На графике показаны mCBE11 (треугольники), huCBE11#4 (гуманизованное антитело против LT-β-R, содержащее вариант 3 легкой цепи и вариант 4 тяжелой цепи) (кружки), а также группа, не получающая лечение (квадраты).

На фиг. 7 представлен график зависимости объема опухоли от дней после прививания опухоли. На графике показаны huCBE11#4 (гуманизованное антитело против LT-β-R, содержащее вариант 3 легкой

цепи (VL#3) и вариант 4 тяжелой цепи (VH#4)) (кружки) и контрольная группа, не получающая лечение (квадраты).

На фиг. 8 представлен график зависимости объема ранее выросшей опухоли от дней, прошедших после лечения. На графике показаны контрольная группа (квадраты), введение huCBE11 #4 (гуманизованное антитело против LT-β-R, содержащее вариант 3 легкой цепи (VL#3) и вариант 4 тяжелой цепи (VH#4)) в различных дозах: 500 мкг (кружки), 100 мкг (треугольники) и 20 мкг (ромбы) и mCBE11 (крестики).

На фиг. 9 представлен график зависимости выживаемости животных с ранее выросшими опухолями (в процентах) от дней, прошедших после лечения. На графике показаны контрольная группа (квадраты), введение huCBE11 #4 (гуманизованное антитело против LT-β-R, содержащее вариант 3 легкой цепи (VL#3) и вариант 4 тяжелой цепи (VH#4)) в различных дозах: 500 мкг (кружки), 100 мкг (треугольники) и 20 мкг (ромбы) и mCBE11 (крестики).

На фиг. 10 представлен график зависимости средней интенсивности флуоресценции от концентрации huCBE11 #4 в логарифмическом масштабе.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Идентификационные номера последовательностей.

Последовательности нуклеотидов и аминокислот, упоминаемые в описании, получили следующие идентификационные номера последовательностей:

SEQ ID NO:1 - последовательность аминокислот вариательной области тяжелой цепи mCBE11.

SEQ ID NO:2 - последовательность аминокислот вариательного домена легкой цепи mCBE11.

SEQ ID NO:3 - последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области легкой цепи гуманизованного антитела CBE11 (вариант 1-VL#1).

SEQ ID NO:4 - последовательность аминокислот вариательной области легкой цепи гуманизованного CBE11 (вариант 1-VL#1).

SEQ ID NO:5 - последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области легкой цепи гуманизованного CBE11 (вариант 2-VL#2).

SEQ ID NO:6 - последовательность аминокислот вариательной области легкой цепи гуманизованного CBE11 (вариант 2-VL#2).

SEQ ID NO:7 - последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области легкой цепи гуманизованного CBE11 (вариант 3-VL#3).

SEQ ID NO:8 - последовательность аминокислот вариательной области легкой цепи гуманизованного CBE11 (вариант 3-VL#3).

SEQ ID NO:9 - последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области тяжелой цепи гуманизованного CBE11 (вариант 1-VH#1).

SEQ ID NO:10 - последовательность аминокислот вариательной области тяжелой цепи гуманизованного CBE11 (вариант 1-VH#1).

SEQ ID NO:11 - последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области тяжелой цепи гуманизованного CBE11 (вариант 2-VH#2).

SEQ ID NO:12 - последовательность аминокислот вариательной области тяжелой цепи гуманизованного CBE11 (вариант 2-VH#2).

SEQ ID NO:13 - последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области тяжелой цепи гуманизованного CBE11 (вариант 3-VH#3).

SEQ ID NO:14 - последовательность аминокислот вариательной области тяжелой цепи гуманизованного CBE11 (вариант 3-VH#3).

SEQ ID NO:15 - последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области тяжелой цепи гуманизованного CBE11 (вариант 4-VH#4).

SEQ ID NO:16 - последовательность аминокислот вариательной области тяжелой цепи гуманизованного CBE11 (вариант 4-VH#4).

SEQ ID NO:17 - праймер FR1 для интродукции сайта Bsu361.

SEQ ID NO:18 - праймер FR2 для интродукции сайтов NciI и HpaII.

SEQ ID NO:19 - праймер FR3 для интродукции сайтов Bsu361 и PstI.

SEQ ID NO:20 - праймер FR2 для интродукции сайта SmaI.

SEQ ID NO:21 - праймер FR3 для интродукции сайта PvuI.

SEQ ID NO:22 - праймер FR2 для интродукции сайтов SmaI и HhaI.

SEQ ID NO:23 - праймер FR3 для интродукции сайтов PvuII и FspI.

SEQ ID NO:24 - праймер FR1 для интродукции сайтов HinfI и NsiI.

SEQ ID NO:25 - праймер FR2 для интродукции сайтов HaeIII и HhaI.

SEQ ID NO:26 - праймер FR3 для интродукции сайтов Bsu361, DdeI и PstI.

SEQ ID NO:27 - праймер FR1 для интродукции сайта EcoRV.

SEQ ID NO:28 - праймер FR3 для интродукции сайта RsaI.

SEQ ID NO:29 - праймер FR1 для интродукции сайта EcoRV.

SEQ ID NO:30 - праймер FR2 для интродукции сайта HindIII.

SEQ ID NO:31 - праймер FR3 для интродукции сайта RsaI.

SEQ ID NO:32 - полная легкая цепь huCBE11 (вариант 3), включающая константный домен.

SEQ ID NO:33 - полная тяжелая цепь huCBE11 (вариант 4), включающая константный домен.

Определения.

Термин "гуманизированное антитело", как используют в данном контексте, относится в данном случае к антителу, полученному из нечеловеческого, как правило, мышинового антитела, которое сохраняет или практически сохраняет антиген-связывающие свойства исходного антитела, но которое менее иммуногенно для человека.

Термин "гипервариабельный участок" ("участок, определяющий комплементарность") (CDR), как используют в данном контексте, относится к последовательностям аминокислот, которые, взятые вместе, определяют аффинность и специфичность связывания природного Fv-фрагмента связывающего центра нативного иммуноглобулина, как это описано в работе Kabat и соавт., (1991).

Термин "каркасная (скелетная) область", как используют в данном контексте, относится к последовательностям аминокислот, расположенным между участками CDR. Данные фрагменты антитела служат для поддержания CDR в соответствующей ориентации (дают возможность CDR связывать антиген).

Термин "константная область", как используют в данном контексте, относится к части молекулы антитела, которая определяет эффекторные функции. В данном изобретении мышинные константные области замещены человеческими константными областями. Константные области данных химерных или гуманизированных антител получены из человеческих иммуноглобулинов. Константная область тяжелой цепи может быть выбрана из любого из пяти изоформ: α , δ , ϵ , γ или μ . Кроме того, тяжелые цепи различных подклассов (таких как подклассы тяжелых цепей IgG) являются ответственными за различные эффекторные функции и, таким образом, можно получить антитела с желательной эффекторной функцией посредством выбора желательной константной области тяжелой цепи. Предпочтительными константными областями являются $\gamma 1$ (IgG1), $\gamma 3$ (IgG3) и $\gamma 4$ (IgG4). Более предпочтительным является Fc-фрагмент изоформа $\gamma 1$ (IgG1). Константная область легкой цепи может быть представлена κ - или λ -типом, предпочтительно κ -типом.

Термин "химерное антитело", как используют в данном контексте, относится к антителу, содержащему последовательности, выделенные из двух различных антител, которые, как правило, принадлежат организмам разных видов. Чаще всего химерные антитела содержат фрагменты человеческого и мышинового антитела, обыкновенно, человеческую константную и мышиную вариабельную область.

Термин "иммуногенность", как используют в данном контексте, относится к степени способности направленного белка или терапевтической молекулы вызывать иммунный ответ (гуморальный или клеточный) при введении реципиенту. Данное изобретение касается иммуногенности определенных гуманизированных антител.

Термин "гуманизированные антитела с пониженной иммуногенностью" относится к гуманизированным антителам, проявляющим пониженную иммуногенность относительно исходного антитела, например мышинового антитела.

Термин "гуманизированное антитело, практически сохраняющее связывающие свойства исходного антитела", относится к гуманизированному антителу, которое сохраняет способность специфически связывать антиген, распознаваемый исходным антителом, используемым для получения данного гуманизированного антитела. Предпочтительно, если гуманизированное антитело будет проявлять такую же или практически такую же антигенсвязывающую аффинность и авидность, как у исходного антитела. В идеальном случае аффинность антитела не будет ниже, чем 10% аффинности исходного антитела, более предпочтительно не ниже, чем приблизительно 30%, и наиболее предпочтительно аффинность не будет ниже, чем приблизительно 50% от уровня аффинности исходного антитела. Способы анализа антиген-связывающей аффинности хорошо известны в области техники и включают анализы полумаксимального связывания, конкурентные анализы и анализ по Scatchard. Подходящие анализы связывания антигена описаны в данной заявке.

Данное изобретение направлено на гуманизированные моноклональные антитела, которые связывают человеческий LT- β -R, и их применение в качестве терапевтических агентов. Кроме того, данное изобретение направлено на последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют указанные гуманизированные антитела, и их экспрессию в рекомбинантных клетках-хозяевах. Более конкретно, данное изобретение направлено на гуманизированные антитела, полученные из мышинового CBE11, которое специфически связывает человеческий LT- β -R.

Мышиное CBE11 (mCBE11) представляет собой мышинное IgG1-к-антитело, выделенное у мыши, иммунизированной человеческим слитым белком LT- β -R-Ig (см. статью Browning и соавт., J. Immunol., 154:33, (1995)). mCBE11 функционально активирует LT- β -R как *in vivo*, так и *in vitro* (PCT/US96/01386), и были описаны его выделение и противоопухолевые свойства (см. статью Browning и соавт., J. Exp. Med., 183:867, (1996)). Гибридная клеточная линия, которая продуцирует mCBE11, была предварительно депонирована заявителями данного изобретения в Американской коллекции клеточных культур

(ATCC) в соответствии с условиями Будапештского договора и получила регистрационный номер ATCC HB 11793. (PCT/US96/01386). Заявители показали также, что перекрестное связывание рецептора LT-β с различными агонистическими антителами против LT-β-R активирует рецептор LT-β (т.е. может имитировать эффекты природных лигандов). (PCT/US96/01386). Было показано, что активация рецептора, в свою очередь, подавляет рост опухоли в ряде моделей опухолей *in vivo*, в которых происходит экспрессия рецептора LT-β. Рецептор LT-β, как было показано, экспрессируется на ряде раковых клеток, включая, например, клетки немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), клетки колоректального рака (CRC), клетки рака молочной железы, а также на клетках рака простаты, желудка, кожи, пищевода и мочевого пузыря. Неограничивающие примеры опухолей, которые ингибируют агонистические антитела против LT-β-R, включают в себя следующие солидные опухоли: аденокарциному толстой кишки HT29, карциному шейки матки HT3, меланому A375, карциному молочной железы MDA-231 и первичные опухоли толстой кишки. Вследствие этого, агонистические антитела против LT-β-R обладают свойствами, обуславливающими их эффективность при лечении заболеваний, при которых желательна активация LT-β-R и/или модуляция взаимодействия LT-β-R/лиганда LT-β-R, включая, например, лечение или уменьшение риска развития, тяжести или последствий неоплазии у субъектов (например, человека).

В данном контексте описана гуманизация моноклонального антитела mCBE11, включая анализ на модели и обратные мутации, необходимые для сохранения в значительной мере свойств связывания моноклонального антитела mCBE11.

Анализ на модели мышинных варибельных областей.

Наиболее вероятно, что CDR содержат остатки, которые связывают антиген, и они должны быть сохранены в реконструированном антителе. CDR определяются последовательностью согласно работе Kabat и соавт., Последовательность белков, представляющих иммунологический интерес (Последовательность of Proteins of Immunological Interest) (5 изд., The United States Department of Health and Human Services, The United States Government Printing Office, 1991). CDR относятся к установленным классам (см. статью Chothia и соавт., Nature, 342: 877-883, (1989)), в которых ключевые остатки в значительной степени определяют структурную конформацию петли CDR. Данные остатки почти всегда остаются в реконструированном антителе. Ниже представлена полипептидная последовательность варибельного домена легкой цепи mCBE11, где CDR выделены подчеркиванием и номера положений остатков указаны в соответствии с системой нумерации по Kabat

1 DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITCKAGQDIK SYLSWYQQKP
41 WKSPKILIIY ATRLADGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLES
81 DDTATYYCLO HGESPWTFGG GTKLEIK
(SEQ ID NO:1).

Ниже представлена полипептидная последовательность варибельного домена тяжелой цепи mCBE11, где CDR выделены подчеркиванием и номера положений остатков указаны в соответствии с системой нумерации по Kabat

1 EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS DYYMYWFRQT
41 PEKRLEWVAT ISDGGSYTTY PDSVKGRFTI SRDNAKNNLY
81 LQMSSLKSED TAMYYCVREE NGNFYFDYW GQGTITVTVSS
(SEQ ID NO:2).

Варибельные легкие и тяжелые цепи mCBE11 сравнивали с консенсусными последовательностями мышинной и человеческой подгрупп (см. работу Johnson G., Wu T., T. Kabat, База данных и ее применение - перспективные направления исследований нуклеиновых кислот (Database and its applications: future directions Nucleic Acid Research), 29, 205-206, (2001); статью Wu и Kabat, J. Exp. Med., 132:211-250, (1970)) при использовании программы FASTA. Варибельная легкая цепь mCBE11 является членом мышинной подгруппы V с идентичностью 74% на участке перекрывания из 110 аминокислот и варибельная тяжелая цепь mCBE11 является членом мышинной подгруппы III с идентичностью 79% на участке перекрывания из 132 аминокислот. Варибельная легкая цепь соответствует человеческой подгруппе I с идентичностью 66% на участке перекрывания из 113 аминокислот. Варибельная тяжелая цепь соответствует человеческой подгруппе III с идентичностью 71% на участке перекрывания из 131 аминокислоты.

CDR, соответствующие данному изобретению, были разделены на установленные классы. Петля L1 относится к установленному классу 2 (петля из 11 остатков), L2 - к классу 1 (7 остатков) и L3 - к классу 1 (9 остатков). Петля H1 относится к классу 1 (5 остатков) и петля H2 - к классу 3 (17 остатков). Петля H3 не принадлежит к установленному классу.

Были определены остатки на границе варибельных легкой и тяжелой цепей (см. статью Chothia и соавт., J. Mol. Biol., 186:651-663, (1985)). Они, как правило, сохраняются в реконструированном антителе. В mCBE11 некоторые из данных остатков являются необычными для границы цепей, а именно S34, I46, L89, H91 в VL и Y35, F37, V93, E95 в VH.

Необычные каркасные остатки определены путем анализа всех последовательностей мышинных и человеческих варибельных цепей в версии базы данных Kabat от сентября 1999 г. [NCBI, NIH]. Считают, что специфические отличия mCBE11, возможно, указывают на соматические мутации, которые по-

вышают связывающую активность, если данные отличия находятся близко к центру связывания. Необычные для мышинной молекулы остатки, более удаленные от центра связывания, и необычные для человеческой молекулы остатки удаляли в случаях, когда они могли бы образовать иммуногенные эпитопы в реконструированном антителе. Необычные каркасные остатки, обнаруженные в mCBE11, представлены K3, M11, Y12, W41, Q69, S72, D81, T83 в легкой цепи и F37, T40, E42, A49, N77 в тяжелой цепи. Хотя большинство из данных остатков не сохраняются в гуманизированных антителах CBE11, некоторые из данных необычных каркасных остатков сохраняются, включая, например, F37 и A49 в тяжелых цепях.

Моделирование структуры переменных областей.

Легкую и тяжелую цепи, соответствующие данному изобретению, сопоставляют с сокращенной базой данных, с целью установления структурных основ для применения при конструировании трехмерных моделей легких и тяжелых цепей mCBE11. При использовании программы BLAST было обнаружено, что легкая цепь имеет последовательность, идентичную на 93% моноклональному мышинному антителу 5g9 (1AHW), и было обнаружено, что тяжелая цепь имеет последовательность, идентичную на 81% фрагменту Fab мышинного антитела IGGA2 (Fab 17/9) (1 IGH). С помощью пакета по молекулярному моделированию Sybyl (Tripos Inc.) были созданы трехмерные структуры легкой и тяжелой цепей при использовании легкой цепи 5g9 и тяжелой цепи фрагмента Fab IGGA2, соответственно. Структурную целостность модели оценивали с помощью компьютерной программы и сочли приемлемой.

Разработка реконструированных переменных областей.

Гомологический анализ используют для выбора человеческих акцепторных каркасов, с целью "присоединения" участков CDR mCBE11. Поиск как в базе данных Kabat, так и в сокращенной базе данных из NCBI, ENTRZ (Национальные институты здоровья (The National Institutes of Health)) проводили с использованием программного обеспечения BLAST. Выбор человеческих акцепторных каркасов делают на основе идентичности последовательностей каркасов mCBE11 и каркасов человеческих антител (за исключением каркасов ранее гуманизированных антител).

Человеческие каркасные (скелетные) области могут быть выбраны из антитела TNF- α ICL (kabat No 004770) против человеческого α -фактора некроза опухолей (см. статью Griffiths и соавт., EMBO J., 12:725-734, (1993)) для переменной легкой (VL) цепи (к-подгруппа I человека) и антитела FLA-IgG'CL (Kabat No 040003) неизвестной специфичности (см. статью Malisan и соавт., Blood, 87:717-724, (1996)) для переменной тяжелой (VH) цепи (подгруппа III человека). Человеческие каркасные VL и VH отличаются по 15 и 11 остаткам по сравнению с мышинными последовательностями.

Обратные мутации человеческих каркасов.

Самой непредсказуемой процедурой гуманизации моноклональных антител является идентификация важных каркасных остатков исходного антитела (т.е. в данном случае родительского антитела мышинной природы), которые необходимо оставить, чтобы сохранить в значительной степени связывающие свойства исходного антитела и в то же самое время снизить до минимума потенциальную иммуногенность полученного антитела. Особенно важным является сохранение обязательных остатков, остатков упаковки границы цепей и необычных остатков мышинных молекул, которые находятся близко к центру связывания. Кроме того, принимают во внимание остатки в "Зоне Vernier" (образующие платформу, на которой находятся CDR) (см. статью Foote и Winter, J. Mol. Biol., 224:487-499, (1992)) и остатки, расположенные близко от H3 CDR. Мутации, возвращающие обратно к исходному антителу (т.е. обратный мутационный процесс от остатков человеческого каркаса к мышинному), обозначаются в данном контексте, как обратные мутации.

Было получено три варианта переменной легкой реконструированной цепи (hu-CBE11 VL) и четыре варианта переменной тяжелой реконструированной цепи (hu-CBE11 VH). Как правило, первый вариант содержит наибольшее количество обратных мутаций, а третий вариант - наименьшее (т.е. является наиболее гуманизированным), за исключением четвертого варианта hu-CBE11 VH. Данное изобретение предусматривает гуманизированные антитела, выделенные из mCBE11, которые имеют переменную легкую цепь, выбранную из переменных легких цепей, описанных ниже (т.е. VL#1, VL#2 или VL#3) и переменную тяжелую цепь, выбранную из переменных тяжелых цепей, описанных ниже (т.е. VH#1, VH#2, VH#3 или VH#4) в любой комбинации.

(A) Легкая цепь:

3 Q (глутамин)->K (лизин). Данная замена сохраняется в первом варианте, поскольку предшествующие эксперименты по реконструированию показали (см., например, статью Kolbinger и соавт., Prot. Eng., 6:971-980, (1993)), что она могла бы быть важной в плане связывания антигена или конформации CDR.

41 G (глицин)->W (триптофан). Данная замена сохраняется в первом и втором вариантах.

46 L (лейцин)->I (изолейцин). Данная замена сохраняется в первом и втором вариантах, поскольку этот остаток является одновременно пограничным остатком и находится в Зоне Vernier. Кроме того, он является необычным остатком, встречающимся 9 раз в мышинных последовательностях и один раз в человеческой. Вероятно, он влияет на упаковку переменных цепей и может контактировать с CDR.

69 T (треонин)->Q (глутамин). Данный остаток находится в Зоне Vernier и может влиять на кон-

формацию CDR. Замена короткого остатка Т на более длинный остаток Q может также означать, что он контактирует с антигеном. Q является необычным остатком, встречающимся 58 раз в мышинной и два раза в человеческой последовательности. Он сохраняется в первом варианте.

71 F (фенилаланин)->Y (тирозин). Данный остаток находится в обязательном положении и сохраняется во всех вариантах. Он также является относительно необычным для человеческих последовательностей, где встречается только 25 раз.

(В) Тяжелая цепь:

37 V (валин)->F (фенилаланин). Данная замена сохраняется в первом, втором и четвертом вариантах. F в данном положении является необычным остатком и встречается только 15 раз в мышинной и 18 раз в человеческой последовательности. Он также является пограничным остатком.

40 A (аланин)->T (треонин). Данная замена сохраняется в первом варианте. Мутация в данном положении была апробирована в 5 предшествующих экспериментах по гуманизации, хотя никогда не была представлена заменой А на Т. Один из примеров представлен заменой А на S в работе с VgE-3 (см. статью Couto и соавт., Hybridoma, 13:215-219, (1994)), где была повышена аффинность связывания, хотя причина никогда не была установлена. В данном случае тяжелая цепь также принадлежала к подгруппе III человека.

49 S (серин)->A (аланин). Данный остаток находится под CDR и в Зоне Vernier и сохранен во всех вариантах.

89 V (валин)->M (метионин). Данная замена сохраняется в первом варианте. В данном положении в нескольких экспериментах по гуманизации произошла обратная мутация.

93 A (аланин)->V (валин). Данное положение одновременно является пограничным остатком и находится в Зоне Vernier. Данная замена сохраняется в первом и втором вариантах.

Получены следующие последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот каждого из различных вариантов переменных легкой и тяжелой цепей:

Реконструированные переменные легкие цепи

Реконструированная переменная легкая цепь CBE11 - вариант 1 легкой цепи (VL#1) (Плазмида pAND066)

```

1  GATATTAAGATGACCCAGTCTCCATCATCCTTGCTGTCATCGGTGGGAGACAGGGTCACT 60
  D I K M T Q S P S S L S A S V G D R V T
  aa3
61  ATCACTTGCAAGCGGGTCCAGGACATTAAGCTATTAAAGCTGGTACCAGCAGAAACCA 120
  I T C K A G Q D I K S Y L S W Y Q Q K P
121 TGGAAAGCGCCTAAGATCCTGATCCTATATGCAACAAGGTGGCAGATGGGGTCCCATCA 180
  W K A P K I L I Y Y A T R L A D G V P S
  aa41 aa46
181 AGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATACTCTAACCATCAGCAGCCTGCAGCCT 240
  R F S G S G S G Q D Y T L T I S S L Q P
  aa69 aa71
241 GAGGATTCGCAACTTATCTGTCTACAGCATGGTGAGAGCCCGTGGACGTTGGTGGGA 300
  E D F A T Y Y C L Q H G E S P W T F G G
301 GGCACCAAGCTGGAGATCAA 321
  G T K L E I K

```

SEQ ID NO:3 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты вышеописанной реконструированной VL#1.

SEQ ID NO:4 представляет собой последовательность аминокислот вышеописанной реконструированной VL#1.

Реконструированная переменная легкая цепь CBE11 - вариант 2 легкой цепи (VL#2) (Плазмида pAND070)

```

1  GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCATCCTTGCTGTCATCGGTGGGAGACAGGGTCACT 60
  D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
61  ATCACTTGCAAGCGGGTCCAGGACATTAAGCTATTAAAGCTGGTACCAGCAGAAACCA 120
  I T C K A G Q D I K S Y L S W Y Q Q K P
121 TGGAAAGCGCCTAAGATCCTGATCCTATATGCAACAAGGTGGCAGATGGGGTCCCATCA 180
  W K A P K I L I Y Y A T R L A D G V P S
  aa41 aa46
181 AGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTATACTCTAACCATCAGCAGCCTGCAGCCT 240
  R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
  aa71
241 GAGGATTCGCAACTTATCTGTCTACAGCATGGTGAGAGCCCGTGGACGTTGGTGGGA 300
  E D F A T Y Y C L Q H G E S P W T F G G
301 GGCACCAAGCTGGAGATCAA 321
  G T K L E I K

```

SEQ ID NO:5 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты вышеописанной реконструированной VL#2.

SEQ ID NO:6 представляет собой последовательность аминокислот вышеописанной реконструированной VL#2.

Реконструированная переменная легкая цепь CBE11 - вариант 3 легкой цепи (VL#3) (Плазмида pAND074)

```

1 GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCATCCTTGTCTGCATCGGTGGGAGACAGGGTCACT 60
  D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
61 ATCACTTGCAAGGCGGGTCCAGGACATTAAGCTATTAAAGCTGGTACCAGCAGAAACCA 120
  I T C K A G Q D I K S Y L S W Y Q Q K P
121 GGGAAAGCGCTAAGCCCTGATCTATTATGCAACAAGGTTGGCAGATGGGGTCCCATCA 180
  G K A P K L L I Y Y A T R L A D G V P S
181 AGATTGAGTGGCACTGGTACAGATTACTCTAACCATCAGCAGCTGCAGCCT 240
  R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
241 GAGGATTCGCAACTTACTGTCTACAGCATGCTGAGAGCCCGTGGACGTTCCGTTGGA 300
  E D F A T Y Y C L Q H G E S P W T F G G
      aa71
301 GGCACCAAGCTGAGATCAAA 321
  G T K L E I K

```

SEQ ID NO:7 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты вышеописанной реконструированной VL#3.

SEQ ID NO:8 представляет собой последовательность аминокислот вышеописанной реконструированной VL#3.

Реконструированные вариабельные тяжелые цепи.

Реконструированная вариабельная тяжелая цепь CBE11 - вариант 1 тяжелой цепи (VH#1) (Плазмида pAND067)

```

1 GAGGTACAACCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTC 60
  E V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L
61 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACTATTACATGTATTGGTTTCGCCAGACT 120
  S C A A S G F T F S D Y Y M Y W F R Q T
121 CCGGAAAGGGCTGGAGTGGTCCCAACCATTAGTGTGGTGGTAGTTACACCTACTAT 180
  P G K G L E W V A T I S D G G S Y T Y Y
      aa37 aa40
181 CCAGACAGTGTGAAGGGCGATTCCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGCCTCTAC 240
  P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
      aa49
241 CTGCAGATGAGCAGCCTGAGGGCTGAGGACACAGCCTGTATTACTGTGTAAAGAGAGGAG 300
  L Q M S S L R A E D T A M Y Y C V R E E
      aa89 aa93
301 AATGGTAACTTTTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTCCCGTCTCCTCA 360
  N G N F Y Y F D Y W G Q G T T V T V S S

```

SEQ ID NO:9 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты вышеописанной реконструированной VH#1.

SEQ ID NO:10 представляет собой последовательность аминокислот вышеописанной реконструированной VH#1.

Реконструированная вариабельная тяжелая цепь CBE11 - вариант 2 тяжелой цепи (VH#2) (Плазмида pAND071)

```

1 GAGGTACAACCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTC 60
  E V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L
61 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACTATTACATGTATTGGTTTCGCCAGGCC 120
  S C A A S G F T F S D Y Y M Y W F R Q A
121 CCGGAAAGGGCTGGAGTGGTCCCAACCATTAGTGTGGTGGTAGTTACACCTACTAT 180
  P G K G L E W V A T I S D G G S Y T Y Y
      aa37
181 CCAGACAGTGTGAAGGGCGATTCCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGCCTCTAC 240
  P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
      aa49
241 CTGCAGATGAGCAGCCTGAGGGCTGAGGACACAGCCTGTATTACTGTGTAAAGAGAGGAG 300
  L Q M S S L R A E D T A V Y Y C V R E E
      aa93
301 AATGGTAACTTTTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTCCCGTCTCCTCA 360
  N G N F Y Y F D Y W G Q G T T V T V S S

```

SEQ ID NO:11 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты вышеописанной реконструированной VH#2.

SEQ ID NO:12 представляет собой последовательность аминокислот вышеописанной реконструированной VH#2.

Реконструированная вариабельная тяжелая цепь CBE11 - вариант 3 тяжелой цепи (VH#3) (Плазмида pAND075)

```

1 GAGGTACAACCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTC 60
  E V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L
61 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACTATTACATGTATTGGGTGCCAGGCC 120
  S C A A S G F T F S D Y Y M Y W V R Q A
121 CCGGAAAGGGCTGGAGTGGTCCCAACCATTAGTGTGGTGGTAGTTACACCTACTAT 180
  P G K G L E W V A T I S D G G S Y T Y Y
      aa49
181 CCAGACAGTGTGAAGGGCGATTCCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGCCTCTAC 240
  P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
241 CTGCAGATGAGCAGCCTGAGGGCTGAGGACACAGCCTGTATTACTGCGCAAGAGAGGAG 300
  L Q M S S L R A E D T A V Y Y C A R E E
301 AATGGTAACTTTTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTCCCGTCTCCTCA 360
  N G N F Y Y F D Y W G Q G T T V T V S S

```

SEQ ID NO:13 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты вышеописанной реконструированной VH#3.

SEQ ID NO:14 представляет собой последовательность аминокислот вышеописанной реконструированной VH#3.

Реконструированная переменная тяжелая цепь CBE11 - вариант 4 тяжелой цепи (VH#4) (Плазмида pAND090)

```

1  GAGGTACAAC TGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGGCTC 60
  E V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L
61  TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCACTGACTATTACATGATATGGTTTCGCCAGGCC 120
  S C A A S G F T F S D Y Y M Y W F R Q A
121  CCGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAACCATTAGTGTGGTGGTAGTTACACCTACTAT 180
  P G K G L E W V A T I S D G G S Y T Y Y
181  CCAGACAGTCTGAAGGGGCGATTCCACATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGCCTCTAC 240
  P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
241  CTGCAGATGAGCAGCCTGAGGGCTGAGGACACAGCTGTGTATTACTGCCCAAGAGAGGAG 300
  L Q M S S L R A E D T A V Y Y C A R E E
301  AATGGTAAC TTTTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCCAGCTCACCGTCTCCTCA 360
  N G N F Y Y F D Y W G Q G T T V T V S S

```

SEQ ID NO:15 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты вышеописанной реконструированной VH#4.

SEQ ID NO:16 представляет собой последовательность аминокислот вышеописанной реконструированной VH#4.

Были получены и использованы в последующих исследованиях антитела, состоящие из различных вариантов легких и тяжелых цепей. Например, получено антитело, состоящее из реконструированного варианта 3 легкой переменной цепи (VL#3) huCBE11 и реконструированного варианта 4 тяжелой переменной цепи (VH#4) huCBE11, называемое huCBE11#4 или hCBE11. Клеточные линии E46.4 и E77.4, продуцирующие данное антитело, депонированы в коллекции ATCC (наименование патентных депозитов ATCC PTA-3357 и 3765, соответственно).

Далее изобретение касается эквивалентов и вариантов реконструированных последовательностей VH и VL, т.е. последовательностей, содержащих одну или более замен консервативной аминокислоты, которая существенным образом не влияет на связывание LT-β-R. Гуманизированные антитела против LT-β-R, содержащие данные гуманизированные переменные последовательности тяжелых и легких цепей, могут быть получены рекомбинантными способами, как описано в примерах.

Применение

Гуманизированные антитела против LT-β-R, соответствующие данному изобретению, применяют для лечения болезненных состояний, при которых активация LT-β-R является терапевтически эффективной. Данные состояния включают в себя лечение, предупреждение или снижение риска развития, тяжести или последствий неоплазии.

В одном из вариантов осуществления изобретения представлен способ лечения у млекопитающего (т.е. человека) состояния, ассоциированного с нежелательной пролиферацией клеток, посредством введения млекопитающему терапевтически эффективного количества композиции, содержащей гуманизированные антитела против LT-β-R, соответствующие настоящему изобретению.

В другом варианте осуществления изобретения представлен способ лечения млекопитающего (т.е. человека) с солидной опухолью (т.е. карциномой), которая характеризуется сверхэкспрессией LT-β-R, предусматривающий введениеданному млекопитающему гуманизированного антитела против LT-β-R, которое связывает LT-β-R, в количестве, эффективном для уменьшения объема опухоли. Примеры форм рака, пролиферация клеток которого модулируется посредством LT-β-R, могут быть обнаружены путем измерения *in vitro* уровня транскрипта LT-β-R и/или лиганда LT-β-R (т.е. LTα1β2 или LIGHT), экспрессирующегося в библиотеках опухолевых тканей. Подходящими были бы библиотеки опухолевых тканей, в которых транскрипт LT-β-R и/или лиганда LT-β-R (т.е. LTα1β2 или LIGHT) экспрессируется на высоком уровне. Типы опухолей, рассматриваемые в данном изобретении, содержат солидные опухоли, включающие в себя без ограничения перечисленным клетки немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), клетки колоректального рака (CRC), клетки рака молочной железы, а также рака простаты, желудка, кожи, пищевода и мочевого пузыря.

Гуманизированные антитела, соответствующие данному изобретению, которые используют для лечения состояний, ассоциированных с нежелательной пролиферацией клеток, в частности терапии опухолей, эффективно подавляют рост опухолевых клеток, что измерено, например, по снижению объема опухоли, больше, чем на приблизительно 10, 20, 30 или 40% и, что наиболее эффективно, больше, чем на 50%. Гуманизированные антитела получают путем скрининга (см., например, обсуждение в примере 3). Например, гуманизированные антитела для использования в данном изобретении можно выбрать на основе уменьшенного объема опухоли по сравнению с нелечеными раковыми клетками (например, более чем на приблизительно 10, 20, 30, 40 или 50%).

В данном изобретении представлены также фармацевтические композиции, содержащие гуманизированное антитело, соответствующее данному изобретению, и фармацевтически приемлемый наполнитель. Например, подходящие носители и их составы описаны в Справочнике по фармацевтическим нау-

кам Ремингтона (Remington' Pharmaceutical Sciences), 16 изд., 1980, Mack Publishing Co., под ред. Oslo и соавт. Как правило, чтобы сделать состав изотоническим, в составе используют соответствующее количество фармацевтически приемлемой соли. Примеры носителя включают в себя буферы, такие как физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. pH раствора предпочтительно составляет от приблизительно 5 до приблизительно 8 и более предпочтительно от приблизительно 7,4 до приблизительно 7,8. Кроме того, носители включают в себя препараты с задержанным выходом, такие как полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров. При этом данные матрицы представлены в виде частиц определенной формы, например липосом, пленок или микрочастиц. Для компетентных специалистов будет очевидным, что некоторые носители могут быть более предпочтительными, например, в зависимости от способа введения и концентрации вводимой фармацевтической композиции.

Введение может быть осуществлено путем инъекции (например, внутривенной, внутривенной, подкожной, внутримышечной) или другими способами, такими как инфузия, которая в эффективной форме обеспечивает доставку в кровоток.

Гуманизированные антитела, соответствующие данному изобретению, могут быть введены в эффективной дозе, с целью лечения определенного клинического состояния, на которое оно направлено. Определение предпочтительного фармацевтического препарата и терапевтически эффективной схемы дозирования для данного варианта применения находится в компетенции квалифицированного специалиста, принимающего во внимание, например, массу тела и состояние больного, длительность желательного лечения и переносимость лечения больным. Например, эффективная доза будет лежать в интервале от приблизительно 0,05 до приблизительно 100 миллиграмм/килограмм массы тела/сутки. В частности, приблизительно 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 мг/кг массы тела/сутки. Альтернативно приблизительно от 0,05 до приблизительно 100 мг, в частности приблизительно 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 мг/кг массы тела/неделю. Альтернативно, приблизительно от 0,05 до приблизительно 100 мг, в частности приблизительно 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 мг/кг массы тела/две недели. Альтернативно приблизительно от 0,05 до приблизительно 100 миллиграмм, в частности приблизительно 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 мг/кг массы тела/три недели. Альтернативно приблизительно от 0,05 до приблизительно 100 мг, в частности приблизительно 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 мг/кг массы тела/четыре недели.

При реализации данного изобретения будут использованы, если не указано иначе, традиционные методики клеточной биологии, клеточных культур, молекулярной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК, химии белка и иммунологии, которые входят в компетенцию квалифицированного специалиста в данной области. Данные методики описаны в литературе. См., например, монографии Лабораторное руководство по молекулярному клонированию (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 2 изд., под ред. Sambrook, Fritsch и Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Клонирование ДНК (DNA Cloning), тт. I и II (под ред. D.N. Glover), 1985; Синтез олигонуклеотидов (Oligonucleotide Synthesis), (под ред. M.J. Gait), 1984; патент США No. 4683195, выданный Mullis и соавт.; монографии Гибридизация нуклеиновых кислот (Nucleic Acid Hybridization) под ред. B.D. Hames и S.J. Higgins, 1984; Транскрипция и трансляция (Transcription and Translation) под ред. B.D. Hames и S.J. Higgins, 1984; Культура клеток животных (Culture of Animal Cells) под ред. R.I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987; Иммуобилизованные клетки и ферменты (Immobilized Cells and Enzymes), IRL Press, 1986; В. Perbal, Практическое руководство по молекулярному клонированию (A Practical Guide to Molecular Cloning), 1984; Методы энзимологии (Methods in Enzymology), тт. 154 и 155, под ред. Wu и соавт., Academic Press, New York; Векторы для переноса генов для клеток млекопитающих (Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells), под ред. J.H. Miller и M.P. Calos, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; Иммуохимические методы в клеточной и молекулярной биологии (Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology), под ред. Mayer и Walker, Academic Press, London, 1987; Справочник по экспериментальной иммунологии (Handbook of Experiment Immunology) тт. I-IV, под ред. D.M. Weir и C.C. Blackwell, 1986; сборник Манипуляции с мышными эмбрионами (Manipulating the Mouse Embryo), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

Следующие примеры представлены с целью иллюстрации данного изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие его.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Конструирование и экспрессия chCBE11.

кДНК, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей мышинового CBE11, используют для конструирования векторов для экспрессии мышино-человеческих химер (chCBE11), в которых переменные области muCBE11 связаны с человеческим IgG1 и к-константными областями. Для конструирования химерной тяжелой цепи фрагмент PstI-BstEII размером 0,36 т.п.н. из субклона pEAG970 тяжелой цепи CBE11 субклонировать в полученный при обработке фосфатазой векторный фрагмент PstI-BstEII размером 2,82 т.п.н. из плазмиды pLCB7, кодирующей тяжелую цепь 5a8 (5a8 представляет собой молекулярным способом клонированное CD4-специфическое mAb (моноклональное антитело), ранее охарактеризованное Biogen), с целью добавления сигнальной последовательности мышино-тяжелой

цепи и сплайс-донорного участка в варибельную область тяжелой цепи μ СВЕ11. В данной плазмиде, названной рЕАG979, зрелый N-конец тяжелой цепи отличается по двум остаткам от N-концевой последовательности очищенной аутентичной тяжелой цепи СВЕ11, выделенной из продуктов деградации по Edman, поскольку она определяется праймером во время ПЦР. Для коррекции N-конца тяжелой цепи рЕАG979 подвергают мутагенезу с элиминацией уникального сайта (USE) при использовании набора для USE-мутагенеза фирмы Amersham Pharmacia Biotech, следуя протоколу, рекомендованному изготовителем. Мутантные плазмиды идентифицируют путем скрининга интродуцированных изменений Avall, PstI и RsaI. Последовательность тяжелой цепи в полученной плазмиде рЕАG981 подтверждают секвенированием ДНК. Фрагмент варибельного домена тяжелой цепи NotI-HindIII размером 0,44 т.п.н. из рЕАG981 и фрагмент HindIII-NotI размером 1,21 т.п.н. из плазмиды рЕАG964, содержащий константную область человеческого IgG1, субклонируют в сайт NotI плазмиды рСН269, полученной на основе экспрессионного вектора EBV рСЕР4 (Invitrogen), с образованием плазмиды рЕАG983.

Для конструирования химерной легкой цепи фрагмент NotI-EcoRV размером 0,11 т.п.н. из плазмиды рМDR985 и фрагмент EcoRV-BamHI размером 0,37 т.п.н. из плазмиды рЕАG967 варибельного домена легкой цепи СВЕ11 субклонируют в полученный при обработке фосфатазой векторный фрагмент NotI-BamHI размером 2,94 т.п.н. из рBluescriptIIISK фирмы Stratagene + вектор для клонирования, с целью добавления сигнальной последовательности мышшиной легкой цепи и сайта 5'-NotI в конечную плазмиду рЕАG978. Данную плазмиду подвергают USE-мутагенезу при использовании набора для USE-мутагенеза Amersham Pharmacia Biotech, следуя протоколу, рекомендованному изготовителем, с использованием мутагенных праймеров, кодирующих замену V3K, для получения соответствия N-концу легкой цепи аутентичного СВЕ11. При этом интродуцируют сайт BgIII в 3'-конец варибельного домена легкой цепи. Мутантные плазмиды идентифицируют путем скрининга изменений интродуцированных сайтов BgIII, EcoRV и MseI. Последовательность легкой цепи в конечной плазмиде рЕАG980 подтверждают секвенированием ДНК. Фрагмент варибельного домена легкой цепи NotI-BgIII размером 0,41 т.п.н. из рЕАG980 и фрагмент BclI-NotI размером 0,68 т.п.н. из плазмиды рЕАG963, содержащий константный домен легкой цепи человека, субклонируют в сайт NotI плазмиды рСН269, полученной на основе экспрессионного вектора EBV рСЕР4 (Invitrogen) с образованием плазмиды рЕАG982.

Экспрессионными векторами (вектор тяжелой цепи chСВЕ11 плазмиды рЕАG983 и вектор легкой цепи chСВЕ11 рЕАG982) котрансфицируют клетки 293-EBNA и тестируют трансфицированные клетки на секрецию и специфичность антитела (в качестве контроля служат клетки, трансфицированные ch5c8 (молекулярным способом клонированное CD154-специфическое mAb, ранее охарактеризованное Biogen) и ненагруженным вектором). Анализ способом вестерн-блоттинга (проведенный с использованием антител против человеческой тяжелой и легкой цепей) образования иммунопреципитатов белка А из лизатов целых клеток и кондиционированной среды показывает, что клетки, трансфицированные chСВЕ11, синтезируют и эффективно секретируют тяжелые и легкие цепи на уровне, близком к уровню клеток, трансфицированных ch5c8. Анализ с помощью FACS (клеточного сортера с возбуждением флуоресценции) экспрессирующих LT- β -R клеток HT-29, окрашенных кондиционированной средой, полученной из трансфицированных клеток, показывает, что антитело chСВЕ11 связывает и образует образцы окрашивания, близкие к образцам, полученным для μ СВЕ11, тогда как кондиционированная среда, полученная из псевдо- и ch5c8-трансфицированных клеток, не окрашивает LT- β -R на клетках HT-29. Химерное СВЕ11, полученное в результате временной трансфекции, очищают и демонстрируют его способность индуцировать секрецию ИЛ-8 (интерлейкина-8) клетками меланомы А375, экспрессирующими LT- β -R, и ингибировать рост клеток аденокарциномы WiDRr у голых мышей.

Пример 2. Конструирование и экспрессия huСВЕ11.

Создание реконструированных варибельных доменов, с целью получения гуманизированного СВЕ11 (huСВЕ11), проводят, как описано supra. Выбор человеческих акцепторных каркасов основан на анализе гомологии mAb TNF-A1 из человеческой к-подгруппы I для легкой цепи (см. работу Griffiths и соавт., 1993) и mAb FLA-IgG из человеческой подгруппы III для тяжелой цепи (см. работу Malisan и соавт., 1996). Разрабатывают три варианта каждой из варибельных легких и четыре варианта варибельных тяжелых реконструированных цепей. Как правило, первый вариант содержит больше всего обратных мутаций к последовательностям мышшиного донора, тогда как последний вариант содержит наименьшее количество обратных мутаций (т.е. является наиболее "гуманизированным").

Варибельные области huСВЕ11 получают путем мутагенеза с элиминацией уникального сайта (USE) при использовании набора для USE-мутагенеза Amersham Pharmacia Biotech, следуя протоколу, рекомендованному изготовителем, и используя плазмиды варибельного домена chСВЕ11 в качестве исходных матриц. Ниже описаны мутагенные праймеры для изменений каркаса (FR). Используют последовательность кДНК человеческих акцепторных каркасов (база данных Kabat #004770 для легкой цепи и Kabat #040003 для тяжелой цепи) с молчашими мутациями, интродуцированными для получения изменений сайтов рестрикции, с целью облегчения идентификации мутантных плазмид. Полученные мутантные плазмиды идентифицируют путем скрининга интродуцированных изменений сайтов рестрикции. Последовательности кДНК варибельных цепей подтверждают секвенированием ДНК.

Для VH#1 используют рEAG981 в качестве матрицы со следующими праймерами: праймер FR1 5' GCC TGG AGG GTC CCT GAG GCT CTC CTG TGC AGC CTC 3' (SEQ ID NO:17), который интродуцирует сайт Bsu361; праймер FR2 5' GTT TCG CCA GAC TCC GGG AAA GGG GCT GGA GTG GGT CGC AAC 3' (SEQ ID NO:18), который интродуцирует сайты Neil и HpaII и праймер FR3 5' CAG AGA CAA TGC CAA GAA CAG CCT CTA CCT GCA GAT GAG CAG CCT GAG GGC TGA GGA CAC AGC CAT G 3' (SEQ ID NO:19), который интродуцирует сайты Bsu361 и PstI и удаляет сайт RsaI. Полученную плазмиду VH #1 называют PAND067.

Для VH#2 используют рAND067 в качестве матрицы со следующими праймерами: праймер FR2 5' CAT GTA TTG GTT TCG CCA GGC CCC GGG AAA GGG GCT GG 3' (SEQ ID NO:20), который интродуцирует сайт SmaI и праймер FR3 5' GGG CTG AGG ACA CAG CTG TGT ATT ACT GTG TAA GAG 3' (SEQ ID NO:21), который интродуцирует сайт PvuII. Полученную VH#2 плазмиду называют рAND071.

Для VH#3 используют плазмиду рAND067 в качестве матрицы со следующими праймерами: праймер FR2 5' GTG ACT ATT ACA TGT ATT GGG TGC GCC AGG CCC CGG GAA AGG GG CAG AG 3' (SEQ ID NO:22), который интродуцирует сайты SmaI и HhaI и праймер FR3 5' GAG GGC TGA GGA CAC AGC TGT GTA TTA CTG CGC AAG AGA GGA GAA TGG TAA C 3' (SEQ ID NO:23), который интродуцирует сайты PvuII и FspI. Полученную плазмиду VH#3 называют рAND075.

Экспрессионные векторы для тяжелых цепей huCBE11 получают путем субклонирования фрагментов переменного домена тяжелой цепи NotI-HindIII размером 0,44 т.п.н. из рAND067, рAND071 или рAND075, и фрагмента HindIII-NotI размером 1,21 т.п.н. из плазмиды рEAG964, несущей константный домен человеческого IgG1, субклонируют в сайт NotI плазмиды рCH269, полученной на основе экспрессионного вектора EBV рСЕР4, с образованием векторов для экспрессии тяжелой цепи рAND069 (VH#1), рAND073 (VH#2), и рAND077 (VH#3).

Для VL#1 используют плазмиду рEAG980 в качестве матрицы со следующими праймерами: праймер FR1 5' CTT GCAAGT GAT AGT GAC CCT GTC TCC CAC CGA TGC AGA CAA GGA TGA TGG AGA CTG GGT CAT C 3' (SEQ ID NO:24), который удаляет сайты HincI и NsiI; праймер FR2 5' CAT AAT AGATCA GGA TCT TAG GCG CTT TCC ATG GTT TCT GCT G 3' (SEQ ID NO:25), который интродуцирует сайты HaeIII и HhaI, и праймер FR3 5' GTA GAC AGT AAT AAG TTG CGA AAT CCT CAG GCT GCA GGC TGC TGA TGG TTA GAG TAT AAT CTT GCC CAG ATC 3' (SEQ ID NO:26), который интродуцирует сайты Bsu361, DdeI и PstI. Полученную плазмиду VL#1 называют рAND066.

Для VL#2 используют плазмиду рAND066 в качестве матрицы со следующими праймерами: праймер FR1 5' GAT GGA GAC TGG GTC ATC TGG ATA TCA CCT CTG GCA CCT G 3' (SEQ ID NO:27), который интродуцирует EcoRV, и праймер FR3 5' GAT GGT TAG AGT ATA ATC TGT ACC AGA TCC ACT GCC ACT G 3' (SEQ ID NO:28), который интродуцирует сайт RsaI. Полученную плазмиду VL#2 называют рAND070.

Для VL#3 используют плазмиду рAND066 в качестве матрицы со следующими праймерами: праймер FR1 5' GAT GGA GAC TGG GTC ATC TGG ATA TCA CCT CTG GCA CCT G 3' (SEQ ID NO:29), который интродуцирует сайт an EcoRV; праймер FR2 5' CAA CCT TGT TGC ATA ATA GAT CAG AAG CTT AGG CGC TTT CCC TGG TTT CTG CTG GTA CC 3' (SEQ ID NO:30), который интродуцирует сайт HindIII и удаляет сайты NcoI и StyI, и праймер FR3 5' GAT GGT TAG ACT ATA ATC TGT ACC AGA TCC ACT GCC ACT G 3' (SEQ ID NO:31), который интродуцирует сайт RsaI. Полученную плазмиду VL#3 называют PAND074.

Экспрессионные векторы для легких цепей huCBE11 получают субклонированием фрагментов переменного домена легкой цепи NotI-BglIII размером 0,41 т.п.н. из рAND066, рAND070 или рAND074, и фрагмента BclI-NotI размером 0,68 т.п.н. из плазмиды рEAG963, содержащей константный домен человеческой κ-легкой цепи, субклонируют в сайт NotI плазмиды рCH269, полученной на основе экспрессионного вектора EBV рСЕР4, с образованием векторов для экспрессии легкой цепи рAND068 (VL#1), рAND072 (VL#2) и рAND076 (VL#3).

Экспрессионными векторами котрансфицируют клетки 293-EBNA и трансфицированные клетки тестируют на секрецию и специфичность антитела (клетки, трансфицированные ненагруженным вектором, служат отрицательным контролем). Анализ способом вестерн-блоттинга (проведенный с использованием антител против человеческой тяжелой и легкой цепей) образования иммунопреципитатов белка А из лизатов целых клеток и кондиционированной среды показывает, что клетки, трансфицированные huCBE11, синтезируют и эффективно секретируют тяжелые и легкие цепи на уровне, близком к уровню клеток, трансфицированных chCBE11. Анализ с помощью FACS экспрессирующих LT-β-R клеток HT-29, окрашенных кондиционированной средой, полученной из трансфицированных клеток, показывает, что mAb huCBE11 #3 связывает хуже, чем mAb huCBE11#1 и huCBE11#2 по сравнению с chCBE11 (см. табл. 1 ниже), где показаны huCBE11#1 (VL#1 в сочетании с VH#1); huCBE11#2 (VL#2 в сочетании с VH#2) и huCBE11#3 (VL#3 в сочетании с VH#3). Результаты смешанных и соответствующих котрансфекций позволяют предполагать, что снижение могло быть связано с вариантом VH#3, который отличается от VH#2 двумя каркасными остатками: FR2 F37V и FR3 V93A. Для исследования отдельных вкладов каждого из данных изменений конструируют векторы для экспрессии новых тяжелых цепей.

Плазмиду PAND089, вариант F37V VH #2, получают посредством субклонирования фрагмента NotI-PstI размером 311 п.н. из pAND075, фрагмента PstI-HindIII размером 126 п.н. из pAND071 и фрагмента HindIII-NotI размером 1,21 т.п.н. из плазмиды pEAG964 в сайт NotI плазмиды pCH269, полученной на основе экспрессионного вектора EBV pCEP4. Плазмиду pAND090, вариант V93A VH#2, получают посредством субклонирования фрагмента NotI-PstI размером 311 п.н. из pAND071, фрагмента PstI-HindIII размером 126 п.н. из pAND075 и фрагмента HindIII-NotI размером 1,21 т.п.н. из плазмиды pEAG964 в сайт NotI плазмиды pCH269, полученной на основе экспрессионного вектора EBV pCEP4. Данными химерными тяжелыми цепями H2/H3 котрансфицируют клетки 293-EBNA, несущие VL#2 или VL#3. Анализ с помощью FACS показывает, что у варианта H2 V93A восстанавливается связывание LT-β-R в паре с VL#3 (см. таблицу, supra). Вариант с использованием пары pAND076 и pAND090 называют huCBE11#4 (см. таблицу).

Котрансфекции клеток 293-EBNA вариантами chCBE11 и huCBE11 #L-4 масштабируют и собирают кондиционированную среду. Антитело очищают на Белок А-Сепарозе. Проводят анализ активности очищенных mAb.

Окрашивание с помощью FACS клеток HT-29 chCBE11 и huCBE11

	<u>Легкая цепь</u>	<u>Тяжелая цепь</u>	<u>Относительный MFI</u> (среднекратный прирост)
ChCBE11	pEAG982	pEAG983	1,00
HuCBE11#1	pAND068	pAND069	1,00
HuCBE11#2	pAND072	pAND073	1,00
HuCBE11#3	pAND076	pAND077	0,62
L2/H3	pAND072	pAND077	0,42
	<u>Легкая цепь</u>	<u>Тяжелая цепь</u>	<u>Относительный MFI</u> (среднекратный прирост)
L3/H2	pAND076	pAND073	1,00
L2/F37V H2	pAND072	pAND089	0,65
L2/V93A H2	pAND072	pAND090	0,75
L3/F37V H2	pAND076	pAND089	0,80
HuCBE11#4	pAND076	pAND090	1,00

Кондиционированную среду, полученную из временно трансфицированных клеток, используют для окрашивания клеток HT-29 путем инкубирования в течение 30 мин на льду, промывания клеток два раза в буфере для FACS (PBS (физиологический раствор, забуференный фосфатом) с добавлением 5% FBS (сыворотка телячьих эмбрионов) и 0,05% азида натрия), окрашивания с использованием PE-конъюгированного IgG против человека (H + L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) в течение 30 мин на льду в буфере для FACS, промывания клеток два раза буфером для FACS и ресуспендирования в буфере для FACS, с целью проведения анализа. Относительный MFI означает среднее значение MFI, нормализованное относительно значения, полученного для chCBE11. Показанные данные представляют среднее значение по двум независимым экспериментам с трансфекцией.

Пример 3. Агонизм ИЛ-8 на клетках A375.

Анализируют активность очищенных mAb. Результаты анализа выхода ИЛ-8 на клетках человеческой меланомы A375 представлены на фиг. 1 (связанные антитела) и 2 (растворимые антитела), где измеряют количество ИЛ-8, которое выделилось при связывании антитела против LT-β-R с LT-β-R, экспрессирующегося на поверхности человеческих клеток меланомы A375. Клетки A375 помещают при густоте 10^5 /мл в 96-луночные планшеты, содержащие либо растворимые антитела, либо антитела, иммобилизованные на лунках, покрытых козьим Fc IgG против человека (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Планшеты для культивирования инкубируют в течение ночи. Кондиционированную среду собирают и анализируют на присутствие ИЛ-8 с помощью ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

Пример 4. Цитотоксичность в отношении клеток WiDr.

Результаты анализа цитотоксичности при использовании клеток рака толстой кишки WiDr с растворимыми антителами против LT-β-R в лунках, покрытых Fc IgG против человека, демонстрируют, что антитела против LT-β-R повышают цитотоксичность раковых клеток, как показано на фиг. 3 (связанные антитела) и 4 (растворимые антитела). Клетки WiDr помещают при густоте 6×10^4 /мл в присутствии 80 единиц/мл hуFN-γ в 96-луночные планшеты, содержащие либо растворимые антитела, либо антитела, иммобилизованные на лунках, покрытых козьим Fc IgG против человека (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Планшеты для культивирования инкубируют в течение 5 дней. На 4 ч добавляют МТТ, полученный преципитат растворяют посредством инкубирования в течение ночи с 10% SDS (додецилсульфат натрия) в 10 мМ HCl и читают O.D. (оптическую плотность) с помощью ридера для микропланшет.

Пример 5.

Получают антитело, состоящее из реконструированного варианта 3 легкой вариабельной цепи (VL#3) и реконструированного варианта 4 тяжелой вариабельной цепи huCBE11, названное huCBE11 #4 или hCBE11, и клеточную линию, продуцирующую антитело, депонируют в коллекции культур ATCC (наименование патентного депозита ATCC PTA-3357). Полные полипептидные последовательности каждой из легкой и тяжелой цепей, включая константные домены, являются следующими:

Последовательность варианта 3 легкой цепи зрелого huCBE11 (SEQ ID NO:32):
 1 DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKAGQDIK SYLSWYQQKP GKAPKLLIYY
 51 ATRLADGVPS RFSVSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCLQ HGESPWTFGG
 101 GTKLEIK [RTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SWCLLNNFY PREAKVQWKV
 151 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 201 LSSPVTKSFN RGEC]

CDR выделены подчеркиванием; обратная мутация F71Y выделена жирным шрифтом; константный домен выделен скобками.

Последовательность варианта 4 тяжелой цепи зрелого huCBE11 (SEQ ID NO:33):

	V37F	S49A
1	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYYMYWFRQA PGKLEWVAI	
51	ISDGGSYTYYPDSYKGRFTI SRDNAKNSLY LQMSSLRAED TAVYYCAREE	
101	NGNFFYFDYW GQGTITVTVSS [ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK	
151	DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT	
201	YICNVNHKPS NTKVDKKEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP	
251	KDTLMISRTP EVTCVVDVVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN	
301	STYRVVSVLT VLNQDNLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ	
351	VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV	
401	LDSGGSFPLY SKLTVDKSRW QQGNVFCVSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG]	

CDR выделены подчеркиванием; обратная мутация F71Y выделена жирным шрифтом; константный домен выделен скобками.

Голым мышам в возрасте 6 недель делают внутрибрюшинную инъекцию 100 мкг антитела против LFA3 (1E6), 100 мкг антитела против LTBR (huCBE11 #4) или им не делают инъекцию (контроль). Затем животным делают подкожную инъекцию 1×10^6 клеток аденокарциномы толстой кишки WIDR. Мышей, леченных huCBE11 #4, повторно лечат еженедельным введением 100 мкг антитела, а животных, леченных mCBE11, повторно лечат введением только на день 14. Размер опухоли измеряют еженедельно и вычисляют объем сферической опухоли (см. фиг. 5). Животных умерщвляют, когда объем их опухолей достигает $2,0 \text{ см}^3$ (диаметр 16 мм) и их гибель отмечают на графике выживаемости (см. фиг. 6).

Пример 6.

Голым мышам в возрасте 6 недель либо делают внутрибрюшинную инъекцию 100 мкг антитела против LTBR (huCBE11#4), либо им не делают инъекцию (контроль). Затем всем животным делают подкожную инъекцию 1×10^6 клеток аденокарциномы толстой кишки WIDR. Мышей, леченных huCBE11#4, повторно лечат еженедельным введением 100 мкг антитела huCBE11 #4. Размер опухоли измеряют еженедельно и вычисляют объем сферической опухоли. Представленные объемы опухолей представляют среднее значение по 10 контрольным животным и 8 животным, леченым huCBE11#4 (см. фиг. 7). Еженедельное введение huCBE11#4 в значительной степени подавляет рост опухоли WIDR, имплантированной подкожно голым мышам. Животные, леченные антителом, до дня 21 продолжают демонстрировать пониженную скорость роста опухоли в течение двух недель после прекращения лечения.

Пример 7.

huCBE11#4 замедляет рост ранее выросших опухолей WIDR и повышает выживаемость у голых мышей, несущих опухоль WIDR. 10^6 клеток WIDR предварительно выращивают подкожно в течение 10 дней у голых мышей. Мышам делают подкожные инъекции PBS либо huCBE11 #4 еженедельно, или mCBE11 через неделю. Массы опухолей рассчитывают, исходя из измерений ширины и длины, и животных с опухолями массой более 2000 мг умерщвляют, массы их опухолей в момент умерщвления продол-

жают учитывать в статистическом усреднении. Границы ошибки представляют стандартную ошибку. Массы опухолей вычисляют с помощью формулы: (Ширина x Ширина x Длина)/2 = масса опухоли в мг. Результаты представляют в виде графика на фиг. 8 и показывают, что huСВЕ11 #4 обладает способностью замедлять развитие ранее выросших опухолей *in vivo*.

Кроме того, опухоли культивируют и лечат, как описано выше и измеряют процент выживаемости животных. Результаты в виде графика представляют на фиг. 9 и показывают, что huСВЕ11 #4 обладает способностью индуцировать более длительную выживаемость *in vivo* у мышей с ранее выросшими опухолями.

Пример 8. Измерение аффинности антитела.

Клетки НТ-29 культивируют в среде DMEM (модифицированная среда Дульбекко-Игла) с добавлением L-глутамина, не-заменимых аминокислот, пирувата натрия и 10% сыворотки телячьих эмбрионов. Клетки однократно промывают в PBS и удаляют из планшета путем инкубирования при комнатной температуре с течение 5 мин с PBS с добавлением 20 mM EDTA (этилендиаминтетрауксусной кислоты). Клетки центрифугируют при 1000 об/мин. (110 x g) в течение пяти минут и ресуспендируют в PBS до получения густоты 1×10^7 клеток/мл.

Антитело huСВЕ11 #4 против-ЛТβR и гуманизированное антитело против CD40L в качестве отрицательного контроля разводят в PBS и делают 12-кратное серийное разведение 1:4 до получения конечной концентрации, лежащей в интервале 2,37 pM - 10 мкМ. 100 мкл суспензии клеток и 100 мкл разведения антитела вместе вносят в каждую лунку 96-луночного планшета для микротитрования с V-образной формой дна. Антитело и клетки инкубируют при 4°C в течение 2 ч. Планшет центрифугируют при 1000 об/мин. (110 x g) в течение 10 мин при 4°C. Супернатант отбрасывают и шесть раз промывают клеточный остаток холодным PBS.

Конъюгат козьего IgG против человека и фикоэритрина (Jackson Immunoresearch) разводят 1:100 в PBS и добавляют по 200 мкл в каждую лунку. Клетки инкубируют с данным вторичным антителом в течение одного часа при 4°C, центрифугируют, как описано выше, и однократно промывают в холодном PBS. Затем клетки переносят в полистирольные тест-пробирки. Интенсивность флуоресценции измеряют на приборе FACS Calibur (Beckton Dickinson).

Строят график зависимости средних значений интенсивности флуоресценции окрашивания для контроля неспецифического связывания антитела против CD40L от концентрации антитела с помощью программы Delta Graph.

Данные значения соответствуют прямой линии и теоретические значения неспецифического связывания для каждой концентрации антитела вычитают из результата для каждой точки в серии разведений huСВЕ11 #4.

Затем строят график зависимости данных значений интенсивности специфической флуоресценции от концентраций huСВЕ11#4 в логарифмическом масштабе. Полученная в результате кривая имеет форму колокола и является симметричной, она отражает самоингибирование связывания антитела при высоких концентрациях. Левая половина данной кривой соответствует уравнению с четырьмя параметрами, которое позволяет определить функциональную аффинность антитела. Соответствие полученной в результате кривой дает значение EC₅₀ 60 pM для связывания huСВЕ11 #4 с клетками НТ-29.

Для компетентных специалистов в данной области очевидна возможность различных модификаций и вариантов в полипептидах, композициях и способах, соответствующих изобретению, не выходя за рамки сущности и объема притязаний изобретения. Вследствие этого предусматривают, что данное изобретение охватывает модификации и варианты, соответствующие данному изобретению, при условии, что они входят в объем прилагаемых пунктов формулы изобретения и эквивалентных им решений.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> БАЙОДЖЕН, ИНК.
 ГАРБЕР, Элен
 ЛАЙН, Пол
 САЛЬДАНА, Хосе, У.

<120> Гуманизированное антитело против рецептора лимфотоксина- β (варианты), композиция, способ лечения или снижения риска развития, тяжести или последствий неоплазии у человека, выделенная нуклеиновая кислота (варианты), клетка клеточной линии

<130> A100 PCT

<150> 60/240,285
 <151> 2000-10-13

<150> 60/275,289
 <151> 2001-03-13

<150> 60/299,987
 <151> 2001-06-21

<160> 33

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> МЫШИНЫЙ

<400> 1

```

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

```

<210> 2
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> МЫШИНЫЙ

<400> 2

```

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

```


006945

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Glu Glu Asn Gly Asn Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 3
 gatattaaga tgaccagtc tccatcatcc ttgtctgcat cgggtgggaga cagggtcact 60
 atcacttgca aggcgggtca ggacattaaa agctatttaa gctggtacca gcagaacca 120
 tggaaagcgc ctaagatcct gatctattat gcaacaaggt tggcagatgg ggtcccatca 180
 agattcagtg gcagtggatc tgggcaagat tataactctaa ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaggatttcg caacttatta ctgtctacag catggtgaga gcccggtggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 4
 Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asp Ile Lys Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ala Pro Lys Ile Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Thr Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 5
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 5
 gatatccaga tgaccagtc tccatcatcc ttgtctgcat cgggtgggaga cagggtcact 60
 atcacttgca aggcgggtca ggacattaaa agctatttaa gctggtacca gcagaacca 120
 tggaaagcgc ctaagatcct gatctattat gcaacaaggt tggcagatgg ggtcccatca 180
 agattcagtg gcagtggatc tggtagatg tataactctaa ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaggatttcg caacttatta ctgtctacag catggtgaga gcccggtggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 6

006945

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

<210> 7
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 7
 gatatccaga tgaccagtc tccatcatcc ttgtctgcat cgggtggaga cagggtcact 60
 atcacttgca agcggggtca ggacattaaa agctatttaa gctggtagca gcagaaacca 120
 gggaaagcgc ctaagcctct gatctattat gcaacaagggt tggcagatgg ggtcccatca 180
 agattcagtg gcagtggtac tgggtacagat tatactctaa ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaggatttcg caacttatta ctgtctacag catggtgaga gcccgtagc gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 8
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asp Ile Lys Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Thr Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 9
 gaggtacaac tggtaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaggctc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactattaca tgtattgggt tcgccagact 120
 ccgggaaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgatg gtggtagtta cacctactat 180
 ccagacagtg tgaagggcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa cagcctctac 240
 ctgcagatga gcagcctgag ggctgaggac acagccatgt attactgtgt aagagaggag 300
 aatggtaact ttactactt tgactactgg ggccaagga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 10

<211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 10

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

<210> 11
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 11

gaggtacaac	tgggtggagtc	tgggggaggc	ttagtgaagc	ctggagggtc	cctgaggctc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cactttcagt	gactattaca	tgtattgggt	tcgccaggcc	120
ccgggaaagg	ggctggagtg	ggtcgcaacc	attagtgatg	gtggtagtta	cacctactat	180
ccagacagtg	tgaagggcg	attcaccatc	tccagagaca	atgccaagaa	cagcctctac	240
ctgcagatga	gcagcctgag	ggctgaggac	acagctgtgt	attactgtgt	aagagaggag	300
aatggtaact	tttactactt	tgactactgg	ggccaagga	ccacggtcac	cgtctcctca	360

<210> 12
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 12

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

<210> 13
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 13

```

gaggtacaac tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaggctc      60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactattaca tgtattgggt tgcgccaggcc      120
ccgggaaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgatg gtggtagtta cacctactat      180
ccagacagtg tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa cagcctctac      240
ctgcagatga gcagcctgag ggctgaggac acagctgtgt attactgtgt aagagaggag      300
aatggtaact tttactactt tgactactgg ggccaagga ccacggtcac cgtctctca      360

```

<210> 14

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 14

```

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

```

<210> 15

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo Sapien

<400> 15

```

gaggtacaac tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaggctc      60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactattaca tgtattgggt tgcgccaggcc      120
ccgggaaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgatg gtggtagtta cacctactat      180
ccagacagtg tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa cagcctctac      240
ctgcagatga gcagcctgag ggctgaggac acagctgtgt attactgcgc aagagaggag      300
aatggtaact tttactactt tgactactgg ggccaagga ccacggtcac cgtctctca      360

```

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 16

```

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

```

006945

Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
<210>	17							
<211>	36							
<212>	DNA							
<213>	Homo Sapien							
<400>	17							36
	gcctggaggg	tcctgaggc	tctcctgtgc	agcctc				
<210>	18							
<211>	42							
<212>	DNA							
<213>	Homo Sapien							
<400>	18							42
	gtttcgccag	actccgggaa	aggggctgga	gtgggtcgca	ac			
<210>	19							
<211>	67							
<212>	DNA							
<213>	Homo Sapien							
<400>	19							60
	cagagacaat	gccaagaaca	gcctctacct	gcagatgagc	agcctgaggg	ctgaggacac		67
	agccatg							
<210>	20							
<211>	38							
<212>	DNA							
<213>	Homo Sapien							
<400>	20							38
	catgtattgg	tttcgccagg	ccccgggaaa	ggggctgg				
<210>	21							
<211>	36							
<212>	DNA							
<213>	Homo Sapien							
<400>	21							36
	gggctgagga	cacagctgtg	tattactgtg	taagag				
<210>	22							
<211>	50							
<212>	DNA							
<213>	Homo Sapien							
<400>	22							50
	gtgactatta	catgtattgg	gtgcgccagg	ccccgggaaa	ggggctggag			
<210>	23							
<211>	52							
<212>	DNA							
<213>	Homo Sapien							
<400>	23							

gagggctgag gacacagctg tgtattactg cgcaagagag gagaatggta ac 52

<210> 24
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 24
 cttgcaagtg atagtgaccc tgtctccac cgatgcagac aaggatgatg gagactgggt 60
 catc 64

<210> 25
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 25
 cataatagat caggatctta ggcgctttcc atggtttctg ctg 43

<210> 26
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 26
 gtagacagta ataagttgcg aaatcctcag gctgcaggct gctgatgggt agagtataat 60
 cttgccaga tc 72

<210> 27
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 27
 gatggagact gggtcactctg gatatcacct ctggcacctg 40

<210> 28
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 28
 gatggttaga gtataatctg taccagatcc actgccactg 40

<210> 29
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 29
 gatggagact gggtcactctg gatatcacct ctggcacctg 40

<210> 30
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 30
 caacctgtt gcataataga tcagaagctt aggcgctttc cctggtttct gctggtacc 59

<210> 31
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<400> 31
 gatggttaga gtataatctg taccagatcc actgccaactg

40

<210> 32
 <211> 663
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 32
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asp Ile Lys Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Thr Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 210 215 220
 Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 225 230 235 240
 Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
 245 250 255
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Thr
 260 265 270
 Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 275 280 285
 Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 290 295 300
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Glu Asn Gly Asn Phe Tyr Tyr
 305 310 315 320
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 325 330 335
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 340 345 350
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 355 360 365
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 370 375 380
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 385 390 395 400

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

<210> 33

<211> 4852

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 33

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

Glu Asn Gly Asn Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 210 215
 Val Thr Val Ser Ser Asp Gly Ala Thr Ala Thr Thr Ala Ala Gly Ala
 225 230 235 240
 Thr Gly Ala Cys Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys
 245 250 255
 Ala Thr Cys Cys Thr Thr Gly Thr Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Gly
 260 265 270
 Gly Thr Gly Gly Gly Ala Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Cys Ala
 275 280 285
 Cys Thr Ala Thr Cys Ala Cys Thr Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys
 290 295 300
 Gly Gly Gly Thr Cys Ala Gly Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Ala
 305 310 315 320
 Ala Gly Cys Thr Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr
 325 330 335
 Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Ala Thr Gly
 340 345 350
 Gly Ala Ala Ala Gly Cys Gly Cys Cys Thr Ala Ala Gly Ala Thr Cys
 355 360 365
 Cys Thr Gly Ala Thr Cys Thr Ala Thr Thr Ala Thr Gly Cys Ala Ala
 370 375 380
 Cys Ala Ala Gly Gly Thr Thr Gly Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Thr Cys Cys Cys Ala Thr Cys Ala Ala Gly Ala Thr Thr Cys
 405 410 415
 Ala Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly
 420 425 430
 Gly Gly Cys Ala Ala Gly Ala Thr Thr Ala Thr Ala Cys Thr Cys Thr
 435 440 445
 Ala Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly
 450 455 460
 Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Thr Thr Thr Cys Gly
 465 470 475 480
 Cys Ala Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr
 485 490 495
 Ala Cys Ala Gly Cys Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Cys
 500 505 510
 Cys Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Thr Gly
 515 520 525
 Gly Ala Gly Gly Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala
 530 535 540
 Gly Ala Thr Cys Ala Ala Ala Pro Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro
 545 550 555 560
 Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys
 565 570 575
 Ala Gly Gln Asp Ile Lys Ser Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 580 585 590
 Trp Lys Ala Pro Lys Ile Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Arg Leu Ala Asp
 595 600 605
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr
 610 615 620
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 625 630 635 640
 Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 645 650 655
 Glu Ile Lys Asp Gly Ala Thr Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Thr Gly
 660 665 670
 Ala Cys Cys Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Ala Thr
 675 680 685
 Cys Cys Thr Thr Gly Thr Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Gly Gly Thr
 690 695 700
 Gly Gly Gly Ala Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Cys Ala Cys Thr
 705 710 715 720
 Ala Thr Cys Ala Cys Thr Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Gly Gly
 725 730 735

Gly Thr Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Gly
 740 745 750
 Cys Thr Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys
 755 760 765
 Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala
 770 775 780
 Ala Ala Gly Cys Gly Cys Thr Ala Ala Gly Ala Thr Cys Cys Thr
 785 790 795 800
 Gly Ala Thr Cys Thr Ala Thr Thr Ala Thr Gly Cys Ala Ala Cys Ala
 805 810 815
 Ala Gly Gly Thr Thr Gly Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Gly Gly Gly
 820 825 830
 Thr Cys Cys Cys Ala Thr Cys Ala Ala Gly Ala Thr Thr Cys Ala Gly
 835 840 845
 Thr Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Thr
 850 855 860
 Ala Cys Ala Gly Ala Thr Thr Ala Thr Ala Cys Thr Cys Thr Ala Ala
 865 870 875 880
 Cys Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala
 885 890 895
 Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Thr Thr Thr Cys Gly Cys Ala
 900 905 910
 Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr Ala Cys
 915 920 925
 Ala Gly Cys Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Cys Cys Cys
 930 935 940
 Gly Thr Gly Gly Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala
 945 950 955 960
 Gly Gly Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala
 965 970 975
 Thr Cys Ala Ala Ala Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 980 985 990
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly
 995 1000 1005
 Gln Asp Ile Lys Ser Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys
 1010 1015 1020
 Ala Pro Lys Ile Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Arg Leu Ala Asp Gly Val
 1025 1030 1035 1040
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr
 1045 1050 1055
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
 1060 1065 1070
 His Gly Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 1075 1080 1085
 Lys Asp Gly Ala Thr Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Thr Gly Ala Cys
 1090 1095 1100
 Cys Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Ala Thr Cys Cys
 1105 1110 1115 1120
 Thr Thr Gly Thr Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Gly Gly Thr Gly Gly
 1125 1130 1135
 Gly Ala Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Cys Ala Cys Thr Ala Thr
 1140 1145 1150
 Cys Ala Cys Thr Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Gly Gly Thr
 1155 1160 1165
 Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Gly Cys Thr
 1170 1175 1180
 Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys Ala
 1185 1190 1195 1200
 Gly Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala
 1205 1210 1215
 Gly Cys Gly Cys Cys Thr Ala Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Ala
 1220 1225 1230
 Thr Cys Thr Ala Thr Thr Ala Thr Gly Cys Ala Ala Cys Ala Ala Gly
 1235 1240 1245
 Gly Thr Thr Gly Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Gly Gly Thr Cys
 1250 1255 1260

Cys Cys Ala Thr Cys Ala Ala Gly Ala Thr Thr Cys Ala Gly Thr Gly
 1265 1270 1275 1280
 Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys
 1285 1290 1295
 Ala Gly Ala Thr Thr Ala Thr Ala Cys Thr Cys Thr Ala Ala Cys Cys
 1300 1305 1310
 Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys
 1315 1320 1325
 Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Thr Thr Thr Cys Gly Cys Ala Ala Cys
 1330 1335 1340
 Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr Ala Cys Ala Gly
 1345 1350 1355 1360
 Cys Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Cys Cys Cys Gly Thr
 1365 1370 1375
 Gly Gly Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly
 1380 1385 1390
 Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Thr Cys
 1395 1400 1405
 Ala Ala Ala Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 1410 1415 1420
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asp
 1425 1430 1435 1440
 Ile Lys Ser Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 1445 1450 1455
 Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
 1460 1465 1470
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
 1475 1480 1485
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
 1490 1495 1500
 Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp
 1505 1510 1515 1520
 Gly Ala Gly Gly Thr Ala Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly
 1525 1530 1535
 Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Thr
 1540 1545 1550
 Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Gly
 1555 1560 1565
 Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr
 1570 1575 1580
 Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr
 1585 1590 1595 1600
 Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala Cys Thr Ala Thr
 1605 1610 1615
 Thr Ala Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Gly Gly Thr Thr Thr Cys
 1620 1625 1630
 Gly Cys Cys Ala Gly Ala Cys Thr Cys Cys Gly Gly Gly Ala Ala
 1635 1640 1645
 Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys
 1650 1655 1660
 Gly Cys Ala Ala Cys Cys Ala Thr Thr Ala Gly Thr Gly Ala Thr Gly
 1665 1670 1675 1680
 Gly Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Cys Cys Thr Ala
 1685 1690 1695
 Cys Thr Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Thr Gly Thr Gly
 1700 1705 1710
 Ala Ala Gly Gly Gly Cys Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala
 1715 1720 1725
 Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Thr Gly Cys
 1730 1735 1740
 Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Ala Cys
 1745 1750 1755 1760
 Cys Thr Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys
 1765 1770 1775
 Thr Gly Ala Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys
 1780 1785 1790

Ala Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr
 1795 1800 1805
 Gly Thr Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Ala Thr Gly
 1810 1815 1820
 Gly Thr Ala Ala Cys Thr Thr Thr Ala Cys Thr Ala Cys Thr Thr
 1825 1830 1835 1840
 Thr Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Cys Cys Ala Ala
 1845 1850 1855
 Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly
 1860 1865 1870
 Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 1875 1880 1885
 Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 1890 1895 1900
 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Arg Gln
 1905 1910 1915 1920
 Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly
 1925 1930 1935
 Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 1940 1945 1950
 Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg
 1955 1960 1965
 Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg Glu Glu Asn Gly Asn
 1970 1975 1980
 Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 1985 1990 1995 2000
 Ser Asp Gly Ala Gly Gly Thr Ala Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr
 2005 2010 2015
 Gly Gly Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys
 2020 2025 2030
 Thr Thr Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly
 2035 2040 2045
 Gly Gly Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Cys Thr Cys Thr Cys
 2050 2055 2060
 Cys Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala
 2065 2070 2075 2080
 Thr Thr Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala Cys Thr
 2085 2090 2095
 Ala Thr Thr Ala Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Gly Gly Thr Thr
 2100 2105 2110
 Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Gly Gly Ala
 2115 2120 2125
 Ala Ala Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly
 2130 2135 2140
 Thr Cys Gly Cys Ala Ala Cys Cys Ala Thr Thr Ala Gly Thr Gly Ala
 2145 2150 2155 2160
 Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Cys Cys
 2165 2170 2175
 Thr Ala Cys Thr Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Thr Gly
 2180 2185 2190
 Thr Gly Ala Ala Gly Gly Gly Gly Cys Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys
 2195 2200 2205
 Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Thr
 2210 2215 2220
 Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr
 2225 2230 2235 2240
 Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Ala Gly Cys Ala Gly
 2245 2250 2255
 Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys
 2260 2265 2270
 Ala Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr
 2275 2280 2285
 Gly Thr Gly Thr Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Ala
 2290 2295 2300
 Thr Gly Gly Thr Ala Ala Cys Thr Thr Thr Thr Ala Cys Thr Ala Cys
 2305 2310 2315 2320

Thr Thr Thr Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Cys Cys
 2325 2330 2335
 Ala Ala Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly Gly Thr Cys Ala Cys
 2340 2345 2350
 Cys Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala Pro Glu Val Gln Leu Val
 2355 2360 2365
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 2370 2375 2380
 Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe
 2385 2390 2395 2400
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Asp
 2405 2410 2415
 Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 2420 2425 2430
 Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser
 2435 2440 2445
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg Glu Glu Asn
 2450 2455 2460
 Gly Asn Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 2465 2470 2475 2480
 Val Ser Ser Asp Gly Ala Gly Gly Thr Ala Cys Ala Ala Cys Thr Gly
 2485 2490 2495
 Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Ala Gly
 2500 2505 2510
 Gly Cys Thr Thr Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly
 2515 2520 2525
 Ala Gly Gly Gly Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Cys Thr Cys
 2530 2535 2540
 Thr Cys Cys Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly
 2545 2550 2555 2560
 Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala
 2565 2570 2575
 Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Gly Gly
 2580 2585 2590
 Thr Thr Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Cys Gly Gly
 2595 2600 2605
 Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly
 2610 2615 2620
 Gly Gly Thr Cys Gly Cys Ala Ala Cys Cys Ala Thr Thr Ala Gly Thr
 2625 2630 2635 2640
 Gly Ala Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala
 2645 2650 2655
 Cys Cys Thr Ala Cys Thr Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly
 2660 2665 2670
 Thr Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Gly Gly Cys Gly Ala Thr Thr Cys
 2675 2680 2685
 Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala
 2690 2695 2700
 Ala Thr Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr
 2705 2710 2715 2720
 Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Ala Gly Cys
 2725 2730 2735
 Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly
 2740 2745 2750
 Ala Cys Ala Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala
 2755 2760 2765
 Cys Thr Gly Thr Gly Thr Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly
 2770 2775 2780
 Ala Ala Thr Gly Gly Thr Ala Ala Cys Thr Thr Thr Thr Ala Cys Thr
 2785 2790 2795 2800
 Ala Cys Thr Thr Thr Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly
 2805 2810 2815
 Cys Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly Gly Thr Cys
 2820 2825 2830
 Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala Pro Glu Val Gln
 2835 2840 2845

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 2850 2855 2860
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr
 2865 2870 2875
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile
 2885 2890 2895
 Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg
 2900 2905 2910
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met
 2915 2920 2925
 Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu
 2930 2935 2940
 Glu Asn Gly Asn Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 2945 2950 2955
 Val Thr Val Ser Ser Asp Gly Ala Gly Gly Thr Ala Cys Ala Ala Cys
 2965 2970 2975
 Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly
 2980 2985 2990
 Ala Gly Gly Cys Thr Thr Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr
 2995 3000 3005
 Gly Gly Ala Gly Gly Gly Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Cys
 3010 3015 3020
 Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys
 3025 3030 3035
 Thr Gly Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys Thr Thr Cys Ala Gly Thr
 3045 3050 3055
 Gly Ala Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr
 3060 3065 3070
 Gly Gly Thr Thr Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Cys
 3075 3080 3085
 Gly Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly
 3090 3095 3100
 Thr Gly Gly Gly Thr Cys Gly Cys Ala Ala Cys Cys Ala Thr Thr Ala
 3105 3110 3115
 Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr Gly Thr Ala Gly Thr Thr Ala
 3125 3130 3135
 Cys Ala Cys Cys Thr Ala Cys Thr Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys
 3140 3145 3150
 Ala Gly Thr Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Gly Cys Gly Ala Thr
 3155 3160 3165
 Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala
 3170 3175 3180
 Cys Ala Ala Thr Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Cys Ala Gly Cys
 3185 3190 3195
 Cys Thr Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Ala
 3205 3210 3215
 Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Gly Cys Thr Gly Ala
 3220 3225 3230
 Gly Gly Ala Cys Ala Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Gly Thr Ala Thr
 3235 3240 3245
 Thr Ala Cys Thr Gly Cys Gly Cys Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly
 3250 3255 3260
 Ala Gly Ala Ala Thr Gly Gly Thr Ala Ala Cys Thr Thr Thr Thr Ala
 3265 3270 3275
 Cys Thr Ala Cys Thr Thr Thr Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly
 3285 3290 3295
 Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly Gly
 3300 3305 3310
 Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala Pro Glu
 3315 3320 3325
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
 3330 3335 3340
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
 3345 3350 3355 3360
 Met Tyr Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 3365 3370 3375

Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 3380 3385 3390
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 3395 3400 3405
 Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 3410 3415 3420
 Arg Glu Glu Asn Gly Asn Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 3425 3430 3435 3440
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Asp Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly
 3445 3450 3455
 Gly Gly Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Cys Thr Cys Thr Cys
 3460 3465 3470
 Cys Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Ser Glu Gln Asp
 3475 3480 3485
 Gly Thr Thr Thr Cys Gly Cys Cys Ala Gly Ala Cys Thr Cys Cys Gly
 3490 3495 3500
 Gly Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr
 3505 3510 3515 3520
 Gly Gly Gly Thr Cys Gly Cys Ala Ala Cys Ser Glu Gln Asp Cys Ala
 3525 3530 3535
 Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Thr Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala
 3540 3545 3550
 Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly
 3555 3560 3565
 Ala Thr Gly Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Gly
 3570 3575 3580
 Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys Ala Thr
 3585 3590 3595 3600
 Gly Asp Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Gly Gly Thr Thr Thr Cys
 3605 3610 3615
 Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Gly Gly Ala Ala Ala
 3620 3625 3630
 Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly Gly Asp Gly Gly Gly Cys Thr Gly Ala
 3635 3640 3645
 Gly Gly Ala Cys Ala Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Gly Thr Ala Thr
 3650 3655 3660
 Thr Ala Cys Thr Gly Thr Gly Thr Ala Ala Gly Ala Gly Asp Gly Thr
 3665 3670 3675 3680
 Gly Ala Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr
 3685 3690 3695
 Gly Gly Gly Thr Gly Cys Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys
 3700 3705 3710
 Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly
 3715 3720 3725
 Asp Gly Ala Gly Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys
 3730 3735 3740
 Ala Gly Cys Thr Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Cys
 3745 3750 3755 3760
 Gly Cys Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Thr Gly
 3765 3770 3775
 Gly Thr Ala Ala Cys Asp Cys Thr Thr Gly Cys Ala Ala Gly Thr Gly
 3780 3785 3790
 Ala Thr Ala Gly Thr Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Thr Cys Thr Cys
 3795 3800 3805
 Cys Cys Ala Cys Cys Gly Ala Thr Gly Cys Ala Gly Ala Cys Ala Ala
 3810 3815 3820
 Gly Gly Ala Thr Gly Ala Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Thr Gly Gly
 3825 3830 3835 3840
 Gly Thr Cys Ala Thr Cys Asp Cys Ala Thr Ala Ala Thr Ala Gly Ala
 3845 3850 3855
 Thr Cys Ala Gly Gly Ala Thr Cys Thr Thr Ala Gly Gly Cys Gly Cys
 3860 3865 3870
 Thr Thr Thr Cys Cys Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Cys Thr Gly Cys
 3875 3880 3885
 Thr Gly Asp Gly Thr Ala Gly Ala Cys Ala Gly Thr Ala Ala Thr Ala
 3890 3895 3900

Ala Gly Thr Thr Gly Cys Gly Ala Ala Ala Thr Cys Cys Thr Cys Ala
 3905 3910 3915 3920
 Gly Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala
 3925 3930 3935
 Thr Gly Gly Thr Thr Ala Gly Ala Gly Thr Ala Thr Ala Thr Cys
 3940 3945 3950
 Thr Thr Gly Cys Cys Cys Ala Gly Ala Thr Cys Asp Gly Ala Thr Gly
 3955 3960 3965
 Gly Ala Gly Ala Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Thr Cys Thr Gly
 3970 3975 3980
 Gly Ala Thr Ala Thr Cys Ala Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly Cys Ala
 3985 3990 3995 4000
 Cys Cys Thr Gly Asp Gly Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala Gly Ala Gly
 4005 4010 4015
 Thr Ala Thr Ala Ala Thr Cys Thr Gly Thr Ala Cys Cys Ala Gly Ala
 4020 4025 4030
 Thr Cys Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Ala Cys Thr Gly Asp Gly Ala
 4035 4040 4045
 Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Ala Thr Cys
 4050 4055 4060
 Thr Gly Gly Ala Thr Ala Thr Cys Ala Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly
 4065 4070 4075 4080
 Cys Ala Cys Cys Thr Gly Asp Cys Ala Ala Cys Cys Thr Thr Gly Thr
 4085 4090 4095
 Thr Gly Cys Ala Thr Ala Ala Thr Ala Gly Ala Thr Cys Ala Gly Ala
 4100 4105 4110
 Ala Gly Cys Thr Thr Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Thr Thr Cys Cys
 4115 4120 4125
 Cys Thr Gly Gly Thr Thr Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Thr Ala
 4130 4135 4140
 Cys Cys Asp Gly Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala Gly Ala Gly Thr Ala
 4145 4150 4155 4160
 Thr Ala Ala Thr Cys Thr Gly Thr Ala Cys Cys Ala Gly Ala Thr Cys
 4165 4170 4175
 Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Ala Cys Thr Gly Pro Asp Ile Gln Met
 4180 4185 4190
 Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 4195 4200 4205
 Ile Thr Cys Lys Ala Gly Gln Asp Ile Lys Ser Tyr Leu Ser Trp Tyr
 4210 4215 4220
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr
 4225 4230 4235 4240
 Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 4245 4250 4255
 Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 4260 4265 4270
 Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly
 4275 4280 4285
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 4290 4295 4300
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 4305 4310 4315 4320
 Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 4325 4330 4335
 Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 4340 4345 4350
 Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 4355 4360 4365
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 4370 4375 4380
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
 4385 4390 4395 4400
 Glu Cys Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 4405 4410 4415
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 4420 4425 4430


```

Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
4435 4440 4445
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
4450 4455 4460
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
4465 4470 4475 4480
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
4485 4490 4495
Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Glu Asn Gly Asn Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr
4500 4505 4510
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
4515 4520 4525
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
4530 4535 4540
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
4545 4550 4555
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
4565 4570 4575
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
4580 4585 4590
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
4595 4600 4605
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
4610 4615 4620
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
4625 4630 4635 4640
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
4645 4650 4655
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
4660 4665 4670
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
4675 4680 4685
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
4690 4695 4700
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
4705 4710 4715 4720
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
4725 4730 4735
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
4740 4745 4750
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
4755 4760 4765
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
4770 4775 4780
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
4785 4790 4795 4800
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
4805 4810 4815
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
4820 4825 4830
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
4835 4840 4845
Leu Ser Pro Gly

```

4850

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело против рецептора лимфотоксина- β (LT- β -R) или его антиген-связывающий фрагмент, у которых гипервариабельные участки легкой цепи определены остатками аминокислот 24-34, 50-56 и 89-97 последовательности SEQ ID NO:1, а гипервариабельные участки тяжелой цепи определены остатками аминокислот 31-35, 50-66 и 99-109 последовательности SEQ ID NO:2, при этом антитело содержит в легкой цепи по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, включающей в себя K3, W41, I46, Q69 и Y71, или содержит в тяжелой цепи по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, включающей в себя F37, T40, A49, M89 и V93.

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что оно содержит последовательность вариабельного домена легкой цепи, определенную остатками аминокислот 1-107 последовательности SEQ ID NO:8.

3. Антитело по п.1, отличающееся тем, что оно содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, определенную остатками аминокислот 1-120 последовательности SEQ ID NO:16.

4. Антитело по п.2, отличающееся тем, что оно дополнительно содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, определенную остатками аминокислот 1-120 последовательности SEQ ID NO:16.

5. Гуманизированное антитело против рецептора лимфотоксина- β (LT- β -R) или его антиген-связывающий фрагмент, у которых гипервариабельные участки легкой цепи определены остатками аминокислот 24-34, 50-56 и 89-97 последовательности SEQ ID NO:1, гипервариабельные участки тяжелой цепи определены остатками аминокислот 31-35, 50-66 и 99-109 последовательности SEQ ID NO:2, и содержащее остаток Y71 в легкой цепи.

6. Гуманизированное антитело против рецептора лимфотоксина- β (LT- β -R) или его антиген-связывающий фрагмент, у которых гипервариабельные участки легкой цепи определены остатками аминокислот 24-34, 50-56 и 89-97 последовательности SEQ ID NO:1, гипервариабельные участки тяжелой цепи определены остатками аминокислот 31-35, 50-66 и 99-109 последовательности SEQ ID NO:2, и содержащее остатки F37 и A49 в тяжелой цепи.

7. Антитело, содержащее такие же полипептидные последовательности тяжелой и легкой цепей, как антитело, продуцируемое клеточной линией E46.4 (ATCC PTA-3357) или клеточной линией E77.4

(ATCC PTA-3765).

8. Антитело по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что оно в значительной степени сохраняет связывающие свойства исходного антитела.

9. Гуманизированное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.5, дополнительно содержащее в легкой цепи остатки W41, I46 или замену их консервативных аминокислот; или остатки K3, W41, I46, Q69, или замену их консервативных аминокислот.

10. Гуманизированное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.6, дополнительно содержащее в тяжелой цепи остаток V93 или замену его консервативной аминокислоты; или остатки T40, M89, V93, или замену их консервативных аминокислот.

11. Гуманизированное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-7, 9, 10, представляющие собой IgG1 или его антиген-связывающий фрагмент.

12. Гуманизированное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-7, 9, 10, где антиген-связывающий фрагмент выбран из группы, включающей фрагменты Fab, F(ab')₂ или Fv.

13. Антитело по любому из пп.1-7, 9, 10, отличающееся тем, что оно далее присоединено к иммунотоксину.

14. Антитело по любому из пп.1-7, 9, 10, отличающееся тем, что оно далее присоединено к химиотерапевтическому лекарственному веществу.

15. Композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-7, 9, 10, и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Способ лечения или снижения риска развития, тяжести или последствий неоплазии у человека, отличающийся тем, что вводят композицию по п.15.

17. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую легкую цепь антитела, продуцируемого клеточной линией E46.4 (ATCC PTA-3357) или клеточной линией E77.4 (ATCC PTA-3765).

18. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела, продуцируемого клеточной линией E46.4 (ATCC PTA-3357) или клеточной линией E77.4 (ATCC PTA-3765).

19. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеотидов, кодирующую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:32 и SEQ ID NO:8.

20. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеотидов, кодирующую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:33 и SEQ ID NO:16.

21. Клетка клеточной линии E46.4, депонированная в Американской коллекции культур (ATCC) под номером PTA-3357.

22. Клетка клеточной линии E77.4, депонированная в Американской коллекции культур под номером PTA-3765.

23. Применение гуманизированного антитела против рецептора лимфотоксина-β (LT-β-R) или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп.1-7, 9 и 10 в приготовлении фармацевтической композиции для уменьшения объема опухоли или для лечения солидной опухоли у человека.

24. Применение по п.23 для уменьшения объема или для лечения опухоли, выбранной из группы, включающей немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), колоректальный рак (CRC), рак простаты, рак желудка, рак кожи, рак пищевода, рак мочевого пузыря, аденокарциному толстой кишки, карциному шейки матки, меланому, карциному молочной железы и первичные опухоли толстой кишки.

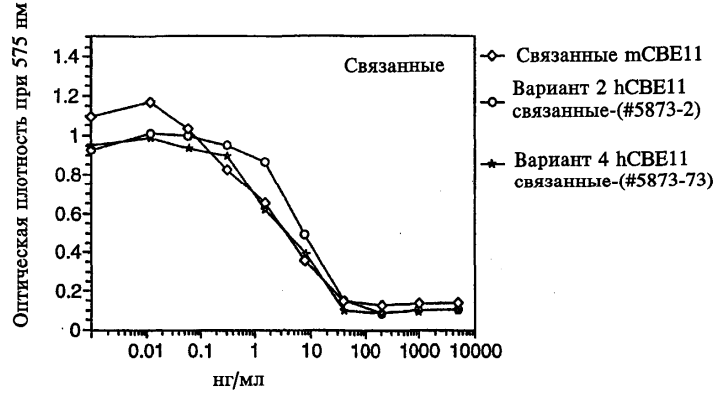
25. Применение по любому из пп.23-24 в приготовлении композиции, предназначенной для использования в сочетании или в связи с агентом, выбранным из группы, включающей химиотерапевтическое средство, цитотоксический фактор или иммунотоксин.

26. Применение по п.25 в приготовлении композиции, предназначенной для использования в сочетании или в связи с химиотерапевтическим средством, выбранным из группы, включающей адриамицин, 5FU (5-фторурацил), винбластин, актиномицин D, этопозид, цисплатин, метотрексат и доксорубин.

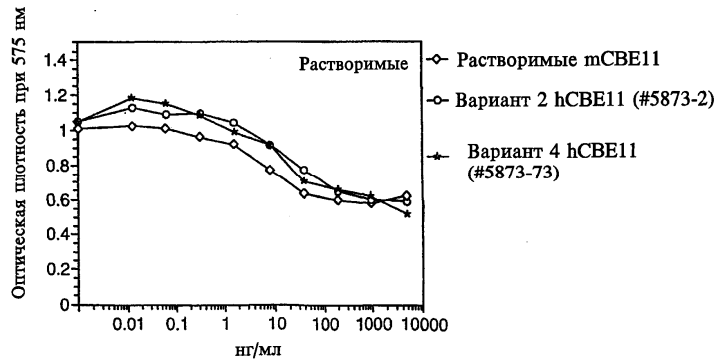
27. Применение по п.26 в приготовлении композиции, предназначенной для использования в сочетании или в связи с цитотоксическим фактором, выбранным из группы, включающей IFN-γ, TNF-α, TNF-β, IL-1 и IL-2.

28. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.19 или/и 20.

Анализ цитотоксичности huСВЕ11

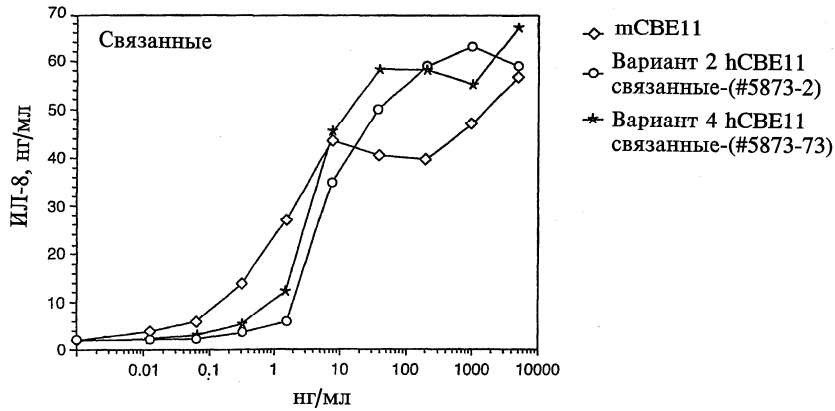


Фиг. 1



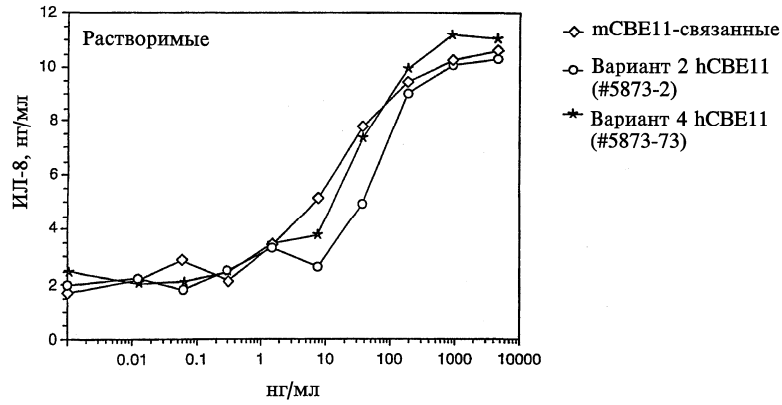
Фиг. 2

Агонизм huСВЕ11 в отношении ИЛ-8 на клетках А375



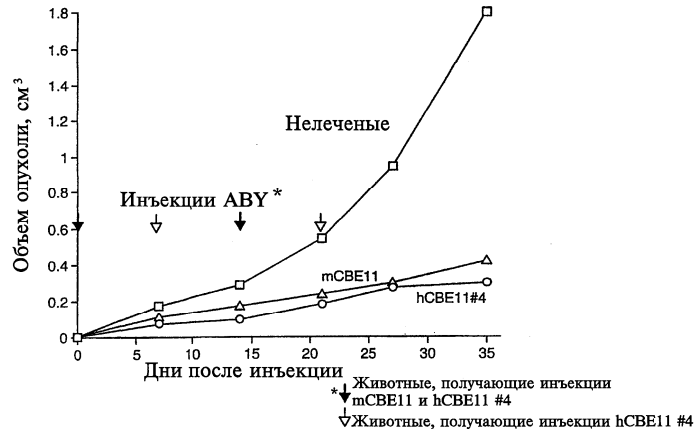
Фиг. 3

Агонизм huСВЕ11 в отношении ИЛ-8 на клетках А375



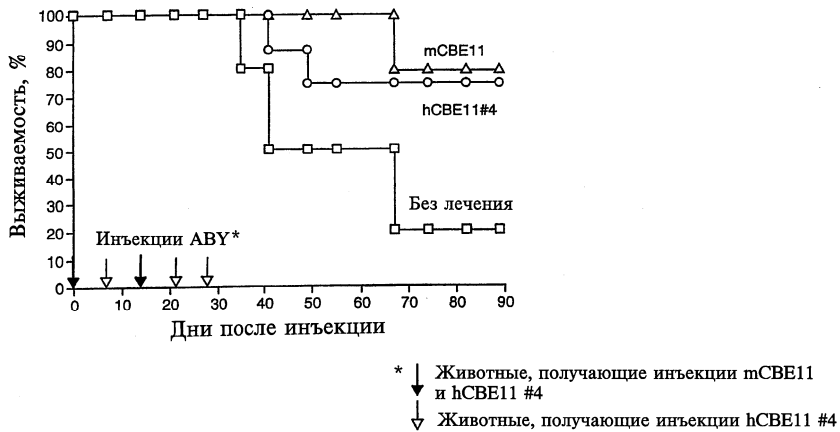
Фиг. 4

hСВЕ11#4 подавляет рост аденокарциномы WIDR у голых мышей



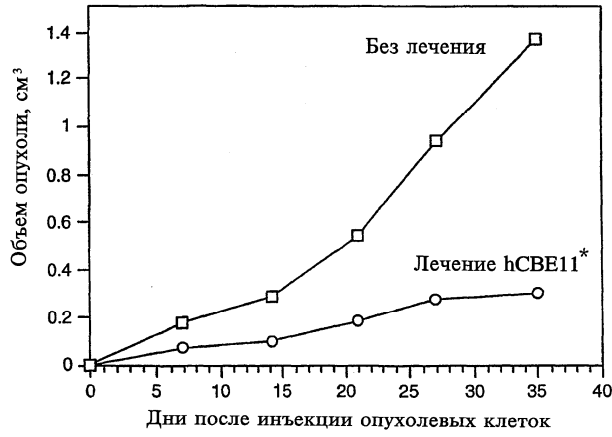
Фиг. 5

Выживаемость животных, содержащих ксенотрансплантаты аденокарциномы WIDR, продлевается с помощью лечения hСВЕ11 #4



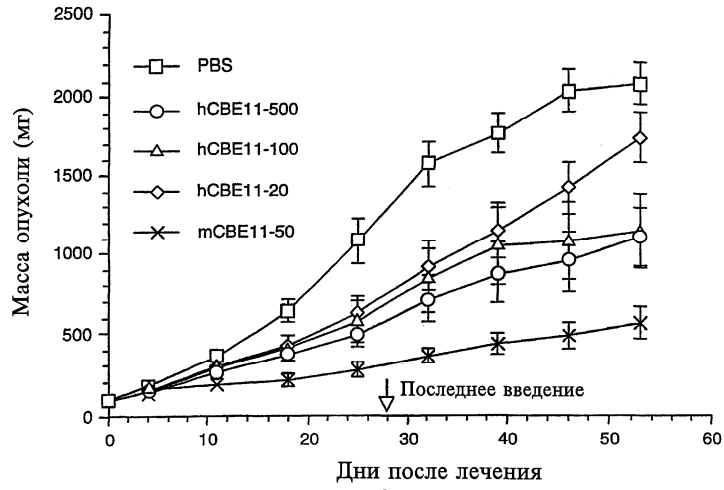
Фиг. 6

Гуманизированное СВЕ11 подавляет
рост клеток опухоли WIDR у голых мышей

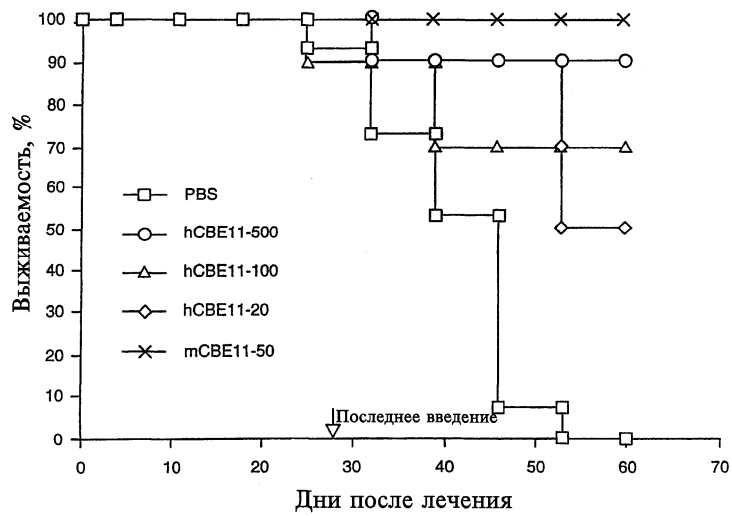


* Животные, получающие инъекции hСВЕ11 (100 мкг) внутривенно в дни 0, 7, 14 и 21

Фиг. 7

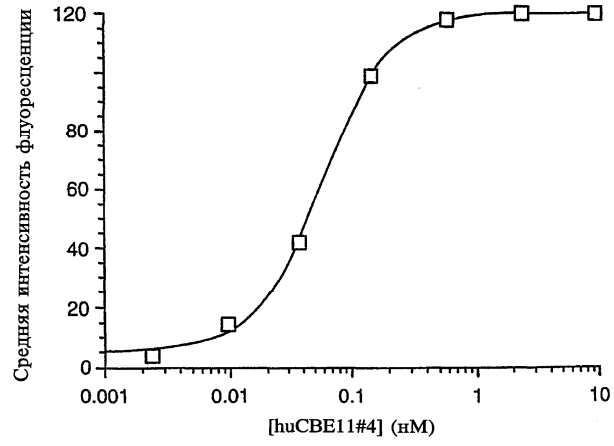


Фиг. 8



Фиг. 9

006945



Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6
