

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **021512**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2015.07.30

(21) Номер заявки
201171307

(22) Дата подачи заявки
2010.04.29

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(54) АНТАГОНИСТЫ ТОЛЛ-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 3

(31) 61/173,686; 12/609,675

(32) 2009.04.29; 2009.10.30

(33) US

(43) 2012.07.30

(86) PCT/US2010/032964

(87) WO 2010/127113 2010.11.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Каннингхэм Марк, Фэн Ицин,
Хиринга Катарина, Ло Цзиньцюань
(US), Раухенбергер Роберт, Рутц Марк
(DE), Сан Матео Лани, Сариски
Роберт Т., Свит Рэймонд, Тэн Фан,
Тепляков Алексей, Ву Шэн-Дзюн (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A2-2003031573
US-A1-2007098716

FLORIS FRANSEN et al. Agonists of Toll-Like Receptors 3, 4, 7, and 9 Are Candidates for Use as Adjuvants in an Outer Membrane Vaccine against Neisseria meningitidis Serogroup B. Infection and Immunity, 2007 Dec; 75(12), с. 5939-5946

MISAKO MATSUMOTO et al. Subcellular Localization of Toll-Like Receptor 3 in Human Dendritic Cells. J. Immunol, 2003; 171(6): 3154-3162

KAREN E. DUFFY et al. Down modulation of human TLR3 function by a monoclonal antibody. Cellular Immunology, 2007 Aug; 248(2), с. 103-114

(57) Описываются антитела-антагонисты толл-подобного рецептора 3 (TLR3), полинуклеотиды, кодирующие антитела-антагонисты TLR3 или их фрагменты, и способы изготовления и применения вышеуказанных веществ.

B1

021512

021512 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, являющимся антителами-антагонистами толл-подобного рецептора 3 (TLR3), полинуклеотидам, кодирующим антитела-антагонисты TLR3 или их фрагменты, а также к способам получения и использования названных продуктов.

Предпосылки создания изобретения

Толл-подобный рецептор (TLR) регулирует активацию врожденного иммунного ответа, а также развитие адаптивного (специфического) иммунитета, активируя каскады внутриклеточной передачи сигнала в ответ на связывание бактериальных, вирусных, паразитических, а в некоторых случаях и эндогенных лигандов (Lancaster et al., *J. Physiol.* 563:945-955, 2005). Расположенные на плазматической мембране TLR, TLR1, TLR2, TLR4 и LR6 распознают лиганды, включая белковые или липидные компоненты бактерий и грибов. Толл-подобные рецепторы, TLR3, TLR7 и TLR9, преимущественно внутриклеточные, активируются двухцепочечными РНК, одноцепочечными РНК и метилированными CpG ДНК соответственно. Считается, что дисрегуляция сигнального пути TLR является причиной множества проблем, и терапевтические стратегии развиваются в этом направлении (Hoffman et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* 4:879-880, 2005; Rezaei, *Int. Immunopharmacol.* 6:863-869, 2006; Wickelgren, *Science* 312:184-187, 2006). Например, антагонисты TLR4, а также TLR7 и TLR9, проходят клинические испытания возможности их применения для лечения тяжелого сепсиса и системной красной волчанки соответственно (Kanzler et al., *Nat. Med.* 13:552-559, 2007).

Сигнальный путь TLR3 активируется двухцепочечной РНК, матричной РНК или РНК, высвобождаемой некротическими клетками при воспалении или вирусной инфекции. Активация TLR3 индуцирует секрецию интерферонов и провоспалительных цитокинов, а также приводит к активации и увеличению числа иммунных клеток, защищая таким образом от некоторых микробных инфекций. Например, обнаружена связь доминантно-негативного аллеля TLR3 с повышенной восприимчивостью к энцефалиту, вызванному вирусом простого герпеса, после первичного инфицирования вирусом HSV-1 в детском возрасте (Zheng et al., *Science* 317:1522-1527, 2007). У мышей недостаток TLR3 связан с пониженной выживаемостью при экспериментальном заражении вирусом Коксаки (Richer et al., *PLoS One* 4:e4127, 2009). Тем не менее, показано, что нарушенная регуляция сигнального пути TLR3 имеет отношение к заболеваемости и смертности при определенных вирусных инфекциях, в том числе вызванных вирусом западнонильской лихорадки, флебовирусом, вирусом коровьей оспы и вирусом гриппа типа А (Wang et al., *Nat. Med.* 10:1366-1373, 2004; Gowen et al., *J. Immunol.* 177:6301-6307, 2006; Hutchens et al., *J. Immunol.* 180:483-491, 2008; Le Goffic et al., *PloS Pathog.* 2:E53, 2006).

Кристаллическая структура внеклеточных доменов человеческого и мышинного TLR3 известна (Bell et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 102:10976-80, 2005; Choe et al., *Science* 309:581-585, 2005; Liu et al., *Science*, 320:379-381, 2008). TLR3 имеет подковообразную форму соленоида, несет на своей поверхности гликаны и включает 23 домена, состоящих из лейциновых повторов (LRR). Были картированы участки связывания двухцепочечной РНК в двух разных областях (Liu et al., *Science*, 320:379-81, 2008). Предполагается, что сигнальная единица состоит из одной двухцепочечной РНК и двух внеклеточных доменов TLR3 (Leonard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 105:258-263, 2008).

Показано, что TLR3 запускает патогенные механизмы при целом ряде воспалительных, иммуноопосредованных и аутоиммунных заболеваний, включающих, например, септический шок (Cavassani et al., *J. Exp. Med.* 205:2609-2621, 2008), острое поражение легких (Murray et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178:1227-1237, 2008), ревматоидный артрит (Kim et al., *Immunol. Lett.* 124:9-17, 2009; Brentano et al., *Arth. Rheum.* 52:2656-2665, 2005), астму (Sugiura et al., *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 40:654-662, 2009; Morishima et al., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 145:163-174, 2008; Stowell et al., *Respir. Res.* 10:43, 2009), воспалительные заболевания ЖКТ, например, болезнь Крона и язвенный колит (Zhou et al., *J. Immunol.* 178:4548-4556, 2007; Zhou et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 104:7512-7515, 2007), аутоиммунные заболевания печени (Lang et al., *J. Clin. Invest.* 116:2456-2463, 2006) и сахарный диабет I типа (Dogusan et al., *Diabetes* 57:1236-1245, 2008; Lien and Zipris, *Curr. Mol. Med.* 9:52-68, 2009). Кроме того, показано, что органоспецифическая экспрессия TLR3 коррелирует с рядом патологических состояний, вызываемых нарушением регуляции местных воспалительных реакций, например, в тканях печени при первичном билиарном циррозе (Takii et al., *Lab Invest.* 85:908-920, 2005), в суставах при ревматоидном артрите (Osipelt et al., *Arthritis Rheum.* 58:3684-3692, 2008) и слизистой оболочке носа при аллергическом рините (Fransson et al., *Respir. Res.* 6:100, 2005).

При некрозе высвобождение клеточного содержимого, в том числе эндогенных матричных РНК, индуцирует секрецию цитокинов, хемокинов и других факторов, которые инициируют процесс местного воспаления, облегчают уничтожение клеточных остатков и восстановительный процесс. Некроз часто приводит к непрекращающемуся воспалительному процессу, способствуя его переходу в хроническую форму или усилению (Bergsbaken et al., *Nature Reviews* 7:99-109, 2009). Активация TLR3 в месте некроза может способствовать развитию ненормального воспалительного процесса и привести к возникновению провоспалительной положительной обратной связи за счет высвобождения лигандов TLR3. Таким образом, антагонисты TLR3 могут играть положительную роль при многих заболеваниях, сопровождающихся хроническим или острым воспалением и/или некрозом.

Снижение активации TLR3 может рассматриваться как новая стратегия в лечении онкологических заболеваний, таких как почечноклеточный рак и плоскоклеточный (эпидермальный) рак области головы и шеи (Morikawa et al., Clin. Cancer Res. 13:5703-5709, 2007; Pries et al., Int. J. Mol. Med. 21:209-215, 2008). Кроме того, аллель TLR3^{L423F}, кодирующий белок с меньшей активностью, связан с функцией защиты против продвинутой "сухой" макулярной дегенерации вследствие возрастных изменений (Yang et al., N. Engl. J. Med. 359:1456-1463, 2008), что указывает на возможную положительную роль антагонистов TLR3 при этом заболевании.

Заболевания, связанные с воспалением, также как и заболевания, вызываемые инфекциями, имеют значительное влияние на здоровье и, следовательно, большое экономическое значение. Тем не менее, несмотря на прогресс во многих областях медицины, существует относительно мало возможностей для лечения большинства названных заболеваний.

Таким образом, существует необходимость в подавлении активности TLR3 для лечения связанных с функцией этого рецептора заболеваний.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показан эффект моноклональных антител (mAb) против человеческого TLR3 (huTLR3) в эксперименте с использованием гена-репортера NF-kB.

На фиг. 2A и 2B показан эффект (% ингибирования) или эффект моноклональных антител против человеческого TLR3 в эксперименте с использованием гена BEAS-2B.

На фиг. 3A и 3B показан эффект моноклональных антител против человеческого TLR3 в эксперименте с использованием гена NHBE.

На фиг. 4 показан эффект моноклональных антител против человеческого TLR3 в эксперименте с использованием гена RBMC.

На фиг. 5A и 5B показан эффект моноклонального антитела против человеческого TLR3 в эксперименте с использованием гена HASM.

На фиг. 6A, 6B и 6C показано связывание моноклонального антитела против человеческого TLR3 с мутантами TLR3.

На фиг. 7A показаны эпитопы, распознаваемые mAb 15EVQ (черным цветом) и C1068 (серым цветом) (верхняя часть фигуры), и эпитопы, распознаваемые mAb 12QVQ/QSV (черным цветом, нижняя часть фигуры), наложенные на изображение структуры внеклеточного домена человеческого TLR3. На фиг. 7B показана карта возмущений при избирательном замещении водорода дейтерием в случае, когда внеклеточный домен TLR3 образует комплекс с mAb 15EVQ.

На фиг. 8A и 8B показан эффект суррогатных крысиных/мышинных mAb (mAb против мышинного TLR3, mAb 5429) в экспериментах с использованием А) гена-репортера NF-kB и В) гена-репортера ISRE.

На фиг. 9 показан эффект суррогатных mAb (mAb 5429, mAb c1811) в эксперименте с MEF CXCL10/IP-10.

На фиг. 10 показана специфичность связывания суррогатных mAb с TLR3. Верхняя панель: контроль изотипа; нижняя панель: mAb c1811.

На фиг. 11 показано влияние суррогатных mAb на уровень репН в при экспериментально индуцированной гиперчувствительности дыхательных путей (ГДП).

На фиг. 12 показан эффект суррогатных mAb на общее число нейтрофилов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) при гиперчувствительности дыхательных путей (ГДП).

На фиг. 13 показан эффект влияния суррогатных mAb на уровень продукции CXCL10/IP-10 в жидкости после лаважа при ГДП.

На фиг. 14 показан эффект суррогатных mAb на гистопатологические показатели при использовании декстран сульфата натрия (ДСН).

На фиг. 15 показан эффект суррогатных mAb на А) гистопатологические показатели и В) приток нейтрофилов при переносе Т-клеток.

На фиг. 16 показано влияние суррогатных mAb на клинические показатели при коллаген-индуцированном артрите (КИА).

На фиг. 17 показан эффект суррогатных mAb на площадь под кривой, описывающей динамику клинических показателей, при КИА.

На фиг. 18 показано влияние суррогатных mAb на выживаемость мышей C57BL/6 после интраназального введения вируса гриппа А/PR/8/34. Введение mAb началось в день -1.

На фиг. 19 показано влияние суррогатных mAb на клинические показатели после заражения вирусом гриппа типа А/PR/8/34. Введение mAb началось в день -1.

На фиг. 20 показано влияние суррогатных mAb на массу тела в течение 14 дней после введения вируса гриппа А/PR/8/34. Введение mAb началось в день -1.

На фиг. 21 показано влияние суррогатных mAb на концентрацию глюкозы в крови у животных (А) WT DIO и (В) TLR3KO DIO после пробного введения глюкозы.

На фиг. 22 показано влияние суррогатных mAb на концентрацию инсулина у животных WT DIO.

На фиг. 23 показано влияние mAb 15EVQ на (А) NTHi и (В) продукцию CXCL10/IP-10 и CCL5/RANTES в клетках NHBE, индуцированную риновирусом.

На фиг. 24 показано влияние mAb 15EVQ на (А) содержание sICAM-1 и (В) жизнеспособность клеток HUVEC.

На фиг. 25 показана выживаемость животных после введения суррогатных mAb через 3 дня после инфекции вирусом гриппа А.

На фиг. 26 показаны оценки клинического состояния после введения суррогатных mAb через 3 дня после заражения вирусом гриппа А.

На фиг. 27 показано изменение массы тела животных после введения суррогатных mAb через 3 дня после инфекции вирусом гриппа А.

На фиг. 28 показана молекулярная структура четвертичного комплекса внеклеточного домена TLR3 с Fab 12QVQ/QSV, Fab 15EVQ и Fab c1068 в А с представлением цепей в форме лент и общей структурой поверхности. Внеклеточный домен TLR3 показан светло-серым цветом, N-конец отмечен буквой N; все Fab-фрагменты на схеме расположения цепей показаны темно-серым цветом. В. Эпитопы показаны светло-серым цветом и помечены на схеме внеклеточного домена TLR3 так же, как Fab в А. На фиг. 28, 29 и 30 Fab 12QVQ/QSV, Fab c1068 и Fab 15EVQ сокращенно указаны как Fab12, Fab1068 и Fab15, соответственно, для ясности.

Фиг. 29 показывает механизм нейтрализации Fab 15EVQ. А. Сигнальная единица (СЕ) двухцепочечная РНК:TLR3 с эпитопом Fab 15EVQ, отмеченным светло-серым цветом, в одном из двух внеклеточных доменов TLR3 (светло- и темно-серый цвет, и помечен TLR3). Лиганд двухцепочечной РНК показан в виде двойной спирали серого цвета. В. Иллюстрация связывания Fab 15EVQ, создающего стерические препятствия для связывания с двухцепочечной РНК и, таким образом, образования СЕ. Связывание Fab 15EVQ с высоким сродством будет препятствовать формированию СЕ или вызовет распад уже образовавшейся СЕ.

На фиг. 30 показан механизм Fab 12QVQ/QSV и Fab c1068 и соединения единиц в сигнальную единицу (СЕ) TLR3. А. Fab 12QVQ/QSV и Fab c1068 могут связываться (в том числе совместно) с одной СЕ. В. Модель тесного объединения двух СЕ на двухцепочечной РНК длиной примерно 76 пар оснований. Для наглядности три эпитопа выделены цветом. С. Связывание Fab 12QVQ/QSV и Fab c1068 препятствует объединению СЕ из-за стерических столкновений между антителами и соседними СЕ. Две стрелки, направленные влево, обозначают разные количественные степени разделения СЕ под влиянием антител (нижняя стрелка относится к Fab 12QVQ/QSV, а верхняя - к Fab c1068).

На фиг. 31 показано соответствие между последовательной нумерацией и системой нумерации Кабата и Чотиа на примерах антител. Области, определяющие комплементарность, и гипервариабельные участки показаны серым цветом.

На фиг. 32 показано совмещение региона VL mAb 15EVQ с каркасным сегментом человеческого антитела Vk1. Гипервариабельные петли Чотиа подчеркнуты, паратопы подчеркнуты двойной чертой, а различия каркасного сегмента показаны серым цветом. Гены Vk1 представляют собой аллели *01, если не указано иное. Нумерация остатков последовательная.

На фиг. 33 показано совмещение региона VH mAb 15EVQ с каркасным сегментом человеческого антитела Vh5. Особенности последовательности показаны, как на фиг. 32.

На фиг. 34 показано совмещение региона VL mAb 12QVQ/QSV с каркасным сегментом человеческого антитела Vk3. Особенности последовательности показаны, как на фиг. 32.

На фиг. 35 показано совмещение областей VL и VH mAb 15EVQ или mAb 12QVQ/QSV с каркасными сегментами человеческого антитела Jk, Jλ или Jh. Особенности последовательности показаны, как на фиг. 32.

Изложение сущности изобретения

Один из аспектов изобретения относится к изолированному антителу или его фрагменту, при этом антитело связывается с аминокислотными остатками K416, K418, L440, N441, E442, Y465, N466, K467, Y468, R488, R489, A491, K493, N515, N516, N517, H539, N541, S571, L595 и K619 SEQ ID NO: 2 толл-подобного рецептора 3 (TLR3).

Другой аспект настоящего изобретения относится к изолированному антителу или его фрагменту, при этом антитело связывается с аминокислотными остатками S115, D116, K117, A120, K139, N140, N141, V144, K145, T166, Q167, V168, S188, E189, D192, A195 и A219, SEQ ID NO: 2 толл-подобного рецептора 3 (TLR3).

Другой аспект настоящего изобретения относится к изолированному антителу, имеющему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, или его фрагменту, при этом антитело связывается с TLR3, имеющим аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, через вариабельную область тяжелой цепи с остатками Чотиа W33, F50, D52, D54, Y56, N58, P61, E95, Y97, Y100 и D100b и вариабельную область легкой цепи с остатками Чотиа Q27, Y32, N92, T93, L94 и S95.

Другой аспект настоящего изобретения относится к изолированному антителу, имеющему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, или его фрагменту, при этом антитело связывается с TLR3, имеющим аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2

через вариабельную область тяжелой цепи с остатками Чотиа N31a, Q52, R52b, S53, K54, Y56, Y97, P98, F99 и Y100, и вариабельную область легкой цепи с остатками Чотиа G29, S30, Y31, Y32, E50, D51, Y91, D92 и D93.

Следующий аспект настоящего изобретения заключается в изолированных антителах, способных реагировать с TLR3, причем антитела имеют по меньшей мере одно из следующих свойств:

- a) связываются с человеческим TLR3 с $K_d < 10$ нМ;
- b) уменьшают биологическую активность TLR3 в анализе *in vitro* с использованием гена-репортера NF- κ B и поли(I:C) на $\geq 50\%$, при концентрации 1 мкг/мл;
- c) на $\geq 60\%$ ингибируют продукцию IL-6 или CXCL10/IP-10 в клетках BEAS-2B, стимулированных воздействием < 100 нг/мл поли(I:C), при концентрации 10 мкг/мл;
- d) на $\geq 50\%$ ингибируют продукцию IL-6 или CXCL10/IP-10 в клетках BEAS-2B, стимулированных воздействием < 100 нг/мл поли(I:C), при концентрации 0,4 мкг/мл;
- e) на $\geq 50\%$ ингибируют продукцию IL-6 в клетках NHBE, стимулированных воздействием 62,5 нг/мл поли(I:C), при концентрации 5 мкг/мл;
- f) на $\geq 50\%$ ингибируют продукцию IL-6 в клетках NHBE, стимулированных воздействием 62,5 нг/мл поли(I:C), при концентрации 1 мкг/мл;
- g) на $\geq 20\%$ ингибируют поли(I:C)-индуцированную продукцию IFN- γ , IL-6 или IL-12 в клетках PBMC, при концентрации 1 мкг/мл;
- h) ингибируют биологическую активность TLR3 яванского макака в анализе *in vitro* с использованием гена-репортера NF- κ B при $IC_{50} < 10$ мкг/мл; или
- i) ингибируют биологическую активность TLR3 яванского макака в анализе *in vitro* с использованием гена-репортера ISRE при $IC_{50} < 5$ мкг/мл.

Следующий аспект данного изобретения заключается в изолированных антителах, способных взаимодействовать с TLR3, конкурирующих за связывание TLR3 с моноклональными антителами, причем эти моноклональные антитела состоят из аминокислотных последовательностей участков 1, 2 и 3, определяющих комплементарность (complementarity determining regions - CDR) определенных тяжелых цепей, аминокислотных последовательностей CDR 1, 2 и 3 определенных легких цепей, а также из аминокислотных последовательностей вариабельных участков определенных тяжелых цепей (VH) или аминокислотных последовательностей вариабельных участков определенных легких цепей (VL).

Следующий аспект данного изобретения заключается в изолированных антителах, способных реагировать с TLR3, содержащих как вариабельный участок тяжелой, так и вариабельный участок легкой цепи, причем эти антитела также содержат определяющие комплементарность участки 1, 2 и 3 (CDR) определенных тяжелых цепей и аминокислотные последовательности 1, 2 и 3 участков CDR определенных легких цепей.

Следующий аспект данного изобретения заключается в изолированных антителах, способных реагировать с TLR3, содержащих вариабельные участки как тяжелой, так и легкой цепи, причем эти антитела также содержат аминокислотные последовательности вариабельных участков определенных тяжелых цепей (VH) и аминокислотные последовательности вариабельных участков определенных легких цепей (VL).

Следующий аспект данного изобретения заключается в изолированных антителах, способных реагировать с TLR3, содержащих вариабельные участки как тяжелой, так и легкой цепей, причем эти антитела также содержат аминокислотные последовательности определенных тяжелых цепей и аминокислотные последовательности определенных легких цепей.

Следующий аспект данного изобретения заключается в изолированной тяжелой цепи антитела, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 159, 198, 200, 202, 164, 212, 213, 214, 215 или 216.

Следующий аспект данного изобретения заключается в изолированной тяжелой цепи антитела, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 122, 123, 197, 199, 201, 163, 209, 210, 211 или 225.

Следующий аспект данного изобретения заключается в изолированной тяжелой цепи антитела, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 102, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 160, 204, 206, 208, 220, 166 или 168.

Следующий аспект данного изобретения заключается в изолированной легкой цепи антитела, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158, 203, 205, 207, 165, 167 или 227.

Следующий аспект данного изобретения заключается в изолированном полинуклеотиде, кодирующем тяжелую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 159, 198, 200, 202, 164, 212, 213, 214, 215 или 216.

Следующий аспект данного изобретения заключается в изолированном полинуклеотиде, кодиру-

шем легкую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 122, 123, 197, 199, 201, 163, 209, 210, 211 или 225.

Следующий аспект данного изобретения заключается в изолированном полинуклеотиде, кодирующем тяжелую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 102, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 160, 204, 206, 208, 220, 166 или 168.

Следующий аспект данного изобретения заключается в изолированном полинуклеотиде, кодирующем легкую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158, 203, 205, 207, 165, 167 или 227.

Следующий аспект данного изобретения заключается в фармацевтической композиции, состоящей из изолированных антител настоящего изобретения и фармацевтически приемлемых носителей.

Следующий аспект данного изобретения заключается в векторе, включающем по меньшей мере один полинуклеотид, представленный в данном изобретении.

Следующий аспект данного изобретения заключается в клетках-хозяевах, содержащих вектор, представленный в данном изобретении.

Следующий аспект данного изобретения заключается в способе получения антител, способных реагировать с TLR3, заключающемся в культивировании клеток-хозяев, представленных в данном изобретении, и отборе антител, производимых клетками-хозяевами.

Следующий аспект данного изобретения заключается в способе лечения или профилактики воспалительных заболеваний, который включает введение терапевтически эффективных доз изолированных антител, представленных в данном изобретении, нуждающимся в лечении пациентам в течение периода, достаточного для лечения или предупреждения воспалительного заболевания.

Следующий аспект данного изобретения заключается в способе лечения или профилактики системных воспалительных заболеваний, который включает введение терапевтически эффективных доз изолированных антител, представленных в данном изобретении, нуждающимся в лечении пациентам в течение периода, достаточного для лечения или предупреждения системного воспалительного заболевания.

Следующий аспект данного изобретения заключается в способе лечения диабета 2 типа, который включает введение терапевтически эффективных доз изолированных антител, представленных в данном изобретении, нуждающимся в лечении пациентам в течение периода, достаточного для лечения диабета 2 типа.

Следующий аспект данного изобретения заключается в способе лечения гипергликемии, который включает введение терапевтически эффективных доз изолированных антител, представленных в данном изобретении, нуждающимся в лечении пациентам в течение периода, достаточного для лечения гипергликемии.

Следующий аспект данного изобретения заключается в способе лечения гиперинсулинемии, который включает введение терапевтически эффективных доз изолированных антител, представленных в данном изобретении, нуждающимся в лечении пациентам в течение периода, достаточного для лечения резистентности к инсулину.

Следующий аспект данного изобретения заключается в способе лечения или профилактики вирусных инфекций, который включает введение терапевтически эффективных доз изолированных антител, представленных в данном изобретении, нуждающимся в лечении пациентам в течение периода, достаточного для лечения или профилактики вирусных инфекций.

Подробное описание изобретения

Все публикации, упоминаемые в данном описании, в том числе, помимо прочего, патенты и патентные заявки, включенные в настоящее описание путем ссылки, являются частью настоящего документа, как если бы они были изложены непосредственно в настоящем документе.

Используемый в данном изобретении термин "антагонист" означает молекулу, которая любым способом, частично или полностью, ингибирует эффект другой молекулы, такой как рецептор или внутриклеточный медиатор.

Используемый в данном изобретении термин "антитела-антагонисты TLR3" или антитела, "способные реагировать с TLR3", относится к антителам, способным прямо или косвенно физически взаимодействовать, уменьшать или ингибировать биологическую активность TLR3 или активацию рецептора TLR3. Например, антитело, способное реагировать с TLR3, может связываться непосредственно с TLR3 и нейтрализовать активность TLR3, т.е. блокировать сигнальный путь TLR3, приводя к уменьшению продукции цитокинов и хемокинов, либо к активации NF-κB.

Используемый в данном изобретении термин "антитела" имеет широкое значение и относится к иммуноглобулинам или молекулам антител, включая поликлональные антитела, моноклональные антитела, включая мышьиные/крысиные, человеческие, адаптированные к человеку, гуманизированные и химерные моноклональные антитела и фрагменты антител.

В общем смысле антитела являются белками или пептидными цепочками, которые специфически связываются со специфическим антигеном. Интактные антитела являются гетеротетрамерными гликопротеинами, состоящими из двух одинаковых легких цепей и двух одинаковых тяжелых цепей. Обычно,

каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью посредством одного ковалентного дисульфидного мостика, тогда как число дисульфидных связей между тяжелыми цепями различных иммуноглобулиновых изоформ может варьироваться. Каждая тяжелая и каждая легкая цепь также обладает регулярно расположенными внутренними дисульфидными мостиками. На одном конце каждой тяжелой цепи расположен варибельный домен (варибельная область, VH), за которой следует ряд постоянных доменов (постоянные области). Каждая легкая цепь имеет на одном конце варибельный домен (VL), а на другом конце постоянный домен. Постоянный домен легкой цепи находится напротив первого постоянного домена тяжелой цепи, а варибельный домен легкой цепи находится напротив варибельного домена тяжелой цепи. Исходя из аминокислотной последовательности постоянных доменов легкая цепь антитела любого вида позвоночных может быть отнесена к одному из двух четко различающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ).

Иммуноглобулины делятся на пять больших классов, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотного состава постоянного домена тяжелой цепи. IgA и IgG, в свою очередь, подразделяются на изоформы IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄.

Термин "фрагмент антитела" относится к части интактного антитела, обычно это антигенсвязывающий или варибельный участок интактного антитела. Например, к фрагментам антитела относятся фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, диатела, одноцепочечные фрагменты антитела и мультиспецифичные антитела, сформированные из по меньшей мере двух интактных антител.

Варибельные участки легкой или тяжелой цепи состоят из "каркасного" участка, прерванного тремя "антигенсвязывающими участками". Антигенсвязывающие участки могут называться по-разному, например, (i) термин "определяющие комплементарность участки" (CDR) отражает варибельность последовательности (Wu and Rabat, J. Exp. Med. 132:211-250, 1970). Как правило, антигенсвязывающий участок имеет шесть CDR; три из которых расположены на VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3), а другие три - на VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3) (Rabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) Согласно определению Чотии и Леска термин "гиперварибельный участок", "HVR", или "HV" относится к варибельному домену антитела, который имеет гиперварибельную структуру (Chothia and Lesk, Mol. Biol. 196:901-917, 1987). Как правило, антигенсвязывающий участок содержит шесть гиперварибельных областей, три из которых находятся в VH (H1, H2, H3) и три - в VL (L1, L2, L3). Чотиа и Леск называют структурно консервативные HV "каноническими структурами". (iii) "IMGT-CDR" Согласно Лефранку (Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003), термин "IMGT-CDR" основывается на сравнении пяти доменов иммуноглобулинов и рецепторов Т-клеток. В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT; <http://www.imgt.org>) приводится стандартизованное обозначение и определение этих участков. Соответствие между CDR, HV и IMGT подробно описано у Lefranc et al. (Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003). (iv) Антигенсвязывающий участок также может быть определен на основании использования остатков, определяющих специфичность (SDRU) (Almagro, Mol. Recognit. 17:132-143, 2004), где термин "определяющие специфичность аминокислотные остатки" (specificity determining residues, SDR) используется для обозначения аминокислотных остатков иммуноглобулинов, непосредственно вовлеченных в контакт с антигеном. SDRU - точная мера количества и распределения SDR для разных типов антигенов, согласно результатам анализа кристаллической структуры комплексов антиген-антитело. (v) Антигенсвязывающий участок также можно определить как остатки паратопа антитела, определенные в кристаллической структуре комплекса антиген-антитело.

Используемый в данном изобретении термин "композиционные последовательности" означает антигенсвязывающий участок, включающий все аминокислотные остатки, индивидуально упомянутые у Кабата, Чотии или в IMGT, или любые другие участки, определенные как антигенсвязывающие.

"Остатки Чотиа" в настоящем документе относятся к VL и VH областям антитела и нумеруются согласно Al-Lazikani (Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-48, 1997). Соответствие между двумя самыми употребительными системами нумерации, Кабата (Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NIH, Bethesda, MD, 1991) и Чотиа (Chothia and Lesk, Mol. Biol. 196:901-17, 1987) по отношению к последовательной нумерации полипептидов показано на фиг. 31 на примере антител, относящихся к настоящему изобретению.

Название "каркасный участок" или "каркасные последовательности" относится к последовательностям варибельных участков, которые не были определены как антигенсвязывающие. Каркасный участок обычно разделяют на четыре области, FR1, FR2, FR3 и FR3, образующие каркасную структуру для трех антигенсвязывающих участков в каждой варибельной области. Поскольку для определения антигенсвязывающего участка могут использоваться разные термины, как указано выше, определение точной последовательности аминокислот каркасного участка зависит от определения антигенсвязывающего участка.

"Каркасный участок варибельной области легкой цепи каппа 1 (V κ 1)" или "V κ 1" в настоящем документе означает каркасный участок с аминокислотной последовательностью, кодируемой любым из человеческих функциональных генов V κ 1 или их аллелей. Например, это следующие функциональные

человеческие гены V κ 1: IGKV1-5*01, IGKV1-6*01, IGKV1-8*01, IGKV1-9*01, IGKV1-12*01, IGKV1-13*02, IGKV1-16*01, IGKV1-17*01, IGKV1-27*01, IGKV1-33*01, IGKV1-37*01, IGKV1-39*01, IGKV1D-8*01, IGKV1D-12*01, IGKV1D-13*01, IGKV1D-16*01, IGKV1D-17*01, IGKV1D-33*01, IGKV1D-37*01, IGKV1D-39*01, IGKV1D-42*01 или IGKV1D-43*01. Номенклатура генов иммуноглобулина хорошо известна.

"Каркасный участок варибельной области легкой цепи лямбда 3 (V λ 3)" или "v λ 3" в настоящем документе означает каркасный участок с аминокислотной последовательностью, кодируемой любым из человеческих функциональных генов V λ 3 или их аллелей. Например, это следующие функциональные человеческие гены V λ 3: IGLV3-1*01, IGLV3-9*01, IGLV3-10*01, IGLV3-12*01, IGLV3-16*01, IGLV3-19*01, IGLV3-21*01, IGLV3-22*01, IGLV3-25*01, IGLV3-27*01 и IGLV3-32*01.

"Каркасный участок варибельной области легкой цепи Vh5 или "Vh5" в настоящем документе означает каркасный участок с аминокислотной последовательностью, кодируемой любым из человеческих функциональных генов Vh5" или их аллелей. Например, это следующие функциональные гены Vh5: IGHV5-51*01 и IGHV5-1*01.

"Каркасный участок варибельной области легкой цепи Vh6 или "Vh6" в настоящем документе означает каркасный участок с аминокислотной последовательностью, кодируемой любым из человеческих функциональных генов Vh6 или их аллелей. Например, это функциональный ген Vh6 IGHV6-1*01.

"Каркасный участок легкой цепи J-каппа (или J κ) в настоящем документе означает каркасный участок с аминокислотной последовательностью, кодируемой любым из человеческих функциональных генов J κ или их аллелей. Например, это функциональные человеческие гены V κ IGKJ1, IGKJ2, IGKJ3, IGKJ4 и IGKJ5.

"Каркасный участок J-лямбда легкой цепи (или J λ) в настоящем документе означает каркасный участок с аминокислотной последовательностью, кодируемой любым из человеческих функциональных генов J λ или их аллелей. Например, это функциональные человеческие гены J λ IGLJ1, IGLJ2, IGLJ3, IGLJ4, IGLJ5, IGLJ6 и IGLJ7.

"Каркасный участок J-области тяжелой цепи или "Jh" в настоящем документе означает каркасный участок с аминокислотной последовательностью, кодируемой любым из человеческих функциональных генов Jh или их аллелей. Например, это функциональные гены Jh IGJH1, IGJH2, IGJH3, IGJH4, IGJH5 и IGJH6.

Термин "гены зародышевой линии" или "гены зародышевой линии антитела" в настоящем документе означает последовательности иммуноглобулина, кодируемые нелимфоидными клетками, не претерпевшими процесс созревания, ведущий к генетической перестройке и мутации для экспрессии конкретного иммуноглобулина.

Термин "каркасный белок" в настоящем документе означает аминокислотные последовательности варибельной области легкой или тяжелой цепей, кодируемые человеческими зародышевыми генами. Таким образом, этот термин охватывает и каркасную область, и антигенсвязывающий участок.

Используемый в данном изобретении термин "антиген" означает любую молекулу, которая прямо или косвенно может приводить к выработке антител. Понятие "антиген" также включает кодирующую белок нуклеиновую кислоту.

Термин "гомолог" означает белковые последовательности, имеющие от 40 до 100% сходства по отношению к рассматриваемой последовательности. Гомологами человеческого TLR3 являются полипептиды других видов, имеющие от 40 до 100% сходства по отношению к уже известной последовательности человеческого TLR3. Идентичность между двумя пептидными цепочками, определенная в процентном соотношении, может быть вычислена путем попарного совмещения с помощью настройки по умолчанию в модуле AlignX программного обеспечения Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, CA). Термин "TLR3" обозначает человеческий TLR3 (huTLR3) и его гомологи. Полная нуклеотидная и аминокислотная последовательности человеческого TLR3 показаны в SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности внеклеточного домена (ECD) человеческого TLR3 представлены в SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно.

Используемый в данном изобретении термин "по существу, идентичный" означает, что аминокислотные последовательности двух антител или фрагментов антител при сравнении являются идентичными или имеют "незначительные отличия". Незначительными отличиями являются замещения 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот в аминокислотной последовательности антитела или фрагмента антитела. Аминокислотные последовательности, по существу, идентичные последовательностям, представленным в данном изобретении, также рассматриваются как часть данного изобретения. В некоторых случаях идентичность последовательностей может достигать 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. Идентичность в процентном соотношении может быть вычислена, как описано выше. Для сравнения пептидных цепочек наилучшим образом подходят варибельные участки тяжелой или легкой цепи.

Используемый в данном изобретении термин "в сочетании с" означает, что описанные активные вещества могут использоваться совместно, образуя смесь, по отдельности или последовательно в любом порядке.

Используемый в данном изобретении термин "воспалительное заболевание" означает местную (локальную) реакцию на клеточное повреждение, частично опосредованную активностью цитокинов, хемокинов или воспалительных клеток (например, нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов, макрофагов), которое в большинстве случаев сопровождается болью, покраснением, припухлостью и утратой тканью своей нормальной функции. Используемый в данном изобретении термин "воспаление легких" означает воспалительное заболевание, поражающее легкие или связанное с ними.

Используемый в данном изобретении термин "моноклональное антитело" (mAb) означает антитело (или фрагмент антитела), полученное из популяции, по существу, гомогенных антител. Моноклональные антитела высокоспецифичны и, как правило, направлены против единственной антигенной детерминанты. Определение "моноклональные" означает, по существу, гомогенный характер антител и не требует использования какого-либо определенного способа производства антител. Например, мышинные mAbs можно получить гибридным методом согласно Kohler et al. (Nature 256:495-497, 1975). Химерные mAbs, содержащие вариабельную область легкой и тяжелой цепи, полученные из донорного антитела (обычно мышинного) и постоянные области легкой и тяжелой цепей, полученные из акцепторного антитела (обычно другого вида млекопитающих, например, человека), можно получить по методу, описанному в патенте № 4816567. Гуманизированные mAb, имеющие CDR из донорного не человеческого иммуноглобулина (обычно мышинного) и оставшиеся части молекулы, взятые из одного или нескольких человеческих иммуноглобулинов, можно получить с помощью методик, известных специалистам, например, как описано в патенте № 5225539. Человеческие каркасные последовательности, используемые для получения гуманизированных антител, могут выбираться специалистами в этой области из соответствующих баз данных. В случае необходимости, для сохранения аффинности связывания гуманизированные mAb могут быть дополнительно модифицированы включением измененных оснований каркасного участка с помощью способов, предложенных Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:10029-10032, 1989 и Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421, 1991).

Полностью человеческие mAb, не содержащие ни одной экзогенной последовательности, могут быть получены от мышей, имеющих человеческий трансген, с помощью существующих методов (см., например, Lonberg Nature 368:856-859, 1994; Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-851, 1996; и Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156, 1997). Человеческие mAb могут быть получены и оптимизированы с помощью комбинаторных фаговых библиотек, а также с помощью других доступных способов (см., например, Knappik et al., J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000; и Krebs et al., J. Immunol. Meth. 254:67-84 2001). Фрагменты антител, например Fab, F(ab')₂, Fd и dAb, могут быть получены путем расщепления антител или методами рекомбинантной технологии. Например, фрагменты Fab и F(ab')₂ могут быть получены путем обработки антител ферментом, например пепсином.

Используемый в данном изобретении термин "эпитоп" означает часть антигена, с которой специфически связываются антитела. Эпитопы обычно состоят из химически активных (неполярных, полярных или гидрофобных), поверхностно расположенных функциональных групп, таких как боковые группы аминокислот или полисахаридов, и могут иметь специфическую трехмерную структуру, а также специфический заряд. Строение эпитопа может быть линейным или прерывистым, например конформационный эпитоп, который формируется в результате пространственного взаимодействия аминокислот, не находящихся в непрерывной аминокислотной последовательности антигена, в отличие от взаимодействия линейно связанных аминокислот. Конформационный эпитоп включает эпитопы, возникающие в результате пространственного свертывания белков антигенов, при котором аминокислоты из различных участков линейной последовательности антигена оказываются в тесной близости в трехмерном пространстве.

Используемый в данном изобретении термин "паратоп" означает часть антитела, с которой специфически связывается антиген. Паратоп может быть линейным или дискретным, образованным за счет пространственных взаимоотношений между аминокислотами, не находящимися в непрерывной последовательности, в отличие от взаимодействия линейно связанных аминокислот. Термины "паратоп легкой цепи" и "паратоп тяжелой цепи" или "аминокислотные остатки паратопа легкой цепи" и "аминокислотные остатки паратопа тяжелой цепи" означает аминокислотные остатки легкой и тяжелой цепей, контактирующие с антигеном.

Используемый в данном изобретении термин "специфическое связывание" относится к антителам, проявляющим большую аффинность при связывании с определенными антигенами, по сравнению с другими антигенами или белками. Как правило, связывание антитела характеризуется константой диссоциации (K_D) 10^{-7} М или менее. Связывание с предопределенным антигеном происходит при K_D , в два раза меньшей, чем K_D связывания со неспецифичным антигеном (например, BSA, казеин или любой другой полипептид), отличным от предопределенного антигена. Фразы "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфичное к антигену" используются как взаимозаменяемые вместе с выражениями "антитело, которое специфически связывается с антигеном" или "специфичное к антигену антитело", например, антитело, специфичное к TLR3. Константа диссоциации может быть измерена с помощью стандартных способов, описанных далее.

Используемый в настоящем изобретении термин "биологическая активность TLR3" или "активация TLR3" относится к любой активности, являющейся результатом связывания лиганда с TLR3. Лиган-

ды TLR3 включают двухцепочечную РНК, поли(I:C) и эндогенную мРНК, например, мРНК, высвобожденную из некротических клеток. В отдельных случаях, активация TLR3 приводит к активации NF-κB в ответ на связывание лиганда TLR3.

Экспериментальная оценка активации NF-κB может быть осуществлена с использованием гена-репортера после индукции рецептора лигандом поли(I:C) (Alexoroulou et al., Nature 413:732-738, 2001; Hacker et al., EMBO J. 18:6973-6982, 1999). В других случаях активация TLR3 приводит к активации факторов (IRF-3, IRF-7), участвующих в интерфероновом ответе, в ответ на лиганд TLR3. Экспериментальная оценка опосредованной рецептором TLR3 активации IRF может быть сделана с помощью гена-репортера, контролируемого интерферон-стимулированными элементами (interferon-stimulated response element - ISRE). В отдельных случаях активация TLR3 приводит к секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов, например, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-12, CXCL5/IP-10 и RANTES. Высвобождение цитокинов и хемокинов из клеток, тканей или в циркуляционных потоках может быть измерено с помощью хорошо известных иммунологических тест-систем, таких как ИФА.

В данном изобретении использованы общепринятые одно- и трехбуквенные коды обозначения аминокислот

Аминокислота	Трехбуквенный код	Однобуквенный код
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота	Asp	D
Цистеин	Cys	C
Глутаминовая кислота	Glu	E
Глутамин	Gln	Q
Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Фенилаланин	Phe	F
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y
Валин	Val	V

Композиции данного изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам-антагонистам, способным ингибировать биологическую активность TLR3, и к использованию этих антител. Антагонисты TLR3 могут связываться с TLR3 и ингибировать активацию TLR3. Примеры механизмов, по которым указанные антитела могут ингибировать активацию TLR3, включают ингибирование *in vitro*, *in vivo* или *in situ* путем связывания лигандов с TLR3, ингибирования димеризации рецептора, ингибирования TLR3 в эндосоме, ингибирования киназной активности дальнейшего сигнального пути или ингибирования транскрипции матричных РНК TLR3. Другие антитела-антагонисты, способные ингибировать активацию TLR3 за счет других механизмов, также являются частью настоящего изобретения. Данные антагонисты находят применение в качестве исследовательских и диагностических реагентов, а также терапевтических агентов.

В природе разнообразие антител создается благодаря множеству генов зародышевой линии, кодирующих переменные области, и множеству соматических событий. Соматические события включают рекомбинацию переменного генного сегмента, сегмента разнообразия (D) и сегмента присоединения (J), а при образовании участка VL - рекомбинацию V и J сегментов. Сам процесс рекомбинации может быть неточным, приводя к уменьшению или увеличению числа аминокислот в месте соединения V(D)J. Эти механизмы разнообразия действуют в развивающихся В-клетках до антигенной стимуляции. После антигенной стимуляции экспрессирующиеся гены антител в В-клетках претерпевают соматическую мутацию. На основании оценки числа сегментов генов зародышевой линии произвольная рекомбинация этих сегментов и произвольное спаривание VH-VL может дать начало до $1,6 \times 10^7$ разных антител (Fundamental Immunology, 3rd ed. (1993), ed. Paul, Raven Press, New York, N.Y.). Если учитывать другие процессы, спо-

собствующие разнообразию антител (например, соматические мутации), полагают, что возможна генерация до 10^{10} разных антител (Immunoglobulin Genes, 2nd ed. (1995), eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, Calif.). Поскольку в обеспечении разнообразия антител участвует много процессов, очень маловероятно, что полученные независимо моноклональные антитела с такой же антигенной специфичностью будут иметь идентичные аминокислотные последовательности.

Изобретение представляет новые участки связывания антигенов и цепи иммуноглобулина, полученные с использованием библиотек человеческих генов иммуноглобулинов. Структура, несущая антигенсвязывающий участок, обычно является тяжелой или легкой цепью антитела, или частью указанных структур, где антигенсвязывающий участок располагается на своем естественном месте, согласно приведенному выше описанию.

В настоящем изобретении предлагаются изолированные антитела или их фрагменты, способные реагировать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, в том числе антитела, содержащие аминокислотные последовательности 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) определяющего комплементарность участка тяжелой цепи (CDR) и аминокислотные последовательности 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) определяющего комплементарность участка легкой цепи (CDR), показанные в табл. 1а.

Таблица 1а

№ mAb:	SEQ ID NO:					
	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
16	52	88	54	49	50	51
17	58	64	60	55	56	57
18	70	77	72	67	68	69
19	82	83	84	79	80	89
1	46	47	48	43	44	45
2	52	53	54	49	50	51
3	58	59	60	55	56	57
4	61	62	60	55	56	57
5	61	64	60	55	56	63
6	61	64	60	55	56	65
7	61	64	60	55	56	66
8	70	71	72	67	68	69
9	70	73	72	67	68	69
10	70	75	72	67	68	74
11	70	77	72	67	68	76
12	70	77	72	67	68	78
13	82	83	84	79	80	81
14	82	86	84	79	80	85
15*	82	86	84	79	80	87
15**	111	112	84	109	110	113
15-1	111	114	84	109	110	113
15-2	115	112	84	109	110	113
15-3	116	112	84	109	110	113
15-4	111	117	84	109	110	113
15-5	116	118	84	109	110	113
15-6	116	112	119	109	110	113
15-7	111	112	84	120	110	113
15-8	111	112	84	121	110	113
15-9	116	118	119	109	110	113
15-10	116	112	119	79	80	226
F17	61	192	60	55	56	191
F18	70	194	72	67	68	193
F19	82	196	84	79	80	195

15* CDR по базе IMGT

15** CDR как общий типичный элемент

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются изолированные антитела или их фрагменты, способные реагировать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, включая антитела, содержащие аминокислотную последовательность HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 192, где HCDR2 последовательности SEQ ID NO: 192 HCDR2 определяется формулой (I)

$Xaa_6-I-Xaa_7-Xaa_8-R-S-Xaa_9-W-Y-N-D-Y-A-V-S-V-K-S,$ (I)

где

Xaa_6 может быть Arg или Lys;

Xaa_7 может быть Tyr, His или Ser;

Xaa_8 может быть Met, Arg или Tyr; и

Xaa_9 может быть Lys или Arg.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются изолированные антитела или их фрагменты, способные реагировать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, включая антитела, содержащие аминокислотную последовательность HCDR2, показанную в SEQ ID NO: 194, где HCDR2 последовательности SEQ ID NO: 194 определяется формулой (III)

$I-I-Q-Xaa_{15}-R-S-K-W-Y-N-Xaa_{16}-Y-A-Xaa_{17}-S-V-K-S,$ (III)

где

Xaa_{15} может быть Lys, Thr или Ile;

Xaa_{16} может быть Asn или Asp; и

Xaa_{17} может быть Val или Leu;

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются изолированные антитела или их фрагменты, способные реагировать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, включая антитела, содержащие аминокислотную последовательность HCDR2, показанную в SEQ ID NO: 196, где HCDR2 из SEQ ID NO: 196 определяется, как показано в формуле (V)

$Xaa_{24}-I-D-F-S-D-S-Y-T-N-Y-Xaa_{25}-P-S-F-Q-G,$ (V)

где

Xaa_{24} может быть Phe или Arg; и

Xaa_{25} может быть Ala или Ser.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются изолированные антитела или их фрагменты, способные реагировать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, включая антитела, содержащие аминокислотную последовательность LCDR3, показанную в SEQ ID NO: 191, где LCDR3 из SEQ ID NO: 191 определяется, как показано в формуле (II)

$Xaa_1-S-Y-D-Xaa_2-Xaa_3-Xaa_4-Xaa_5-T-V,$ (II)

где

Xaa_1 может быть Ala, Gln, Gly или Ser;

Xaa_2 может быть Gly, Glu или Ser;

Xaa_3 может быть Asp или Asn;

Xaa_4 может быть Glu или Ser и

Xaa_5 может быть Phe, Ala или Leu.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются изолированные антитела или их фрагменты, способные реагировать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, включая антитела, содержащие аминокислотную последовательность LCDR3, показанную в SEQ ID NO: 193, где LCDR3 из SEQ ID NO: 193 определяется, как показано в формуле (IV)

$Xaa_{10}-S-Y-D-Xaa_{11}-P-Xaa_{12}-Xaa_{13}-Xaa_{14}-V,$ (IV)

где

Xaa_{10} может быть Gln или Ser;

Xaa_{11} может быть Thr, Glu или Asp;

Xaa_{12} может быть Val или Asn;

Xaa_{13} может быть Tyr или Phe; и

Xaa_{14} может быть Ser, Asn или Gln; или

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются изолированные антитела или их фрагменты, способные реагировать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, включая антитела, содержащие аминокислотную последовательность LCDR3, показанную в SEQ ID NO: 195, где LCDR3 из SEQ ID NO: 195 определяется, как показано в формуле (VI)

$Q-Q-Xaa_{18}-Xaa_{19}-Xaa_{20}-Xaa_{21}-Xaa_{22}-Xaa_{23}-T,$ (VI)

где

Xaa_{18} может быть Tyr, Gly или Ala;

Xaa_{19} может быть Gly, Glu или Asn;

Xaa_{20} может быть Ser или Thr;

Xaa_{21} может быть Val, Ile или Leu;

Xaa_{22} может быть Ser или Leu; и

Xaa_{23} может быть Ile, Ser, Pro или Tyr.

В настоящем изобретении также предлагаются изолированные антитела и их фрагменты, способные реагировать с TLR3, содержащие аминокислотные последовательности 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) определяющего комплементарность участка тяжелой цепи (CDR) и аминокислотные последова-

тельности 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) определяющего комплементарность участка легкой цепи (CDR), показанные в табл. 1а.

Антитела, чьи аминокислотные последовательности антигенсвязывающих участков не отличаются существенно от последовательностей, представленных в табл. 1а (SEQ ID NO: 49-121 или 191-196), рассматриваются как часть настоящего изобретения. Как правило, это относится к замене аминокислот на другие аминокислоты, имеющие сходный заряд, гидрофобные или стереохимические характеристики. Также возможны дополнительные замены в каркасных участках, в отличие от антигенсвязывающих участков, в случае, если они не изменяют свойств антитела. Возможны замещения, улучшающие свойства антитела, такие как стабильность или аффинность. Одно, два, три, четыре, пять или шесть замещений могут быть сделаны в антигенсвязывающем участке. Возможно замещение 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 30% аминокислотных остатков каркасного фрагмента при условии сохранения желаемых свойств антитела.

Консервативные модификации приведут к созданию молекул, имеющих функциональные и химические характеристики, близкие к исходной молекуле. Существенные модификации функциональных и/или химических характеристик молекул могут быть достигнуты путем тех замещений в аминокислотной последовательности, которые приводят к изменениям (1) в структуре каркаса молекулы в районе замещения, например, к плоской или спиральной конформации, (2) в заряде или гидрофобности молекулы в районе замещения или (3) в размере молекулы. Например, "консервативные аминокислотные замещения" могут означать замещения природных аминокислотных остатков на неприродные, которые не сопровождаются изменением полярности или с незначительными изменениями полярности в районе замещения. Более того, любой природный аминокислотный остаток в полипептиде может быть замещен аланином согласно способу, описанному как аланин-сканирующий мутагенез (MacLennan et al., Acta Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67, 1998; Sasaki et al., Adv. Biophys. 35:1-24, 1998). Любое желательное аминокислотное замещение (консервативное или нет) может быть запланировано специалистом в случае необходимости. Например, аминокислотное замещение может быть использовано для того, чтобы идентифицировать важные аминокислотные остатки в последовательности или с целью увеличения/уменьшения аффинности молекул, предложенных в настоящем изобретении. Некоторые аминокислотные замещения показаны в табл. 1b.

В некоторых вариантах осуществления консервативные аминокислотные замещения могут быть осуществлены путем введения в молекулу неприродных аминокислотных остатков, которое обычно происходит при химическом синтезе белков. Аминокислотные замещения могут быть осуществлены, например, с помощью ПЦР мутагенеза (патент США № 4683195). Могут быть созданы библиотеки новых вариантов с помощью хорошо известных способов, например применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, таких как кодоны DVK, кодирующие 11 аминокислот (ACDEGKNRSYW), а также поиска вариантов с необходимыми свойствами в уже существующих библиотеках, как показано в примере 1. В табл. 1с показаны замещения, сделанные с целью улучшения характеристик антител в трех родственных антителах-антагонистах TLR3 в пределах участков LCDR3 и HCDR2.

В зависимости от определения антигенсвязывающих участков аминокислотные остатки антигенсвязывающих участков антител, предложенных в настоящем изобретении, и, следовательно, аминокислотные остатки каркасных участков могут слегка отличаться для каждой тяжелой и легкой цепи.

Таблица 1b

Исходный остаток	Примеры замещений	Больше консервативных замещений
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, НОРЛЕЙЦИН	Leu
Leu (L)	НОРЛЕЙЦИН, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, 1, 4 Диаминомасляная кислота, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, норлейцин	Leu

В табл. 2а и 2б показаны остатки антигенсвязывающих участков некоторых антител, предложенных в настоящем изобретении, согласно Кабату, Чотии и IMGT, а также их композитные последовательности.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются изолированные антитела или фрагменты антител, способные взаимодействовать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, где антитела содержат аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей, а также предлагаются переменные участки для каждой отдельной тяжелой и легкой цепи, как показано в табл. 3а. F17, F18 и F19 относятся к вариантам антител, содержащих аминокислотную последовательность-консенсус для семейств 17, 18 и 19 соответственно (см. пример 1).

Таблица 1с

Семейство 17	LCDR3											SEQ ID NO:
пAb												
17	A	S	Y	D	G	D	E	F	T	V		
3												
4												
5	Q				E		S	A				
6	G				S	N	S	L				
7	S				S		S	L				
Общий типичный элемент	A, Q, G, S	S	Y	D	G, E, S	D, N	E, S	F, A, L	T	V	191	

Семейство 17	HCDR2																	SEQ ID NO:	
пAb																			
17	R	I	Y	M	R	S	K	W	Y	N	D	Y	A	V	S	V	K	S	
3			H	R															
4	K		S	Y			R												
5																			
6																			
7																			
Общий типичный элемент	R, K	I	Y, H, S	M, R, Y	R	S	K, R	W	Y	N	D	Y	A	V	S	V	K	S	192

Семейство 18А	LCDR3											SEQ ID NO:
пAb												
18	Q	S	Y	D	S	Q	F	S	F	G	V	
8												
9												
Семейство 18В												
пAb												
10	Q	S	Y	D	T	P	V	Y	S	V		
11	S				E		N	F	N			
12	S				D		N	F	Q			
Общий типичный элемент	Q, S	S	Y	D	T, E, D	P	V, N	Y, F	S, N, Q	V	193	

* Общий типичный элемент на основе пAbs 10, 11, 12

Семейство 18А, 18В	HCDR2																	SEQ ID NO:	
пAb																			
18	I	I	Q	K	R	S	K	W	Y	N	N	Y	A	V	S	V	K	S	
8				T							D								
9				I							D		L						
10																			
11																			
12																			
Общий типичный элемент	I	I	Q	K, T, I	R	S	K	W	Y	N	N, D	Y	A	V, L	S	V	K	S	194

Семейство 19	LCDR2										SEQ ID NO:
mAb											
19	Q	Q	Y	G	S	V	S	I	T		
13			G	E	S	I	L	S			
14			A	E	T			P			
15			G	N	T	L		Y			
15-1			G	N	T	L		Y			
15-2			G	N	T	L		Y			
15-3			G	N	T	L		Y			
15-4			G	N	T	L		Y			
15-5			G	N	T	L		Y			
15-6			G	N	T	L		Y			
15-7			G	N	T	L		Y			
15-8			G	N	T	L		Y			
15-9			G	N	T	L		Y			
15-10			G	N	T	L		Y			
общий типичный элемент	Q	Q	Y,G,A	G,E,N	S,T	V,I,L	S,L	l,S,P,Y	T		195

Семейство 19	HCDR2																SEQ ID NO:		
mAb																			
19	F	I	D	P	S	D	S	Y	T	N	Y	A	P	S	F	Q	G		
13																			
14																			
15																			
15,1	R																		
15,2																			
15,3																			
15,4												S							
15,5	R											S							
15,6																			
15,7																			
15-8																			
15-9	R											S							
15-10																			
общий типичный элемент	F,R	I	D	P	S	D	S	Y	T	N	Y	A,S	P	S	F	Q	G		196

Хотя варианты осуществления, проиллюстрированные в примерах, содержат переменные участки, один для тяжелой и один для легкой цепи, специалисты поймут, что альтернативные варианты осуществления могут содержать различные переменные участки тяжелой или легкой цепи. Одиночный переменный участок может использоваться для поиска второго переменного участка, способного к формированию двухдоменного специфического антиген-связывающего фрагмента, способного, например, связываться с TLR3. Такой поиск может осуществляться с помощью методов фагового отображения, например, с использованием иерархического двойного комбинаторного подхода, описанного в публикации PCT No. WO 92/01047. Согласно указанному методу индивидуальная колония, содержащая клон H или L цепей, используется для инфицирования всей библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (L или H), а появляющийся в результате двухцепочечный специфический антигенсвязывающий домен селективно отбирается в соответствии с методами фагового отображения.

Таблица 2а

mAb	определение CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	Последовательность	SEQ ID	Последовательность	SEQ ID	Последовательность
14	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPDSYNTNY	84	ARELYQGYMDTFDS
14	Кабат		NYWVG		FIDPDSYNTNYAPSFQ		ELYQGYMDTFDS
14	Чотиа		GYSFT		PSDSYT		LYQGYMDTFD
14	общий типичный элемент	111	GYSFTNYWVG	112	FIDPDSYNTNYAPSFQ	84	ARELYQGYMDTFDS
15	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPDSYNTNY	84	ARELYQGYMDTFDS
15	Кабат		NYWVG		FIDPDSYNTNYAPSFQ		ELYQGYMDTFDS
15	Чотиа		GYSFT		PSDSYT		LYQGYMDTFD
15	общий типичный элемент	111	GYSFTNYWVG	112	FIDPDSYNTNYAPSFQ	84	ARELYQGYMDTFDS
15-1	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPDSYNTNY	84	ARELYQGYMDTFDS
15-1	Кабат		NYWVG		RIDPDSYNTNYAPSFQ		ELYQGYMDTFDS
15-1	Чотиа		GYSFT		PSDSYT		LYQGYMDTFD
15-1	общий типичный элемент	111	GYSFTNYWVG	114	RIDPDSYNTNYAPSFQ	84	ARELYQGYMDTFDS
15-2	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPDSYNTNY	84	ARELYQGYMDTFDS
15-2	Кабат		NYWVG		FIDPDSYNTNYAPSFQ		ELYQGYMDTFDS
15-2	Чотиа		GYSFT		PSDSYT		LYQGYMDTFD
15-2	общий типичный элемент	115	GYSFTNYWVG	112	FIDPDSYNTNYAPSFQ	84	ARELYQGYMDTFDS
15-3	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPDSYNTNY	84	ARELYQGYMDTFDS
15-3	Кабат		NYWIS	86	FIDPDSYNTNYAPSFQ	84	ELYQGYMDTFDS
15-3	Чотиа		GYSFT		PSDSYT		LYQGYMDTFD
15-3	общий типичный элемент	116	GYSFTNYWIS	112	FIDPDSYNTNYAPSFQ	84	ARELYQGYMDTFDS
15-4	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPDSYNTNY	84	ARELYQGYMDTFDS
15-4	Кабат		NYWVG		FIDPDSYNTNYSPSFQ		ELYQGYMDTFDS
15-4	Чотиа		GYSFT		PSDSYT		LYQGYMDTFD
15-4	общий типичный элемент	111	GYSFTNYWVG	117	FIDPDSYNTNYSPSFQ	84	ARELYQGYMDTFDS
15-5	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPDSYNTNY	84	ARELYQGYMDTFDS
15-5	Кабат		NYWIS		RIDPDSYNTNYSPSFQ		ELYQGYMDTFDS
15-5	Чотиа		GYSFT		PSDSYT		LYQGYMDTFD
15-5	общий типичный элемент	116	GYSFTNYWIS	118	RIDPDSYNTNYSPSFQ	84	ARELYQGYMDTFDS
15-6	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPDSYNTNY		ARQLYQGYMDTFDS
15-6	Кабат		NYWIS		FIDPDSYNTNYAPSFQ		QLYQGYMDTFDS
15-6	Чотиа		GYSFT		PSDSYT		LYQGYMDTFD
15-6	общий типичный элемент	116	GYSFTNYWIS	112	FIDPDSYNTNYAPSFQ	119	ARQLYQGYMDTFDS
15-7	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPDSYNTNY	84	ARELYQGYMDTFDS
15-7	Кабат		NYWVG		FIDPDSYNTNYAPSFQ		ELYQGYMDTFDS
15-7	Чотиа		GYSFT		PSDSYT		LYQGYMDTFD
15-7	общий типичный элемент	111	GYSFTNYWVG	112	FIDPDSYNTNYAPSFQ	84	ARELYQGYMDTFDS
15-8	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPDSYNTNY	84	ARELYQGYMDTFDS
15-8	Кабат		NYWVG		FIDPDSYNTNYAPSFQ		ELYQGYMDTFDS
15-8	Чотиа		GYSFT		PSDSYT		LYQGYMDTFD
15-8	общий типичный элемент	111	GYSFTNYWVG	112	FIDPDSYNTNYAPSFQ	84	ARELYQGYMDTFDS
15-9	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPDSYNTNY	119	ARQLYQGYMDTFDS
15-9	Кабат		NYWIS		RIDPDSYNTNYSPSFQ		QLYQGYMDTFDS
15-9	Чотиа		GYSFT		PSDSYT		LYQGYMDTFD
15-9	общий типичный элемент	116	GYSFTNYWIS	118	RIDPDSYNTNYSPSFQ	119	ARQLYQGYMDTFDS

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются изолированные антитела или фрагменты антител, способные взаимодействовать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, имеющие по меньшей мере 95%-ное сходство с аминокислотной последовательностью определенного переменного участка, как показано в табл. 3а.

Следующий аспект настоящего изобретения заключается в изолированных антителах, имеющих определенную аминокислотную последовательность тяжелой и легкой цепей, как показано в табл. 3б.

Следующий аспект данного изобретения заключается в изолированных полинуклеотидах, кодирующих любое из антител, представленных в настоящем изобретении и его дополнениях. Некоторые полинуклеотиды описываются в настоящем изобретении, однако, другие полинуклеотиды, которые, принимая во внимание вырожденность генетического кода или предпочтительность использования кодонов в данной экспрессионной системе, кодируют предложенные в настоящем изобретении антитела-антагонисты, также рассматрива-

ются как часть настоящего изобретения.

Таблица 2b

п/аб	определение CDR	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность
14	IMGT	79	QSIGLY	80	AAS	85	QQAETVSP
14	Кабат		RASQSIGLYLA		AASSLQS		QQAETVSP
14	Чотиа		SQSIGLY		AAS		AETVSP
14	общий типичный элемент	109	RASQSIGLYLA	110	AASSLQS	85	QQAETVSP
15	IMGT	79	QSIGLY	80	AAS	87	QQGNTLSYT
15	Кабат		RASQSIGLYLA		AASSLQS		QQGNTLSYT
15	Чотиа		SQSIGLY		AAS		GNTLSY
15	общий типичный элемент	109	RASQSIGLYLA	110	AASSLQS	113	QQGNTLSYT
15-1	IMGT	79	QSIGLY	80	AAS	87	QQGNTLSYT
15-1	Кабат		RASQSIGLYLA		AASSLQS		QQGNTLSYT
15-1	Чотиа		SQSIGLY		AAS		GNTLSY
15-1	общий типичный элемент	109	RASQSIGLYLA	110	AASSLQS	113	QQGNTLSYT
15-2	IMGT	79	QSIGLY	80	AAS	87	QQGNTLSYT
15-2	Кабат		RASQSIGLYLA		AASSLQS		QQGNTLSYT
15-2	Чотиа		SQSIGLY		AAS		GNTLSY
15-2	общий типичный элемент	109	RASQSIGLYLA	110	AASSLQS	113	QQGNTLSYT
15-3	IMGT	79	QSIGLY	80	AAS	87	QQGNTLSYT
15-3	Кабат		RASQSIGLYLA		AASSLQS		QQGNTLSYT
15-3	Чотиа		SQSIGLY		AAS		GNTLSY
15-3	общий типичный элемент	109	RASQSIGLYLA	110	AASSLQS	113	QQGNTLSYT
15-4	IMGT	79	QSIGLY	80	AAS	87	QQGNTLSYT
15-4	Кабат		RASQSIGLYLA		AASSLQS		QQGNTLSYT
15-4	Чотиа		SQSIGLY		AAS		GNTLSY
15-4	общий типичный элемент	109	RASQSIGLYLA	110	AASSLQS	113	QQGNTLSYT
15-5	IMGT	79	QSIGLY	80	AAS	87	QQGNTLSYT
15-5	Кабат		RASQSIGLYLA		AASSLQS		QQGNTLSYT
15-5	Чотиа		SQSIGLY		AAS		GNTLSY
15-5	общий типичный элемент	109	RASQSIGLYLA	110	AASSLQS	113	QQGNTLSYT
15-6	IMGT	79	QSIGLY	80	AAS	87	QQGNTLSYT
15-6	Кабат		RASQSIGLYLA		AASSLQS		QQGNTLSYT
15-6	Чотиа		SQSIGLY		AAS		GNTLSY
15-6	общий типичный элемент	109	RASQSIGLYLA	110	AASSLQS	113	QQGNTLSYT
15-7	IMGT		QSISSY	80	AAS	87	QQGNTLSYT
15-7	Кабат		RASQSISSYLA		AASSLQS		QQGNTLSYT
15-7	Чотиа		SQSISSY		AAS		GNTLSY
15-7	общий типичный элемент	120	RASQSISSYLA	110	AASSLQS	113	QQGNTLSYT
15-8	IMGT	79	QSIGLY	80	AAS	87	QQGNTLSYT
15-8	Кабат		RASQSIGLYLN		AASSLQS		QQGNTLSYT
15-8	Чотиа		SQSIGLY		AAS		GNTLSY
15-8	общий типичный элемент	121	RASQSIGLYLN	110	AASSLQS	113	QQGNTLSYT
15-9	IMGT	79	QSIGLY	80	AAS	87	QQGNTLSYT
15-9	Кабат		RASQSIGLYLA		AASSLQS		QQGNTLSYT
15-9	Чотиа		SQSIGLY		AAS		GNTLSY
15-9	общий типичный элемент	109	RASQSIGLYLA	110	AASSLQS	113	QQGNTLSYT

Таблица 3а

№ mAb:	SEQ ID NO:		№ mAb:	SEQ ID NO:	
	HV	LV		HV	LV
16	6	5	15-1	124	41
17	8	7	15-2	125	41
18	10	9	15-3	126	41
19	12	11	15-4	127	41
1	14	13	15-5	128	41
2	16	15	15-6	129	41
3	18	17	15-7	42	122
4	20	19	15-8	42	123
5	22	21	15-9	159	41
6	24	23	15-10	129	225
7	26	25	F17	198	197
8	28	27	F18	200	199
9	30	29	F19	202	201
10	32	31	c1811	164	163
11	34	33	9QVQ/QSV	212	209
12	36	35	10QVQ/QSV	213	210
13	38	37	12QVQ/QSV	214	211
14	40	39	14EVQ	215	39
15	42	41	15EVQ	216	41

Некоторыми антителами-антагонистами могут быть антитела изотипов IgG, IgD, IgG, IgA или IgM. Кроме того, эти антитела-антагонисты могут модифицироваться на посттранскрипционном уровне за счет таких процессов, как гликозилирование, изомеризация, дегликозилирование или ненатуральная ковалентная модификация, такая как добавление активной группы полиэтиленгликоля (PEG) или липидизация. Такие модификации могут происходить *in vivo* или *in vitro*. Например, предлагаемые в настоящем изобретении антитела могут быть конъюгированы с полиэтиленгликолем с целью усовершенствования их фармакокинетических характеристик. Конъюгация может быть выполнена с помощью известных специалистам способов. Показано, что конъюгация терапевтических антител с ПЭГ усиливает фармакодинамику, не влияя на функцию (Deckert et al., *Int. J. Cancer* 87:382-390, 2000; Knight et al., *Platelets* 15:409-418, 2004; Leong et al., *Cytokine* 16:106-119, 2001; Yang et al., *Protein Eng.* 16:761-770, 2003).

Таблица 3б

№ mAb:	Тяжелая цепь	Легкая цепь
	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
14	102	155
15	102	156
15-1	130	156
15-2	131	156
15-3	132	156
15-4	133	156
15-5	134	156
15-6	135	156
15-7	102	157
15-8	102	158
15-9	160	156
15-10	135	227
F17	204	203
F18	206	205
F19	208	207
14EVQ	220	155
15EVQ	220	156
5429	166	165
c1811	168	167

Фармакокинетические свойства антител, описанных в настоящем изобретении, также могут быть усилены за счет модификаций Fc с применением способов, хорошо известных специалистам. Например, тяжелая цепь иммуноглобулина изотипа IgG4 в шарнирном участке содержит мотив Cys-Pro-Ser-Cys (CPSC), способный формировать дисульфидные мостики между тяжелыми цепями или внутри тяжелой цепи, например, два Cys-остатка в мотиве CPSC могут образовывать дисульфидный мостик с двумя дру-

гими остатками в другой тяжелой цепи (между), или два остатка Cys внутри данного CPSC мотива могут образовывать дисульфидный мостик друг с другом (внутри). Считается, что *in vivo* ферменты, осуществляющие изомеризацию, способны конвертировать дисульфидные мостики между тяжелыми цепями во внутрицепочечные мостики и *vice versa* (Aalberse and Schuurman, *Immunology* 105:9-19, 2002). Соответственно, поскольку пара тяжелая:легкая цепи (H:L) в молекулах иммуноглобулина IgG4 с внутрицепочечными мостиками в шарнирном участке тяжелой цепи не связаны друг с другом ковалентной связью, она может диссоциировать на H:L мономеры, а вслед за этим реассоциировать, формируя биспецифичную, гетеродимерную молекулу иммуноглобулина IgG4. В биспецифичном антителе IgG два фрагмента Fab молекулы различаются по эпитопам, с которыми они связываются. Замещение аминокислотного остатка Ser в мотиве CPSC шарнирного участка IgG4 на остаток Pro приводит к "IgG1-подобному поведению", например, молекулы формируют стабильные дисульфидные мостики между тяжелыми цепями и, следовательно, не могут участвовать в обмене H:L с другой молекулой иммуноглобулина IgG4. В одном из вариантов осуществления описанные в данном изобретении антитела составляют Fc домен иммуноглобулина IgG4 с мутацией S в P в мотиве CPSC. Мотив CPSC, как правило, расположен у остатка 228 зрелой тяжелой цепи, но расположение этого мотива может изменяться в зависимости от длины CDR.

Кроме того, в антителах, описанных в настоящем изобретении, участки, влияющие на связывание с рецепторами Fc, отличными от рецептора FcRn, могут быть удалены. Например, в антителах, описанных в настоящем изобретении, участки, связывающие рецептор Fc, вовлеченный в активность ADCC, могут быть удалены. Например, мутация Leu234/Leu235 в шарнирном участке IgG1 в L234A/L235A или мутация Phe235/Leu236 в шарнирном участке IgG4 в P235A/L236A минимизирует связывание FcR и уменьшает способность иммуноглобулина опосредовать комплементарно зависимую цитотоксичность и ADCC. В одном варианте осуществления настоящего изобретения описанные антитела содержат Fc домен иммуноглобулина IgG4 с мутацией P235A/L236A. Расположение этих аминокислотных остатков в зрелых тяжелых цепях указано выше, но может изменяться в зависимости от длины CDR. Некоторые антитела с мутациями P235A/L236A являются антителами, чьи тяжелые цепи кодируются последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 218, 219 или 220.

Полностью человеческие, адаптированные к человеку, гуманизированные и аффинно-зрелые молекулы антител или фрагменты антител являются частью настоящего изобретения, также как гибридные и химерные белки. Аффинность антитела к антигену может быть улучшена с помощью продуманной конструкции или случайного созревания аффинности с использованием хорошо известных способов случайного или направленного мутагенеза или комбинаторных фаговых библиотек. Например, возможно замещение остатков зоны верньера, располагающихся преимущественно в каркасной области, или "остатков, определяющих аффинность", ADR, для регуляции аффинности антитела (патент № 6639055; публикации PCT No. WO 10/045340).

Частью настоящего изобретения являются полностью человеческие, адаптированные к человеку, гуманизированные, аффинно-зрелые молекулы антител или фрагментов антител, модифицированные с целью улучшения стабильности, селективности, перекрестной реактивности, аффинности, иммуногенности или достижения других желательных биологических характеристик. Стабильность антитела определяется целым рядом факторов, включая (1) пространственную укладку индивидуальных доменов, влияющую на естественную стабильность, (2) поверхностное взаимодействие белков, определяющее спаривание HC и LC, (3) глубину расположения полярных и заряженных аминокислотных остатков, (4) сеть водородных мостиков между полярными и заряженными аминокислотными остатками; а также (5) поверхностный заряд и распределение полярных аминокислотных остатков наряду с другими внутри- и межмолекулярными взаимодействиями (Worn et al., *J. Mol. Biol.*, 305:989-1010, 2001). Аминокислотные остатки, способные дестабилизировать структуру, могут быть идентифицированы на основании кристаллической структуры антитела или путем молекулярного моделирования, а эффект определенных аминокислотных остатков на стабильность антитела может быть проверен путем создания мутаций и оценки их влияния. Один из способов увеличить стабильность антитела заключается в увеличении срединной точки термоперехода (T_m), измеряемой путем дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Как правило, T_m белка имеет положительную корреляцию с его стабильностью и отрицательную корреляцию с подверженностью нарушениям третичной структуры и денатурации в растворах, а также деградации, которая также зависит от склонности белка к нарушению третичной структуры (Remmele et al., *Biopharm.*, 13:36-46, 2000). Ряд исследований свидетельствует о корреляции между степенью физической стабильности, измеренной как термостабильность путем ДКС, и измерениями, проведенными с помощью других способов (Gupta et al., *AAPS Pharm. Sci.* 5E8, 2003; Zhang et al., *J Pharm. Sci.* 93:3076-3089, 2004; Maa et al., *Int. J. Pharm.*, 140:155-168, 1996; Bedu-Addo et al., *Pharm. Res.*, 21:1353-1361, 2004; Remmele et al., *Pharm. Res.*, 15:200-208, 1997). Результаты исследований состава позволяют предположить, что T_m Fab-фрагмента влияет на долговременную физическую стабильность соответствующего mAb. Различие аминокислот каркасного фрагмента или антигенсвязывающих участков может значительно влиять на термическую стабильность домена Fab (Yasui et al., *FEBS Lett.* 353:143-146, 1994).

Предложенные в настоящем изобретении антитела-антагонисты могут связывать TLR3 с K_d , меньшей либо равной 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} или 10^{-12} М. Аффинность данной молекулы к TLR3, например,

такой как антитело, может быть определена экспериментально с помощью любого подходящего способа. Такие способы могут включать использование аппаратуры Viacore или KinExA, набора реагентов для ИФА или способов конкурентно-связывающего анализа, хорошо известных специалистам.

Антитела-антагонисты, с необходимой аффинностью связывающиеся с данным гомологом TLR3, могут быть выбраны в библиотеках вариантов или фрагментов с помощью способов, основанных на созревании аффинности антитела. Антитела-антагонисты могут быть идентифицированы с помощью соответствующих способов на основе их способности ингибировать биологическую активность TLR3. Такие способы могут включать тестовую систему с геном-репортером или измерение с помощью уже известных способов производства цитокинов.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения заключается в векторе, содержащем по меньшей мере один предложенный в данном изобретении полинуклеотид. Такие векторы могут быть плазмидными, вирусными, бакуловирусными экспрессионными векторами, векторами на основе транспозонов или любыми другими векторами, пригодными для интродукции предложенных в настоящем изобретении полинуклеотидов в данный организм или в данное генетическое окружение.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения заключается в клетках-хозяевах, имеющих любой из предложенных в настоящем изобретении полинуклеотидов, кодирующих полипептид, включающий в свой состав вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 159, 198, 200, 202, 164, 212, 213, 214, 215 или 216, или вариабельный участок легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 122, 123, 197, 199, 201, 163, 209, 210, 211 или 225.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения заключается в клетках-хозяевах, имеющих любой из предложенных в настоящем изобретении полинуклеотидов, кодирующих полипептид, включающий в свой состав тяжелую цепь иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 102, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 160, 204, 206, 208, 220, 166 или 168, или легкую цепь иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158, 203, 205, 207, 165 167 или 227. Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические, бактериальные, растительные клетки или клетки архей. Как правило, используются эукариотические клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают бессмертные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например, SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), Манассас, VA, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580) - мышинные клеточные линии. Обычно используется линия клеток миеломы человека U266 (ATCC CRL-TIB-196). Другие полезные клеточные линии включают линии, полученные из яичников китайского хомячка (CHO), например, линии CHO-K1SV (Lonza Biologies, Walkersville, MD), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения заключается в способе получения антител, способных реагировать с TLR3, включающем культивирование предложенных в настоящем изобретении клеток-хозяев, и отборе антител, производимых клетками-хозяевами. Способы создания и очистки антител хорошо известны специалистам в данной области.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения заключается в клеточной линии гибридомы, производящей предложенные в настоящем изобретении антитела.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к изолированному антителу или его фрагменту, при этом антитело связывается с аминокислотными остатками K416, K418, L440, N441, E442, Y465, N466, K467, Y468, R488, R489, A491, K493, N515, N516, N517, H539, N541, S571, L595 и K619, идент. № последовательности: 2с, толл-подобного рецептора 3 (TLR3).

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к изолированному антителу или его фрагменту, при этом антитело связывается с аминокислотными остатками S115, D116, K117, A120, K139, N140, N141, V144, K145, T166, Q167, V168, S188, E189, D192, A195 и A219, SEQ ID NO: 2, толл-подобного рецептора 3 (TLR3).

Несколько хорошо известных способов могут быть использованы для определения эпитопа антител, предложенных в настоящем изобретении. Например, в случае, когда известна структура каждого из компонентов, может быть использован анализ *in silico* белок-белковой стыковки с целью идентификации способных к взаимодействию участков. Может быть проведено избирательное замещение водорода дейтерием в антигене и антителе с целью определения участков антигена, способных связываться с антителом. Сегментный и точечный мутагенез, модифицирующие антиген, могут быть использованы для определения местоположения необходимых для связывания антитела аминокислот. Для таких больших белков, как TLR3, картирование путем точечного мутагенеза может быть облегчено предварительным определением участка связывания с помощью компьютерного анализа соединения белков, сегментного мутагенеза или избирательного замещения водорода дейтерием. В случае, когда известна структура каждого из компонентов, может быть использован анализ белок-белковой стыковки *in silico* с целью идентифика-

ции способных к взаимодействию участков. Со-кристаллическая структура комплекса антиген-антитело может использоваться для идентификации остатков, участвующих в образовании эпитопа и паратопа.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к изолированному антителу, имеющему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, или его фрагменту, при этом антитело связывается с TLR3, имеющим аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, через вариабельную область тяжелой цепи с остатками Чотиа W33, F50, D52, D54, Y56, N58, P61, E95, Y97, Y100 и D100b и вариабельную область легкой цепи с остатками Чотиа Q27, Y32, N92, T93, L94 и S95. Остатки Чотиа паратопа тяжелой цепи и паратопа легкой цепи соответствуют остаткам тяжелой цепи W33, F50, D52, D55, Y57, N59, P62, E99, Y101, Y104 и D106 SEQ ID NO: 216 и остаткам легкой цепи Q27, Y32, N92, T93, L94 и S95 SEQ ID NO: 41.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к изолированному антителу, имеющему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, или его фрагменту, при этом антитело связывается с TLR3, имеющим аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, через вариабельную область тяжелой цепи с остатками Чотиа N31a, Q52, R52b, S53, K54, Y56, Y97, P98, F99 и Y100 и вариабельную область легкой цепи с остатками Чотиа G29, S30, Y31, Y32, E50, D51, Y91, D92 и D93. Остатки Чотиа паратопа тяжелой и легкой цепей соответствуют остаткам тяжелой цепи N32, Q54, R56, S57, K58, Y60, Y104, P105, F106 и Y107 SEQ ID NO: 214 и остаткам легкой цепи G28, S29, Y30, Y31, E49, D50, Y90, D91 и D92, SEQ ID NO: 211.

Изолированные антитела, имеющие определенные остатки паратопа, связывающие TLR3, могут быть получены, например, встраиванием остатков паратопа в подходящий каркасный белок, сборкой искусственных каркасных белков в цельные антитела, экспрессией полученных антител и исследованием антител на способность к связыванию TLR3 или влияние на биологическую активность TLR3. В качестве примера каркасных белков можно привести аминокислотные последовательности вариабельных областей человеческих антител, кодируемые человеческими генами зародышевой линии. Выбор каркасного белка может основываться, например, на общей гомологии последовательности, % идентичности между остатками паратопа или идентичности канонической структуры каркасного белка и примерного антитела, например, mAb 15EVQ или mAb 12QVQ/QSV. Человеческие гены зародышевой линии описаны (см., например, работу Tomlinson et al., J. Mol. Biol 227:776-798, и в международных базах данных ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>)). Также можно использовать консенсусные последовательности человеческих каркасных областей, как описано в патенте № 6300064. Выбор подходящего каркасного белка может производиться, например, в соответствии с методами, описанными в публикации PCT No. WO 10/045340.

Примерами человеческих генов зародышевой линии, которые можно использовать для получения каркасных белков, в которые встраиваются остатки паратопа, являются гены, кодируемые V κ 1, V λ 3, Vh5, Vh6, J κ , J λ и Jh. J-области зародышевой линии используются полностью или частично для выбора последовательностей FR4. Например, остатки паратопа легкой цепи mAb 15EVQ могут быть встроены в каркасный участок V κ 1, кодируемый IGKV1-39*01, непосредственно соединенный с J-областью, кодируемой IGKJ1. Также могут использоваться последовательности, кодируемые другими генами V κ 1, и последовательности FR4 других генов J κ могут замещать IGKJ1. Остатки паратопа тяжелой цепи mAb 15EVQ могут встраиваться в каркасный участок Vh5, кодируемый IGHV5-51*01, и за ними может следовать приблизительно 11-13 остатков, например 12 остатков, составляющих HCDR3, и последовательность FR4, кодируемая IGHJ1. 11-13 Остатков могут располагаться между FR3-областью ("CAR") и началом FR4 области (WGQ в большинстве JH-областей) и включать 4 определенных остатка паратопа из mAb 15EVQ Vh. Также могут использоваться последовательности, кодируемые другими генами Vh5, и последовательности других генов Jh могут замещать IGHJ1. В другом примере остатки паратопа легкой цепи mAb 12QVQ/QSV могут быть встроены в каркасный участок V λ 3, кодируемый IGLV3-1*01, непосредственно соединенный с J-областью, кодируемой IGJL2. Также можно использовать последовательности, кодируемые иными генами v λ 3 и J λ . Длина LCDR3 поддерживается на уровне приблизительно 9-11 остатков, например 10 остатков. Эти приблизительно 9-11 остатков располагаются между концом области FR3 ("YYC" в большинстве V лямбда каркасных белков) и началом области FR4 ("FGG" в большинстве областей JL) и включают 3 определенных остатка паратопа из mAb 12QVQ/QSV. Остатки паратопа тяжелой цепи mAb 12QVQ/QSV могут встраиваться в каркасный участок Vh6, кодируемый IGHV6-1*01, и за ними может следовать приблизительно 9-11 остатков, например 10 остатков, составляющих HCDR3, и последовательность FR4, кодируемая IGHJ1. Приблизительно 9-11 остатков могут располагаться между FR3-областью ("CAR") и началом FR4 области (WGQ в большинстве JH-областей) и включать 4 определенных остатка паратопа из mAb 12QVQ/QSV Vh. Последовательности FR4 других генов Jh могут замещать IGHJ1. Связывание с TLR3 и биологическую активность полученного антитела можно оценить стандартными методами. Ориентация вариабельных областей легких и тяжелых цепей mAb 15EVQ и mAb 12QVQ/QSV с генами V κ 1, Vh5, V κ 3, Vh6, J κ , J λ или Jh показана на фиг. 32-35. Искусственные антитела с встроенным паратопом могут быть далее модифицированы путем замены остатков зоны верньера или остатков, определяющих аффинность, для улучшения свойств антитела, например,

аффинности, как описано выше. До тех пор пока антитело с встроенным паратопом сохраняет способность к связыванию TLR3, аминокислотная последовательность каркасного участка антитела с встроенным паратопом может быть на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательностям каркасной области mAb 15EVQ или 12QVQ/QSV.

Последовательности антиген-связывающих участков могут встраиваться в дополнение к остаткам паратопов с использованием стандартных методов. Например, возможна встройка полной последовательности HCDR3 или LCDR3.

Другой аспект настоящего изобретения относится к изолированным антителам или их фрагментам, способным реагировать с TLR3, которые конкурируют за связывание с TLR3 с моноклональными антителами, причем эти моноклональные антитела состоят из аминокислотных последовательностей участков 1, 2 и 3, определяющих комплементарность (complementarity determining regions, CDR) определенных тяжелых цепей, аминокислотных последовательностей CDR 1, 2 и 3 определенных легких цепей, а также из аминокислотных последовательностей переменных участков определенных тяжелых цепей (VH) или аминокислотных последовательностей переменных участков определенных легких цепей (VL) Как правило, моноклональные антитела, представленные в настоящем изобретении, являются изолированными антителами, содержащими переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 216, и аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 41, а также антитела, содержащие аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 214, и аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 211.

Анализ конкуренции за связывание с TLR3 может быть проведен *in vitro* с помощью уже известных способов. Например, оценка связывания MSD Sulfo-Tag™ NHS-эфир-меченого антитела с TLR3 в присутствии немеченого антитела может быть проведена с помощью ИФА. Как правило, в настоящем изобретении используются антитела mAb 12, mAb 15 и mAb c1811 (см. табл. 3а). Ранее известные антитела c1068 против TLR3 и их производные (описанные в публикации PCT No. WO 06/060513A2), TLR3.7 (eBiosciences, кат. № 14-9039) и Imgenex IMG-315A (Imgenex IMG-315A; против аминокислотной последовательности 55-70, VLNLTHNQLRRLPAAN, человеческого TLR3) не конкурируют за связывание с TLR3 с mAb 12, 15 или с mAb c1811, как показано в примере 5.

Следующий аспект настоящего изобретения заключается в изолированном антителе, способном реагировать с TLR3, которое обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

- a) связывается с человеческим TLR3 с Kd <10 нМ;
- b) уменьшает биологическую активность TLR3 в анализе *in vitro* с использованием гена-репортера NF-κB и поли(I:C) на ≥50%, при концентрации 1 мкг/мл;
- c) на ≥60% ингибирует продукцию IL-6 либо CXCL5/IP-10 в клетках BEAS-2B, стимулированных воздействием <100 нг/мл поли(I:C), при концентрации 10 мкг/мл;
- d) на ≥50% ингибирует продукцию IL-6 либо CXCL5/IP-10 в клетках BEAS-2B, стимулированных воздействием <100 нг/мл поли(I:C), при концентрации 0,4 мкг/мл;
- e) на ≥50% ингибирует продукцию IL-6 в клетках NHBE, стимулированных воздействием 62,5 нг/мл поли(I:C), при концентрации 5 мкг/мл;
- f) на ≥50% ингибирует продукцию IL-6 в клетках NHBE, стимулированных воздействием 62,5 нг/мл поли(I:C) при концентрации 1 мкг/мл;
- g) на ≥20% ингибирует поли(I:C)-индуцированную продукцию IFN-γ, IL-6 или IL-12 в клетках PBMC при концентрации 1 мкг/мл;
- h) ингибирует биологическую активность TLR3 яванского макака в анализе *in vitro*, с использованием гена-репортера NF-κB при IC50 <10 мкг/мл; или
- i) ингибирует биологическую активность TLR3 яванского макака в экспериментальной системе *in vitro*, с использованием гена-репортера ISRE при IC50 <5 мкг/мл.

Способы лечения

Предложенные в настоящем изобретении антагонисты TLR3, например антитела-антагонисты TLR3, могут использоваться для воздействия на иммунную систему. Опуская теоретическое обоснование, авторы утверждают, что предложенные в настоящем изобретении антагонисты могут модулировать иммунную систему, предотвращая или уменьшая связывание лиганда с TLR3, димеризацию TLR3, интернализацию TLR3 или перенос TLR3. Предложенные в настоящем изобретении способы могут быть использованы для лечения любого животного. Например, это могут быть млекопитающие, в том числе человек, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные. Например, представленные в настоящем изобретении антитела могут найти применение в качестве антагонистов активности TLR3 при лечении воспаления, воспалительных заболеваний и метаболических расстройств, а также в изготовлении медикаментозных препаратов для лечения указанных заболеваний, причем настоящее изобретение также предлагает предназначенную для введения дозу.

Вообще, воспалительные, инфекционные или иммуноопосредованные воспалительные состояния,

которые могут быть предотвращены или вылечены введением предложенных в настоящем изобретении антител-антагонистов TLR3, включают заболевания, опосредованные действием цитокинов или хемокинов, а также заболевания, которые целиком или частично возникают в результате активации TLR3 или сигнального пути TLR3. Примерами таких воспалительных состояний являются связанные с сепсисом состояния, воспалительные заболевания пищеварительного тракта, аутоиммунные, воспалительные и инфекционные заболевания. Также считается, что рак, сердечно-сосудистые заболевания, нарушения метаболизма, невралгические и фиброзные заболевания могут быть предотвращены или вылечены введением предложенных в настоящем изобретении антител-антагонистов TLR3. Воспаление может затрагивать одну ткань или быть системным. Как правило, поражаются ткани дыхательных путей, легкие, желудочно-кишечный тракт, тонкий и толстый кишечник, толстая кишка, прямая кишка, сердечно-сосудистая система, ткань сердца, кровеносные сосуды, суставы, мозг, синовиальные ткани, хрящевая ткань, эпителий, эндотелий, печень и жировая ткань. Типичными системными воспалительными состояниями являются "цитокинный шторм" или гиперцитокинемия, синдром системной воспалительной реакции (SIRS), реакция "трансплантат против хозяина" (GVHD), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), тяжелый острый респираторный дистресс-синдром (SARS), тяжелые вирусные инфекции, грипп, пневмония, шок или сепсис.

Воспаление является защитной реакцией организма на атаку проникающего агента. Воспаление состоит из последовательности событий, в которой участвуют многие клеточные или гуморальные медиаторы. С другой стороны, подавление воспалительных реакций может приводить к ослаблению иммунитета; тем не менее, при отсутствии контроля, воспаление может приводить к серьезным осложнениям, таким как хронические воспалительные заболевания (например, астма, псориаз, артрит, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, воспалительное заболевание пищеварительного тракта и тому подобные), септическому шоку и полиорганной недостаточности. Важно, что все эти заболевания имеют общие воспалительные медиаторы, такие как цитокины, хемокины, воспалительные клетки и другие медиаторы, секретируемые этими клетками.

Активация TLR3 лигандами поли(I:C), двухцепочечной РНК или эндогенными матричными РНК ведет к активации сигнального пути, приводящего к синтезу и секреции провоспалительных цитокинов, активации и рекрутингу участвующих в воспалительной реакции клеток, таких как макрофаги, гранулоциты, нейтрофилы и эозинофилы, а также к клеточной смерти и разрушению ткани. TLR3 индуцирует секрецию IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , MIP-1, CXCL5/IP-10 и RANTES, а также провоспалительных цитокинов и хемокинов, участвующих в привлечении и активации иммунокомпетентных клеток, приводя к разрушению ткани в случае аутоиммунных и других воспалительных заболеваний. Эндогенные матричные РНК, являющиеся лигандами TLR3, высвобождаются из некротических клеток в процессе воспаления и могут приводить к возникновению замкнутой положительной обратной связи, которая активирует TLR3, приводя к продолжению воспалительного процесса и дальнейшему разрушению ткани. Антагонисты TLR3, такие как антитела-антагонисты TLR3, могут участвовать в нормализации секреции цитокинов, уменьшать привлечение участвующих в воспалительном процессе клеток, а также уменьшать повреждение ткани и клеточную смерть. Следовательно, антагонисты TLR3 имеют терапевтический потенциал в лечении воспаления и целого спектра воспалительных заболеваний.

В качестве примера воспалительного состояния, связанного с сепсисом, можно привести синдром системной воспалительной реакции (ССВР), септический шок или синдром полиорганной недостаточности. Двухцепочечная РНК, высвобождающаяся при вирусной, бактериальной, грибковой инфекции или паразитарной инвазии, а также некротическими клетками, может способствовать развитию сепсиса. Опуская теоретическое обоснование, утверждается, что лечение антагонистами TLR3 может дать положительный терапевтический эффект, увеличив время жизни пациентов, страдающих от связанных с сепсисом воспалительных заболеваний, или предотвратив распространение местного воспалительного процесса (например, в легких) и переход воспаления в системное за счет естественной антимикробной активности, а также за счет взаимодействия с антимикробными агентами, минимизируя локальное воспаление, участвующее в развитии патологии, или за счет любой комбинации указанных эффектов. Такое вмешательство может быть достаточным для проведения необходимого для выживания пациента дополнительного лечения (например, лечения основной инфекции или уменьшения уровня цитокинов). Сепсис может исследоваться на животных моделях, например, у мышей, путем введения D-галактозамина и поли(I:C). В таких моделях D-галактозамин и гепатотоксин действуют как сенсibilizаторы при сепсисе, а поли(I:C) индуцирует сепсис, имитируя эффект двухцепочечной ДНК, и активирует TLR3. Лечение антагонистом TLR3 способно повысить выживаемость животных в экспериментах с сепсисом на мышах, следовательно, антагонисты TLR3 могут использоваться для лечения сепсиса.

Воспаление желудочно-кишечного тракта является воспалением слизистой оболочки и включает острое и хроническое состояние. Острое воспаление обычно характеризуется коротким начальным периодом и инфильтрацией или притоком нейтрофилов. Хроническое воспаление обычно характеризуется относительно более длительным начальным периодом и инфильтрацией или притоком мононуклеарных клеток. Слизистая оболочка может быть слизистой оболочкой пищеварительного тракта (включая тонкий и толстый кишечник), прямой кишки, выстилающего слоя желудка или ротовой полости. Примеры хро-

нических воспалительных заболеваний включают воспалительное заболевание пищеварительного тракта, индуцированные внешними воздействиями колиты (например, воспаление ЖКТ, (например, колиты), вызванное или сопутствующее (например, в качестве побочного эффекта) терапевтическим режимам, таким как химиотерапия, радиотерапия и тому подобные), инфекционный колит, ишемический, коллагеновый или лимфоцитарный колит, некротический энтероколит, колиты, вызванные другими заболеваниями, такими как хроническая гранулематозная болезнь или целиакия, пищевые аллергии, гастриты, инфекционные гастриты или энтероколиты (например, хронический гастрит, вызванный инфекцией *Helicobacter pylori*), а также другие формы желудочно-кишечного воспаления, вызванные инфекционным агентом.

Воспалительные заболевания пищеварительного тракта включают группу хронических воспалительных заболеваний обычно неизвестной этиологии, например, язвенный колит и болезнь Крона. Клинические и экспериментальные наблюдения позволяют предположить, что патогенез воспалительных заболеваний ЖКТ основан на многих факторах, включающих генетическую предрасположенность и влияние окружающей среды. При воспалении пищеварительного тракта повреждение ткани является результатом неправильного или чрезмерного иммунного ответа на антиген или микрофлору кишечника. Существует несколько животных моделей воспалительных заболеваний пищеварительного тракта. Наиболее распространена модель колита, индуцированного введением 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты/этанола (TNBS), и модель с использованием оксазалона, который индуцирует хроническое воспаление и изъязвление прямой кишки (Neurath et al., Intern. Rev. Immunol 19:51-62, 2000). В другой модели используется декстрансульфат натрия (ДСН), который индуцирует острый колит, сопровождающийся такими симптомами, как кровавая диарея, потеря веса, сокращение прямой кишки и вызываемое инфильтрацией нейтрофилов изъязвление слизистой оболочки. ДСН-индуцированные колиты гистологически характеризуются инфильтрацией участвующих в воспалении клеток в собственную пластинку слизистой оболочки, лимфоидной гиперплазией, поражением центральной крипты и изъязвлением эпителия (Hendrickson et al., Clinical Microbiology Reviews 15:79-94, 2002). Другая модель основана на адаптивном переносе наивных CD45RB CD4 T-клеток мышам линий RAG или SCID. В данной модели наивные T-клетки донора атакуют кишечник реципиента, вызывая хроническое воспаление пищеварительного тракта и симптомы, сходные с воспалительным заболеванием пищеварительного тракта человека (Read and Powrie, Curr. Protoc. Immunol. Chapter 15 unit 15.13, 2001). Введение предложенных в настоящем изобретении антагонистов в любую из названных моделей может быть использовано для оценки потенциальной эффективности указанных антагонистов в облегчении симптомов и изменении течения болезней, связанных с воспалительным процессом в пищеварительном тракте, например, воспалительного заболевания пищеварительного тракта. Существуют несколько возможностей лечения воспалительных заболеваний ЖКТ, например, антитела против TNF- уже в течение десятилетия используются для лечения болезни Крона (Van Assche et al., Eur. J. Pharmacol. Epub Oct 2009). Тем не менее, значительная часть пациентов невосприимчива к используемым в настоящее время способам лечения (Hanauer et al., Lancet 359:1541-1549, 2002; Hanauer et al., Gastroenterology 130:323-333, 2006) и, следовательно, необходима разработка новых подходов к лечению указанных пациентов.

Другим примером воспалительного состояния является воспалительный процесс в легких. Типично, воспаление легких включает вызванные инфекцией заболевания легких, в том числе связанные с вирусными, бактериальными, грибковыми, паразитарными и прионовыми инфекциями; индуцированные аллергеном заболевания легких; индуцированные загрязнением окружающей среды заболевания легких, такие как асбестоз, силикоз и бериллиоз; вызванные аспирацией желудочного содержимого, а также вызванные иммунной дисрегуляцией заболевания, воспалительные заболевания, зависящие от генетической предрасположенности, такие как муковисцидоз, заболевания, индуцированные физической травмой легких, например травма при искусственной вентиляции. Указанные воспалительные заболевания также включают астму, эмфизему, бронхиты, хронические обструктивные заболевания легких (ХОЗЛ), саркоидозы, гистиоцитозы, лимфоангиоматозы, острое повреждение легких, синдром острого нарушения дыхания, хроническое заболевание легких, бронхопальмональную дисплазию, внебольничную пневмонию, госпитальную пневмонию, вызванную искусственной вентиляцией легких пневмонию, сепсис, вирусную пневмонию, инфекции вирусом гриппа, парагриппозные инфекции, инфекции ротавирусом, инфекции человеческим метапневмовирусом, респираторно-синциальные инфекции, легочный аспергиллез и другие грибковые инфекции. Как правило, связанные с инфекцией воспалительные заболевания могут включать вирусную или бактериальную пневмонию, в том числе тяжелую пневмонию, муковисцидоз, бронхит, обострения заболеваний дыхательных путей и синдром острого нарушения дыхания (СОНД). Такие связанные с инфекцией заболевания могут вовлекать множественные инфекции, такие как первичную вирусную и вторичную бактериальную инфекции.

Астма является воспалительным заболеванием легких, которое характеризуется гиперчувствительностью дыхательных путей (ГДП), бронхостенозом, хрипами в легких, эозинофильным или нейтрофильным воспалением, гиперсекрецией слизи, субэпителиальным фиброзом и увеличением уровня иммуноглобулина IgE. Больные астмой испытывают "приступы", ухудшение симптомов, чаще всего вследствие инфекций респираторного тракта (например, риновирус, грипп, гемофильная палочка *Haemophilus influ-*

enza и пр.). Астматические приступы могут провоцироваться факторами окружающей среды (например, аскариды, насекомые, животные (например, кошки, собаки, кролики, мыши, крысы, хомячки, морские свинки и птицы), грибки, загрязнение воздуха (например, табачный дым), раздражающие газы, запахи, испарения, аэрозоли, химикаты, пыльца, физические упражнения или холодный воздух). Кроме астмы некоторые хронические, поражающие легкие воспалительные заболевания характеризуются нейтрофильной инфильтрацией дыхательных путей, например хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), бактериальная пневмония и муковисцидоз (Linden et al., *Eur. Respir. J.* 15:973-977, 2000; Rahman et al., *Clin. Immunol.* 115:268-276, 2005), а такие заболевания, как ХОЗЛ, аллергические риниты и муковисцидоз, характеризуются гиперчувствительностью дыхательных путей (Fahy and O'Byrne, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163:822-823, 2001). В качестве животных моделей для изучения астмы и воспаления дыхательных путей обычно используют провокацию овальбумином, а также модели, в которых сенсибилизация животного достигается введением метахолина (Hessel et al., *Eur. J. Pharmacol.* 293:401-412, 1995). Ингибирование продукции цитокинов и хемокинов в культурах человеческих эпителиальных бронхиальных клеток, бронхиальных фибробластов или клеток гладкой мускулатуры дыхательных путей может быть использовано в качестве экспериментальных моделей *in vitro*. Введение предложенных в настоящем изобретении антагонистов в любую из указанных моделей может быть использовано для оценки эффективности данных антагонистов в облегчении симптомов и изменении течения астмы, воспалений дыхательных путей, ХОЗЛ и других подобных заболеваний.

Другие воспалительные заболевания и нейропатии, которые могут быть предупреждены или вылечены представленными в настоящем изобретении способами, являются болезнями, вызванными аутоиммунными процессами. Эти заболевания и нейропатии включают рассеянный склероз, системную красную волчанку и нейродегенеративные заболевания и расстройства центральной нервной системы (ЦНС), например болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, биполярное аффективное расстройство и амиотрофический боковой склероз, болезни печени, например, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, неалкогольная жировая инфильтрация (жировая метаморфоз) печени/стеатогепатит, фиброз, гепатит С (HCV) и гепатит В (HBV), диабет и резистентность к инсулину, сердечно-сосудистые расстройства, например атеросклероз, церебральные кровотечения, инсульт и инфаркт миокарда, артрит, ревматоидный артрит, псориатический артрит и ювенильный ревматоидный артрит, остеопороз, остеоартрит, панкреатит, фиброз, энцефалит, псориаз, гигантоклеточный артериит, анкилозный спондилит, аутоиммунный гепатит, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), воспалительные заболевания кожи, трансплантаты, рак, аллергии, эндокринные заболевания, заживление ран, другие аутоиммунные заболевания, гиперчувствительность дыхательных путей, а также клеточные, вирусные или опосредованные прионами инфекции и заболевания.

Артриты, включая остеоартрит, ревматоидный артрит, артрит, развившийся в результате повреждения суставов, и другие подобные заболевания, являются обычными воспалительными заболеваниями, лечение которых может быть улучшено за счет терапевтического использования противовоспалительных белков, таких как представленные в настоящем изобретении антагонисты. Например, ревматоидный артрит (РА) является системным заболеванием, поражающим все тело, и одной из самых часто встречающихся форм артрита. Поскольку ревматоидный артрит приводит к поражению тканей, лиганды TLR3, скорее всего, присутствуют в месте воспаления. Активация сигнального пути TLR3 может приводить к непрекращающемуся воспалению и повреждению других тканей в воспаленном суставе. Существуют животные модели для изучения ревматоидного артрита. Например, при моделировании коллагениндуцированного артрита (КИА) у мыши развивается хронический воспалительный артрит, который сильно напоминает человеческий ревматоидный артрит. Введение представленных в настоящем изобретении антагонистов TLR3 экспериментальным мышам с КИА может быть использовано для оценки применения указанных антагонистов для облегчения симптомов и изменения течения болезни.

Сахарный диабет (лат. *Diabetes mellitus*) является многофакторным заболеванием и характеризуется гипергликемией (LeRoith et al., (eds.), *Diabetes Mellitus*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa. U.S.A. 1996, а также все упомянутые в работе ссылки). Неконтролируемая гипергликемия может приводить к увеличению преждевременной смертности вследствие повышения риска микро- и макроангиопатий, включая нефропатии, нейропатии, ретинопатии, гипертензии, цереброваскулярные заболевания и ишемическую болезнь сердца. Следовательно, контроль гомеостаза глюкозы является критически важным в лечении диабета.

Диабеты могут быть разделены на две большие группы, основываясь на вызывающих заболевание дефектах: диабет типа 1 (инсулинозависимый сахарный диабет, IDDM), возникающий при отсутствии в поджелудочной железе пациента производящих инсулин бета-клеток, и диабет типа 2 (инсулиннезависимый сахарный диабет, NIDDM), возникающий у пациентов с нарушением секреции инсулина бета-клетками и/или резистентностью к действию инсулина.

Диабет типа 2 характеризуется устойчивостью к инсулину, сопровождаемой относительной, но не абсолютной, инсулиновой недостаточностью. У инсулин-резистентных индивидуумов секретруется аномально высокое количество инсулина, что имеет компенсаторный эффект. При недостаточном количестве инсулина для компенсации резистентности к инсулину и контроля концентрации глюкозы разви-

вается состояние нарушения толерантности к глюкозе. У значительного числа индивидуумов во время болезни секреция инсулина уменьшается и концентрация глюкозы в плазме возрастает, приводя к клиническому диабету. Связанные с жировой тканью воспаления в значительной степени связаны с развитием резистентности к инсулину, диабетом типа 2, дислипидемией и сердечно-сосудистыми заболеваниями. У страдающих ожирением пациентов макрофаги перемещаются в жировую ткань и накапливаются там, приводя к выработке провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α и IL-6, свободных жирных кислот и адипокинов, способных влиять на инсулиновый сигнальный путь и индуцировать развитие резистентности к инсулину. Активация рецепторов TLR3 на макрофагах может приводить к состоянию, способствующему воспалению в жировой ткани. Существует несколько моделей для изучения резистентности к инсулину. Например, у экспериментальных животных с алиментарным ожирением развивается гипергликемия и резистентность к инсулину, сопровождающиеся набором веса. Введение представленных в настоящем изобретении антагонистов TLR3 экспериментальным животным с алиментарным ожирением может быть использовано для оценки эффективности антагонистов для облегчения осложнений, связанных с диабетом типа 2, и изменения течения болезни.

К раковым заболеваниям относятся злокачественные изменения в клетке, ткани, органе, организме, будь то животное или человек, включая, помимо прочего, такие заболевания, как лейкоз, острый лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (лимфолейкоз) (ОЛЛ), В-лимфобластный, либо Т-лимфобластный ОЛЛ, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), волосатоклеточный лейкоз, миелодиспластический синдром (МДС), лимфома, болезнь Ходжкина (лимфогранулематоз), злокачественная лимфома, неходжкинская лимфома, лимфома Беркитта, множественная миелома, саркома Капоши, колоректальная карцинома, карцинома поджелудочной железы, рак почки, рак молочной железы, назофарингеальная карцинома, злокачественный гистиоцитоз, паранеопластический синдром/гиперкальциемия, связанная со злокачественным ростом, твердые (локализованные) опухоли, аденокарциномы, плоскоклеточные карциномы, саркомы, злокачественная меланома, в особенности метастатическая меланома, гемангиома, метастазирующая опухоль, связанная с раком резорбция костной ткани и связанная с раком боль.

Типично, сердечно-сосудистые заболевания включают сердечно-сосудистые нарушения в клетках, ткани, органе, организме, будь то животное или человек, включая, помимо прочего, такие заболевания, как синдром внезапной смерти, инфаркт миокарда, застойная сердечная недостаточность, инсульт, ишемический инсульт, кровотечение, артериосклероз, атеросклероз, рестеноз, атеросклероз на фоне сахарного диабета, гипертензия, артериальная гипертензия, вазоренальная гипертензия, обморок, шок, сифилис сердечно-сосудистой системы, остановка сердца, легочное сердце (лат. *cor pulmonale*), первичная легочная гипертензия, сердечные аритмии, суправентрикулярная эктопическая систола, трепетание предсердий, мерцание предсердий (хроническое или приступообразное/пароксизмальное), реперфузионный синдром, воспалительный ответ на искусственное кровообращение, хаотическая или политопная предсердная тахикардия, тахикардия с узкими комплексами QRS, специфические аритмии, фибрилляция желудочков, аритмии, связанные с нарушением функции пучка Гиса, атриовентрикулярный блок, атриовентрикулярная блокада, ишемии миокарда, заболевания коронарной артерии, стенокардия (лат. *angina pectoris*), инфаркт миокарда, кардиомиопатия, дилатационная (застойная) кардиомиопатия, рестриктивная кардиомиопатия, порок сердца, эндокардит, перикардит, опухоли сердца, аневризм аорты и периферическая аневризма, расслаивающая аневризма аорты, воспаление аорты, окклюзия абдоминальной аорты и ее ответвлений, заболевания периферических кровеносных сосудов, окклюзии артериальных сосудов, атеросклероз периферических артерий, тромбоангиит (лат. *thromboangiitis obliterans*), функциональные расстройства периферических артерий, феномен Рейно и виброболь, акроцианоз, эритромелалгия, венозные заболевания, тромбоз вен, варикозное расширение вен, артериовенозная фистула, лимфедема, липедема, нестабильная стенокардия, реперфузионное повреждение, постперфузионный синдром и ишемически-реперфузионное повреждение.

Типично, неврологические заболевания включают неврологические нарушения в клетках, ткани, органе, организме, будь то животное или человек, включая, помимо прочего, такие заболевания, как нейродегенеративные болезни, рассеянный склероз, мигрень, СПИД-деменция, демиелинизирующие заболевания, такие как рассеянный склероз и острый поперечный миелит; экстрапирамидный синдром и церебеллярные расстройства, такие как поражения кортико-спинальной системы; заболевания, поражающие базальные ганглии, или церебеллярные расстройства; гиперкинетические синдромы, такие как хорей Гентингтона и сенильная хорей; медикаментозные нарушения движения, такие как нарушения, вызываемые блокировкой допаминовых рецепторов; гипокинетические нарушения движения, такие как болезнь Паркинсона; прогрессирующий супрануклеарный паралич; структурные нарушения мозжечка; спиноцеребеллярные дегенерации, такие как спинальная атаксия, атаксия Фридрейха, мозжечковые кортикальные дегенерации, мультисистемные дегенерации (Менцеля, Дежерина-Гома, Ши-Драгера и Мачадо-Джозефа); системные расстройства (болезнь Рефсума, абеталипопротеинемия, атаксия, телеангиэктазия и митохондриальные мультисистемные расстройства); демиелинизирующие заболевания, такие как рассеянный склероз, острый поперечный миелит; и расстройства моторной функции, такие как нейрогенные мышечные атрофии (дегенерация моторных нейронов, например амиотрофический боковой склероз, дет-

ская и юношеская спинальные мышечные атрофии); болезнь Альцгеймера; синдром Дауна в зрелом возрасте; деменция с тельцами Леви; сенильная деменция с тельцами Леви; синдром Вернике-Корсакова; хронический алкоголизм; болезнь Крейтцфельда-Якоба; подострый склерозирующий лейкоэнцефалит, болезнь Галлервордена-Шпатца и деменция боксеров.

Типичные фиброзные заболевания включают фиброз печени (включая, помимо прочего, такие заболевания, как вызванный алкоголем цирроз, цирроз, индуцированный вирусной инфекцией, аутоиммунный гепатит); фиброз легких (включая, помимо прочего, такие заболевания, как склеродермия, идиопатический фиброз легких); фиброз почек (включая, помимо прочего, такие заболевания, как склеродермия, вызванный диабетом нефрит, гломерулонефрит, вызванный системной красной волчанкой нефрит); фиброзы кожи (включая, помимо прочего, такие заболевания, как склеродермия, гипертрофические и келлоидные рубцы); миелофиброз; нейрофиброматоз; фиброму; фиброзные изменения кишечника и фиброзные спайки, возникающие в результате хирургического вмешательства. В этих способах фиброз может быть органоспецифическим или системным. Органоспецифический фиброз может быть связан по меньшей мере с одним из следующих заболеваний: фиброз легких, фиброз печени, фиброз почек, фиброз сердца, фиброз сосудов, фиброз кожи, фиброз глаза, фиброз костного мозга и пр. Фиброз легких может быть связан по меньшей мере с одним из следующих заболеваний: идиопатический легочный фиброз, медикаментозный легочный фиброз, астма, саркоидоз или хроническая обструктивная болезнь легких. Фиброз печени может быть связан по меньшей мере с одним из следующих заболеваний: цирроз, шистосомоз или холангит. Цирроз может быть либо алкогольным, либо возникшим после гепатита С или первичным билиарным циррозом. Холангит является склерозирующим холангитом. Фиброз почек может быть связан с диабетической нефропатией или с вызванным системной красной волчанкой гломерулосклерозом. Фиброз сердца может быть связан с инфарктом миокарда. Фиброз сосудов может быть связан с повторным сужением артерий после ангиопластики или атеросклерозом. Фиброз кожи может быть связан с возникшими в результате ожога рубцами, гипертрофическими рубцами, келлоидными рубцами или нефрогенной фиброзирующей дермопатией. Фиброз глаза может быть связан с ретро-орбитальным фиброзом, с хирургическим вмешательством при лечении катаракты или пролиферативной витреоретинопатией. Фиброз костного мозга может быть связан с идиопатическим миелофиброзом или медикаментозным миелофиброзом. Другие фиброзы могут быть выбраны из таких заболеваний, как болезнь Пейрони, контрактура Дюпюитрена (синдром) или дерматомиозит. Системные фиброзы могут быть системными склерозами или реакцией "трансплантат против хозяина".

Введение/составление фармацевтических композиций

"Терапевтически эффективное количество" агента, эффективного в лечении или профилактике заболевания, при котором желательна активность TLR3, может быть определено путем стандартных исследовательских способов. Например, доза агента, эффективная в лечении или профилактике воспалительных заболеваний, таких как астма, болезнь Крона, язвенных колит или ревматоидный артрит, может быть определена введением агента в соответствующую модель, такую как представленные здесь модели.

Кроме того, в случае необходимости, для оптимизации дозы могут быть использованы тест-системы *in vitro*. Точное определение эффективной дозы (например, с помощью клинических испытаний) может быть осуществлено специалистами на основании нескольких факторов. Такими факторами являются подлежащее лечению или профилактике заболевание, симптомы заболевания, масса тела пациента, иммунологический статус пациента и другие известные специалистам факторы. Точная доза, предназначенная для применения в формуле композиции, зависит от способа введения препарата, а также от тяжести болезни и должна определяться на основании врачебного решения и состояния каждого пациента. Эффективная доза может быть экстраполирована исходя из кривой динамики доза-ответ, полученной в экспериментах на животных или *in vitro*.

В представленных в настоящем изобретении способах антагонисты TLR3 могут вводиться по одному или в сочетании по меньшей мере с одной дополнительной молекулой. В качестве дополнительных молекул могут выступать другие молекулы-антагонисты TLR3 или молекулы, имеющие терапевтическое значение, не опосредованное сигнальным путем рецептора TLR3. Уменьшающие производство или активность цитокинов компаунды, состоящие из антибиотиков, противовирусных, паллиативных или прочих веществ, являются примерами таких дополнительных молекул.

Для введения предназначенного для терапевтического использования агента может быть использован любой приемлемый путь введения, который обеспечивает попадание агента к пациенту. Фармацевтические композиции данных агентов являются особенно полезными при парэнтеральном введении, например, внутривенном, внутримышечном, внутривагинальном, интраназальном.

Предложенный в данном изобретении агент может быть изготовлен в виде фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество агента в качестве активного компонента вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Термин "носитель" относится к растворителям, адьювантам, связывающим веществам или среде, вместе с которыми активное соединение будет вводиться. Фармацевтическая среда может быть жидкой, как, например, вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла растительного, животного или синтетического происхождения, например арахисовое, соевое, ми-

неральное, кунжутное и другие подобные масла. Например, могут быть использованы 0,4% раствор поваренной соли и 0,3% раствор глицина. Указанные растворы стерильны и обычно не содержат твердых примесей. Стерилизация проводится с использованием общепринятых, хорошо известных способов стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать принятые в фармацевтике вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, например, вещества, необходимые для контроля и изменения pH, стабилизаторы, увеличивающие плотность, увлажняющие и придающие окраску агенты и т.д. Концентрация предложенного в данном изобретении агента в таких фармацевтических формулировках может значительно варьировать, т.е. от менее чем 0,5% (обычно не менее 1%) до 15-20% от веса и определяется, в первую очередь, на основании необходимой дозы, объема, вязкости и т.д., в соответствии с выбранным способом введения.

Таким образом, предложенные в настоящем изобретении фармацевтические композиции, предназначенные для внутримышечного введения, могут содержать 1 мл стерильного буферного раствора, а также приблизительно от 1 нг до 100 мг, например приблизительно от 50 нг до 30 мг, или предпочтительнее приблизительно от 5 до 25 мг предложенного в настоящем изобретении антитела-антагониста TLR3. Сходным образом, предложенная в настоящем изобретении фармацевтическая композиция для внутривенного введения может содержать приблизительно 250 мл стерильного раствора Рингера и приблизительно от 1 до 30 мг, или предпочтительнее приблизительно от 5 до 25 мг предложенного в настоящем изобретении антагониста. Способы изготовления парентерально вводимых композиций хорошо известны и их детальное описание может быть найдено (см., например, в "Remington's Pharmaceutical Science", 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA).

Предложенные в настоящем изобретении антитела-антагонисты могут быть лиофилизированы для хранения и впоследствии перед использованием восстановлены (растворены) в подходящем носителе. Было показано, что этот способ эффективен для обычно используемых иммуноглобулинов и белковых препаратов, при этом могут быть использованы известные специалистам способы лиофилизации и восстановления.

Настоящее изобретение сейчас будет охарактеризовано с помощью нижеприведенных примеров, описывающих настоящее изобретение, но не ограничивающих его.

Пример 1

Идентификация и получение антагонистов mAb против huTLR3

Комбинаторная библиотека человеческих антител MorphoSys (HuCAL®) Gold phage display library (Morphosys AG, Мартинсрид, Германия) использовалась в качестве источника фрагментов человеческих антител и планировалась для получения антител против очищенного антигена TLR3, полученного путем экспрессии аминокислот 1-703 человеческого TLR3 (huTLR3) (SEQ ID NO: 4) с полигистидиновым хвостом на С-конце и очистки методом аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов. Аминокислоты 1-703 соответствуют предсказанному внеклеточному домену (ECD) huTLR3. Fab-фрагменты, специфически связывающиеся с внеклеточным доменом huTLR3, выбирали путем представления белка TLR3 различными способами, чтобы идентифицировать разнородный набор фрагментов антител, секвенировали и подтверждали его уникальность. Используя различные стратегии, было отобрано 62 белка-кандидата (с различными последовательностями V-сегмента), способных связываться исключительно с внеклеточным доменом huTLR3.

Эти 62 белка, идентифицированные как способные связываться исключительно с внеклеточным доменом huTLR3, были проверены на способность нейтрализовать его активность с помощью целого ряда работающих на клеточном уровне тест-систем, пригодных для анализа противовоспалительной активности. Используя предварительные показатели активности (см. далее пример 2), из 62 были отобраны четыре кандидата (Fab 16-19), определяющие семейства 16-19, в качестве исходного материала для созревания тяжелой цепи CDR2 (HCDR2) и легкой цепи CDR3 (LCDR3). Один из исходных кандидатов (кандидат 19) имел N-связанный гликозилированный участок в HCDR2; с целью избавиться от гликозилированного участка в гене, кодирующем названный белок-кандидат, была индуцирована мутация, заменяющая Ser на Ala (S на A). После созревания CDR четырех исходных кандидатов было выбрано 15 дочерних кандидатов (кандидаты 1-15) для дальнейшей характеристики, согласно описанию, приведенному ниже в примере 2. Вариабельные участки легкой и тяжелой цепей каждого из 19 кандидатов перечислены в табл. 3. Указанные кандидаты будут далее называться mAb 1-19 или Fab 1-19, в зависимости от того, являются ли они Fab-фрагментами антител или представляют собой полную клонированную последовательность антитела (пример 3). Вследствие особенности дизайна экспрессионного вектора крайними сегментами вариабельных участков зрелых антител у всех кандидатов являются QVE для тяжелой цепи и DI для легкой цепи. Предпочтительными последовательностями для указанных сегментов являются последовательности генов клеток зародышевой линии, имеющие высокую степень сходства с последовательностью кандидата. Для семейств 17 и 18 последовательность генов клеток зародышевой линии была QVQ для VH и SY для VL. Последовательности семейства 19 являются последовательностями EVQ для VH и DI для VL. Последовательность SY является уникальной для лямбда подгруппы 3, и существуют свидетельства гетерогенности S или Y в отношении конечного остатка. Таким образом, консенсусный конец QSV из выдающейся подгруппы лямбда 1 был сочтен более подходящей заменой DIE для VL се-

мейств 17 и 18. Эти изменения были внесены в кандидаты 9, 10 и 12 из семейства 18 и кандидаты 14 и 15 из семейства 19. В этом процессе были оптимизированы кодоны областей VH и VL этих антител. Варианты N-конца аминокислотных последовательностей переменного участка легкой цепи, полученные из клеток зародышевой линии, которые являются вариантами кандидатов 9, 10 и 11, показаны в SEQ ID NO: 209-211, а варианты N-конца аминокислотных последовательностей переменного участка тяжелой цепи, полученные из клеток зародышевой линии, которые являются вариантами кандидатов 9, 10, 12, 14 и 15, показаны в SEQ ID NO: 212-216 соответственно. Варианты N-конца данных кандидатов называются в настоящем изобретении кандидат/mAb/Fab 9QVQ/QSV, 10QVQ/QSV, 12QVQ/QSV, 14EVQ или 15EVQ. Варианты N-конца, полученные из клеток зародышевой линии, экспрессированные как mAb, не оказывают влияния на связывание TLR3 или на способность антител ингибировать биологическую активность TLR3 по сравнению с исходными белками (данные не показаны).

Пример 2

Определение активности антагониста TLR3 *in vitro*

15 Охарактеризованных выше кандидатов с созревшим CDR были отобраны как потенциально пригодные для лечения человека, была определена эффективность связывания и способность оказывать нейтрализующий эффект на активность рецептора. Результаты исследования активности и результаты для четырех исходных Fab, Fab 16-19 и фрагментов Fab 15, содержащих созревшие CDR, Fab 1-15, либо их V-участки, не заимствованные из клеток зародышевой линии, приводятся далее.

Ингибирование сигнального каскада κ NF- κ B и ISRE

Клетки 293T культивировали в средах DMEM и GlutaMax (Invitrogen, Carlsbad, CA), содержащих инактивированный с помощью термического воздействия FBS, затем клетки были трансфицированы введением 30 нг pNF- κ B или плазмиды-репортера ISRE, содержащей ген люциферазы светлячка, 13,5 нг вектора плазмидной ДНК 3,1, 5 нг вектора pRL-TK и 1,5 нг вектора плазмидной КДНК, кодирующего FL TLR3 (SEQ ID NO: 2). Плазида pRL-TK содержит ген люциферазы Renilla (люцифераза коралла, *Renilla reniformis*), регулируемый HSV-1 промотором тимидинкиназы (Promega, Madison, WI). Антитела TLR3 инкубировались в течение 30-60 мин перед добавлением поли(I:C) (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Планшеты инкубировались в течение 6 или 24 ч при 37°C перед добавлением люциферазного реагента Dual-Glo; последующий анализ планшет проводился с помощью прибора FLUOstar. Нормализацию значений (относительная интенсивность сигнала) получили делением RLU (интенсивность сигнала, измеренная в относительных единицах люминесценции - relative luminescence units, RLU) люциферазы светлячка на RLU коралловой люциферазы (*Renilla*). Путем стимуляции агентом поли(I:C), являющимся агонистом TLR3 (1 мкг/мл), добивались специфического ингибирования каскада передачи сигнала с участием NF- κ B или ISRE, стимулирующего производство люциферазы светлячка, что достигалось за счет инкубации клеток с антителами против TLR3 (0,4, 2,0 и 10 мкг/мл). Результаты анализа NF- κ B показаны на фиг. 1 как выраженное в процентах относительное ингибирование люцифераз Firefly/Renilla с 5465 в качестве положительного контроля (нейтрализация mAb против человеческого TLR3) и mAb против человеческого тканевого фактора (859) в качестве контроля для человеческого изотипа IgG4. >50% Ингибирование было достигнуто при концентрации mAb 0,4-10 мкг/мл. с1068 и TLR3.7 ингибируют около 38 и 8% биологической активности TLR3 при концентрации 10 мкг/мл. Сходные результаты были получены при использовании гена-репортера ISRE (данные не показаны).

Производство цитокинов клетками BEAS-2B

Клетки BEAS-2B (SV-40 трансформированные нормальные человеческие клетки бронхиального эпителия) высевались на чашки, покрытые коллагеном типа 1, и, перед добавлением поли(I:C), инкубировались с антителами против человеческого TLR3 или без них. Через 24 ч после обработки собирали надосадочную жидкость и определяли содержание цитокинов и хемокинов с помощью сделанной по заказу тест-системы, основанной на гибридизации на поверхности шариков, для определения IL-6, IL-8, CCL-2/MCP-1, CCL5/RANTES и CXCL10/IP-10. Результаты показаны на фиг. 2 как % ингибирования отдельных цитокинов/хемокинов после обработки mAb, при концентрации 0,4, 2,0 и 10 мкг/мл. 5465 - положительный контроль; 859 - контроль изотипа.

Производство цитокинов клетками NHBE

Производство цитокинов может быть также изучено в нормальных клетках человеческого эпителия (NHBE) (Lonza, Walkersville, MD). Клетки NHBE были размножены, а затем перенесены на покрытые коллагеном чашки для инкубации в течение 48 ч; после этого использованную среду удалили и добавили 0,2 мл свежей среды. Клетки инкубировались с mAb против человеческого TLR3 или без них в течение 60 мин перед добавлением поли(I:C). Спустя 24 ч надосадочную жидкость собирали и хранили при -20°C, либо анализировали на содержание IL-6. Результаты представлены графически на фиг. 3 как выраженное в процентах ингибирование секреции IL-6 в результате обработки mAb в дозах от 0,001 до 50 мкг/мл. 5465 - положительный контроль; 859 - контроль изотипа. Большинство mAb вызывали по меньшей мере 50% ингибирование выработки IL-6 при концентрации <1 мкг/мл и ингибирование до 75% при концентрации <5 мкг/мл.

Производство цитокинов клетками PBMC

Производство цитокинов также было изучено в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC). Кровь, полученная от доноров, собиралась в содержащие гепарин пробирки, к которым осторожно, в качестве нижнего слоя, добавляли раствор Фиколл Пак Плюс (Ficoll-Paque Plus). Пробирки центрифугировались и клетки PBMC, формирующие белый слой непосредственно над слоем Ficoll, были собраны и высеяны на планшеты. После этого клетки PBMC культивировали с mAb против человеческого TLR3 или без них перед добавлением 25 мкг/мл поли(I:C). Через 24 ч отбирали надосадочную жидкость и определяли концентрацию цитокинов с помощью технологии Luminex. Результаты представлены на графике на фиг. 4, где показано выраженное процентное суммарное ингибирование IFN- γ , IL-12 и IL-6 при использовании единичной дозы mAb (0,4 мкг/мл) с 5465 в качестве положительного контроля; huIgG4 использован в качестве контроля изотипа.

Производство цитокинов клетками HASM

Вкратце, клетки гладкой мускулатуры дыхательных путей человека (HASM) инкубировались с mAb против человеческого TLR3 или без них, после чего к клеткам была добавлена комбинация 500 нг/мл поли(I:C) и 10 нг/мл TNF- α . Спустя 24 ч супернатанты собрали и определили уровень цитокинов с помощью технологии Luminex. Результаты показаны графически на фиг. 5 в виде концентраций хемокина CCL5/RANTES при трех дозах mAb (0,4, 2 и мкг/мл). 5465 - положительный контроль; hIgG4 - контроль изотипа.

Результаты исследования клеток человека *in vitro* подтверждают способность предложенных в настоящем изобретении антител уменьшать производство цитокинов и хемокинов в результате связывания с huTLR3.

Пример 3

Конструкции антител в полную длину

Четыре исходных фрагмента Fab (кандидаты № 16-19) и 15 дочерних Fab (кандидаты № 1-15) тяжелых цепей были клонированы в клетках, содержащих мутацию в гене иммуноглобулина IgG4 (мутация S229P Fc). Кандидаты 9QVQ/QSV, 10QVQ/QSV, 12QVQ/QSV, 14EVQ или 15EVQ были клонированы в клетках, содержащих мутации в гене иммуноглобулина IgG4, мутации F235A/L236A и S229P Fc.

Зрелые, имеющие полную длину аминокислотные последовательности тяжелых цепей показаны в SEQ ID NO: 90-102 и 218-220

<u>Кандидат</u>	<u>SEQ ID NO:</u>
16	90
17	91
18	92
19	93
1	94
2	95
3	96
4	97
5, 6, 7	98
8	99
9	100
10, 11, 12	101
13, 14, 15	102
9EVQ	218
10EVQ, 12EVQ	219
14EVQ, 15EVQ	220

Для экспрессии эти последовательности тяжелых цепей могут включать N-концевую лидерную последовательность, например, MAWVWTLFLMAAAQSIQA (SEQ ID NO: 103). Нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь кандидатов 14EVQ и 15EVQ с лидерной последовательностью, а также зрелую форму (без лидерной последовательности), показаны в SEQ ID NO: 104 и 105 соответственно. Подобным образом, для экспрессии последовательности легкой цепи антител настоящего изобретения могут включать N-концевую лидерную последовательность, например, MGVPTQVLGLLLLWLT DARC (SEQ ID NO: 106). Нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь кандидата 15 после оптимизации кодонов с лидерной последовательностью, а также зрелую форму (без лидерной последовательности), показаны в SEQ ID NO: 107 и 108 соответственно.

Пример 4

Характеристика связывания mAb против TLR3

Значения ЭК50 при связывании mAb с внеклеточным доменом (ECD) человеческого TLR3 определяли методом ИФА. Белок ECD человеческого TLR3 разводили до 2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и аликвоты по 100 мкл вносили в каждую лунку 96-луночного планшета (Corning Inc., Acton, MA).

После инкубации в течение ночи при 4°C планшет трижды промывали отмывочным буфером, содержащим 0,05% Твин-20 (Sigma-Aldrich) в ФСБ. В лунки вносили 200 мкл блокирующего раствора 2% I-Block (Applied Biosystems, Foster City, CA) и 0,05% твина-20 в фосфатно-солевом буфере. После блокирования в течение 2 ч при комнатной температуре планшет трижды промывали добавлением серийных разведений кандидатов 1-9 антител против TLR3 в блокирующем буфере mAb против TLR3, инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч и трижды промывали. Затем добавляли конъюгированные с пероксидазой овечьи антитела против человеческого IgG (GE Healthcare, Piscataway, NJ), разведенные в соотношении 1:4000 в блокирующем буферном растворе, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем трижды промыли в отмывочном буфере. Связывание выявляли путем 10-15-минутной инкубации в TMB-S (Fitzgerald Industries International, Inc., Concord, MA). Реакцию останавливали добавлением 25 мкл 2N H₂SO₄ и измеряли поглощение при 450 нм (вычитая поглощение при 650 нм) с помощью спектрофотометра SPECTRA Max (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). Значения ЭК50 определяют способом нелинейной регрессии с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Значения ЭК50 определяли в реакции связывания, инкубируя huTLR3 (табл. 4) с 100 мкл 4-кратных серийных разведений mAb от 2,5 мкг/мл до 0,6 пг/мл. Отрицательными контрольными образцами служили античеловеческий тканевой фактор mAb 859 и hu IgG4κ.

Аффинность связывания для huTLR3 ECD определяли также с помощью Biacore-анализа. Полученные данные (не показаны) продемонстрировали, что K_d mAb 1-19 при связывании с huTLR3 ECD составляет менее 10⁻⁸ М.

Таблица 4

Кандидат №	ЭК50 (ng/mL)
1	17,18
2	53,12
3	23,42
4	12,77
5	19,94
6	19
7	16,13
8	18,58
9	22,61
10	15,84
11	26,33
12	25,59
13	23,51
14	33,59
15	32,64
16	43,66
17	13,8
18	9,68
19	66,54

Пример 5

Конкуrentное связывание с эпитопами

Эксперименты по связыванию с эпитопами проводили с целью определения конкурентных групп или "групп эпитопов" антител против TLR3.

При конкурентном ИФА 5 мкл очищенного человеческого белка TLR3 ECD (20 мкг/мл), синтезированного в соответствии с описанием в примере 1, вносили в лунки планшета MSD HighBind (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) и выдерживали 2 ч при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли 150 мкл блокирующего буфера А (Meso Scale Discovery) и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали буфером 0,1 М HEPES, pH 7,4, затем добавляли смесь меченых mAb против TLR3 с разными конкурирующими агентами. Меченые антитела (10 нМ) инкубировали с увеличивающимися концентрациями (от 1 нМ до 2 мкМ) немеченых антител против TLR3, затем смесь вносили в обозначенные лунки в объеме 25 мкл. После 2 ч инкубации с осторожным встряхиванием при комнатной температуре планшет трижды промывали буфером 0,1 М HEPES (pH 7,4). Буфер MSD Read Buffer Т разводили дистиллированной водой 4 раза и вносили в лунки в объеме 150 мкл/лунку, а затем анализировали с помощью прибора SECTOR Imager 6000. Антитела метили эфиром MSD Sulfo-Tag™ NHS согласно инструкции производителя (Meso Scale Discovery).

Оценивали следующие антитела против TLR3: mAb 1-19, полученные из комбинаторной библиотеки антител человека Morphosys (MorphoSys Human Combinatorial) (показаны в табл. 3а); c1068 (описанные в WO 06/060513A2), c1811 (крысиные mAb против мышиных TLR3, полученные из гибридомы крыс, иммунизированных мышиным белком TLR3), TLR3.7 (eBiosciences, Сан-Диего, Калифорния, кат. номер 14-9039) и IMG-315A (против аминокислот человеческого TLR3 аминокислот 55-70 (VLNLTH-

NQLRRLPAAN) от Imgenex, Сан-Диего, Калифорния). Для mAb 9, 10, 12, 14 и 15 в данном исследовании использовали варианты 9QVQ/QSV, 10QVQ/QSV, 12QVQ/QSV, 14EVQ или 15EVQ.

При количественной оценке конкуренции антитела против TLR3 взаимодействовали с пятью различными группами. Группа А: mAb 1, 2, 13, 14EVQ, 15EVQ, 16, 19; группа В: mAb 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9QVQ/QSV, 10QVQ/QSV, 11, 12QVQ/QSV, 17, 18; группа С: антитело Imgenex IMG-315А; группа D: антитела TLR3.7, c1068; и группа E: антитело c1811.

Пример 6

Картирование эпитопов

Для дальнейшего картирования эпитопов в соответствии с описанием, приведенным в примере 5, отбирали репрезентативные антитела из различных наборов эпитопов. Картирование эпитопов проводили с помощью различных способов, в числе которых эксперименты по замене сегментов TLR3, мутагенез, замена H/D (водорода на дейтерий) и компьютерное моделирование белок-белковой стыковки (The Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 6, Glen E. Morris ed., 1996).

Замена сегментов TLR3. Химерные человеческие-мышинные белки TLR3 использовали для обнаружения местоположения крупных антителсвязывающих доменов в TLR3. Внеклеточный домен человеческого белка делили на три сегмента (aa 1-209, aa 210-436, aa 437-708 в соответствии с нумерацией аминокислот в человеческом GenBank Acc. No. NP_003256). Химерный белок MT5420 был создан путем замены аминокислот человеческого TLR3 210-436 и 437-708 на соответствующие мышинные аминокислоты (мышинный TLR3, GenBank Acc. No. NP_569054, аминокислоты 211-437 и 438-709). Химера MT6251 была создана путем замены человеческих аминокислот в положениях 437-708 на аминокислоты мышинного TLR3 (мышинный TLR3, GenBank Acc. No. NP_569054, аминокислоты 438-709). Все конструкторы были созданы на основе вектора pСЕР4 (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) с помощью стандартных методик клонирования. Белки экспрессировали в HEK293 клетках как белки с V5-His6, присоединенным к С-концу, и очищали в соответствии с описанием в примере 1.

mAb c1068. mAb c1068 с высокой аффинностью связывается с ECD человеческого TLR3, однако не связывается надлежащим образом с мышинным TLR3. c1068 утратило способность связываться как с MT5420, так и с MT6251, из чего можно сделать вывод, что участок связывания располагался в пределах последовательности аминокислот 437-708 WT белка человеческого TLR3.

mAb 12QVQ/QSV. mAb 12QVQ/QSV связывалось с обеими химерами, указывая на то, что участок связывания mAb 12QVQ/QSV располагался в пределах последовательности аминокислот 1-209 белка человеческого TLR3 с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 2.

Стыковка белок-белок *In silico*. Кристаллическая структура mAb 15EVQ (см. ниже) и опубликованная структура человеческого TLR3 (Bell et al., J. Endotoxin Res. 12:375-378, 2006) были минимизированы по энергии в CHARMM (Brooks et al., J. Computat. Chem. 4:187-217, 1983) для использования в качестве стартовых моделей для докинга. Стыковка белок-белок изучалась с помощью программы ZDOCKpro 1.0 (Accelrys, San Diego, CA), эквивалентной ZDOCK 2.1 (Chen и Weng, Proteins 51: 397-408, 2003) с угловой сеткой 6 градусов. Известный участок N-гликозилирования по остатку Asn в человеческом TLR3 (Asn 52, 70, 196, 252, 265, 275, 291, 398, 413, 507 и 636) (Sun et al., J. Biol. Chem. 281:11144-11151, 2006) блокировали от участия в образовании комплекса антиген-антитело по термину energy в алгоритме программы ZDOCK. Было получено 2000 исходных положений, которые использовали при группировке, затем положения при белок-белковой стыковке уточняли и повторно оценивали в программе RDOCK (Li et al., Proteins 53:693-707, 2003). Визуально проверили 200 положений с наиболее высокими начальными оценками по ZDOCK и 200 лучших положений по RDOCK.

Кристаллизация 15EVQ проводилась способом диффузии пара при 20°C (Benvenuti и Mangani, Nature Protocols 2:1633-51, 2007). Начальный скрининг проводили с помощью автомата Hydra на 96-луночных планшетах. В эксперименте капли по 0,5 мкл раствора белка смешивали с 0,5 мкл резервуарного раствора. Капли уравнивали против 90 мкл резервуарного раствора. Раствор Fab в 20 мМ Трис-буфера, pH 7,4, содержащий 50 мМ NaCl, концентрировали до 14,3 мг/мл с помощью ячеек Amicon Ultra-5 кДа. Скрининг проводили с помощью Wizard I & II (Emerald BioSystems, Бейнбридж Айленд, Вашингтон) и использовавшихся в лаборатории лотков с ячейками для кристаллизации. Кристаллизацию фрагментов Fab 12QVQ/QSV проводили похожим способом.

Данные по дифракции рентгеновских лучей собирали и обрабатывали с помощью микрофокусного генератора рентгеновских лучей Rigaku MicroMax™-007HF, снабженного конфокальной оптикой Osmic™ VariMax™, детектором Saturn 944 CCD и системой криоохлаждения X-stream™ 2000 (Rigaku, Вудлендс, Техас). Интенсивность дифракции выявляли по вращению кристалла более чем на 270°, причем время экспозиции при повороте кристалла на полградуса составляло 120 с. Данные рентгенографии обрабатывали с помощью программы D*TREK (Rigaku). Структуру определяли способом молекулярного замещения с помощью программы Phaser или CNX (Accelrys, Сан-Диего, Калифорния). Положения атомов и температурные коэффициенты уточняли с помощью программы REFMAC с использованием всех данных в диапазоне разрешения 15-2,2 Å для Fab 15EVQ и 50-1,9 Å для Fab 12QVQ/QSV. Молекулы воды добавляли при пиках электронной плотности (F_o-F_c) с точкой отсечения 3σ. Все кристаллографиче-

ские вычисления проводили с помощью набора программ CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994. CCP4 suite: программы для кристаллографии белков. Acta Crystallogr. D50:760-763). Коррекцию модели осуществляли с помощью программы COOT (Emsley et al., Acta Crystallogr. D60:2126-2132, 2004).

Расшифровка кристаллической структуры mAb 15EVQ показала, что на участке контакта с антителом в тяжелой цепи содержится множество отрицательно заряженных остатков (D52, D55, E99, D106 и D109). Таким образом, в распознавании mAb 15EVQ и TLR3, по всей вероятности, участвуют положительно заряженные остатки. Имитации белок-белковой стыковки выявили хорошую комплементарность антитела и двух больших участков TLR3 с множеством положительно заряженных остатков. При симуляции взаимодействия TLR3 с антителом против TLR3 были выявлены остатки на TLR3, участвующие в этом взаимодействии: R64, K182, K416, K467, Y468, R488, R489 и K493.

Исследования с помощью мутагенеза. С помощью единичных и комбинированных точечных мутаций изменяли поверхностные остатки внеклеточного домена TLR3 в участках, которые, как было установлено выше, формировали эпитопы mAb 12 и mAb 15EVQ и проверяли способность полученных мутантных белков к связыванию антител.

Нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислоты 1-703 человеческого TLR3 (ECD), (SEQ ID NO: 4; GenBank номер доступа NP_003256) клонировали согласно стандартным протоколам. Все мутанты создавали способом сайт-направленного мутагенеза с помощью набора реагентов Quickchange II XL (Stratagene, Сан-Диего, Калифорния) в соответствии с протоколом производителя и с использованием олигонуклеотидов, показанных в табл. 5а. Мутации идентифицировали секвенированием ДНК. Белки экспрессировали под контролем CMV-промотора, присоединяя к С-концу гистидиновый хвост (His-tag), в клетках линии HEK293 и очищали в соответствии с описанием в примере 1.

Количественная оценка связывания. Активность связывания mAb 12QVQ/QSV и mAb 15EVQ с человеческим TLR3 и его искусственными вариантами оценивали с помощью ИФА. Чтобы ускорить процесс, мутантов в предсказанном участке связывания mAb 15EVQ коэкспрессировали в клетках HEK, осуществляя котрансфекцию мутантного TLR3 ECD, содержащего гистидиновый хвост на С-конце, с mAb 12QVQ/QSV, а затем очищали металл-аффинной хроматографией. Полученный образец представлял собой комплекс мутанта TLR3 с mAb 12. Данный способ пригоден потому, что участки связывания mAb 12QVQ/QSV и mAb 15EVQ расположены вдали друг от друга, и, таким образом, точечные мутации в одном сайте вряд ли повлияют на эпитоп другого сайта. Эти комплексы использовались при исследовании связывания методом ИФА. В лунки планшета MSD HighBind (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд) вносили по 5 мкл раствора TLR3 ECD дикого типа или мутантных белков в ФБР (20 мкг/мл). Планшеты инкубировали 60 мин при комнатной температуре, а затем вносили блокирующий раствор А MSD (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). В табл. 5а показаны последовательности смысловых олигонуклеотидов. При реакции мутагенеза использовали антисмысловые олигонуклеотиды с комплементарными последовательностями.

Вариант	Олиго	Seq ID NO:
R64E	5' CCTTACCATAAATGAACCTCGAGAGATTACCAGCCGCCAAC 3'	136
K182E	5' CAAGAGCTTCTATTATCAACAATGAGATTCAAGCGCTAAAAAGTGAAG 3'	137
K416E	5' CCTTACACATCTCAACCTAACCCGAGAATAAAATCTCAAAAATAG 3'	138
K467E/ Y468A	5' GAAATCTATCTTCCCTACAACGAGGCCCTGCAGCTGACTAGGAACTC 3'	139
R488/	5'	140
R489/ K493E	GCCTTCAACGACTGATGCTCGAGAGGTGGCCCTTGAGAATGTGGATAGCTCTCCCTC 3'	
T472S/ R473T/ N474S	5' GTACCTGCGAGCTGTCTACGAGCTCCTTGGCCTTGGTCCC 3'	141
N196A	5' GAAGAATGGATATCTTTGCCGCTTCATCTTTAAAAAATAGAGTTG 3'	169
Q167A	5' GTCATCTACAAAATTAGGAATCGGGTTCAGCTGGAAAATCTCC 3'	170
K163E	5' CTCATAATGGCTTGTCACTACAGAATTAGGAATCAGGTTGAGC 3'	171
K147E	5' GAAAAATAAAATAATCCCTTTGTCAAGCAGGAGAATTAATCACATTAGATCTGTC 3'	172
R145E	5' GAAAAATAAAATAATCCCTTTGTGAGCAGAGAATAATTAATCACATTAG 3'	173
V144A	5' CAGAAAATAAAATAATCCCTTTGCAAGCAGAGAATAATTAATCACATTAG 3'	174
N140A	5' CCAACTCAATCCAGAAAATAAAGCTAATCCCTTTGTCAAGCAGAGAAG 3'	175
D116R	5' CAATGAGCTATCTCAACTTCTCGTAAACCTTTGCCCTCTGAC 3'	176
D536K	5' GTCITGAGAACTAGAAATCTCAAGTTGCGAGCATAACAACCTAGCAC 3'	177
D536A	5' CTTGAGAACTAGAAATCTCGCATGCGAGCATAACAACCTAGCAC 3'	178
K619E	5' CTAAAGTCATTGAACCTTCAGGCGAATCTCATAACATCCGTTGAG 3'	179
K619A	5' CTCTAAGTCATTGAACCTTCAGGCGAATCTCATAACATCCGTTGAG 3'	180
E570R	5' CCACATCCCTTAACTTGAGTCCACGCGCTTTGACGAG 3'	181
N541A	5' GAAATCTCGATTGCGAGCATAACGCTTTCAGCAGGCTCTGGAAAC 3'	182
Q538A	5' GAGAACTAGAAAATCTCGATTGCGCATAACAACCTAGCACGGC 3'	183
H539E	5' CTAGAAAATCTCGATTGCGAGAAAACAACCTAGCACGGCTCTG 3'	184
H539A	5' CTAGAAAATCTCGATTGCGAGGCTAACAACCTAGCACGGCTCTG 3'	185
N517A	5' CATCTGGATCTAAGCAACAACGCCATAGCCAAATAAATGATGAC 3'	186
Y465A	5' GAAAAATATTTCGAAATCTATCTTCCGCCAACAGTACCTGCAGCTGAC 3'	187
R488E	5' GCCTTCAACGACTGATGCTCGAAGGGTGGCCCTTAAAAATG 3'	188
R489E	5' CTTCAACGACTGATGCTCCGAGAGGTGGCCCTTAAAAATGTTGG 3'	189
K467E	5' CGAAATCTATCTTCCCTACAACGAGTACCTGCAGCTGACTAG 3'	190

На следующий день планшеты промывали и добавляли меченые MSD Sulfo-tag mAb 15EVQ в концентрациях от 500 до 1 nM на 1,5 ч. После промывки для обнаружения меченых антител использовали буфер MSD Read Buffer T и измеряли планшеты на приборе SECTOR Imager 6000. Для оценки активности связывания mAb 12QVQ/QSV с человеческим TLR3 и его вариантами осуществляли совместную экспрессию с mAb 15EVQ, оценивали связывание с помощью ИФА, как было описано для mAb 15EVQ, но детектирующие антитела метили mAb 12QVQ/QSV.

mAb 12QVQ/QSV. Как было определено в исследованиях с заменой сегмента, участок связывания с mAb 12QVQ/QSV располагался в пределах аминокислотной последовательности 1-209 человеческого TLR3. Были проанализированы следующие TLR3 мутанты: D116R, N196A, N140A, V144A, K145E, K147E, K163E и Q167A. TLR3 дикого типа и мутант V144A связывались с mAb 12QVQ/QSV с приблизительно одинаковой активностью (фиг. 6А). Антитело не связывалось с мутантным TLR3 D116R, и аффинность связывания с мутантом K145E была значительно меньше. Таким образом, было определено, что близко стоящие остатки D116 и K145 на поверхности TLR3 являются ключевыми фрагментами эпитопа для mAb 12QVQ/QSV (фиг. 7А).

Два критических остатка mAb 12QVQ/QSV, связывающиеся с эпитопом, располагались вблизи поверхности участка связывания двухцепочечной РНК на N-конце эктодомена TLR3 (Pirher et al., Nature Struct. & Mol. Biol., 15:761-763, 2008). В состав полного эпитопа будут входить и другие остатки, относящиеся к соседним участкам, не выявленные мутационным анализом. Не вдаваясь в конкретную теорию, считается, что связывание mAb 12QVQ/QSV с соответствующим эпитопом на TLR3 может прямо или косвенно препятствовать связыванию двухцепочечной РНК с эктодоменом TLR3, из-за чего нарушается димеризация рецептора и активация следующих сигнальных путей.

mAb 15EVQ. Анализ подвержли следующие мутанты TLR3: R64E, K182E, K416E, Y465A, K467E, R488E, R489E, N517A, D536A, D536K, Q538A, H539A, H539E, N541A, E570R, K619A, K619E, двойной мутант K467E/Y468A, тройной мутант T472S/R473T/N474S и тройной мутант R488E/R489E/K493E. TLR3 дикого типа, мутанты R64E, K182E, K416E и тройной мутант T472S/R473T/N474S продемонстрировали сопоставимую активность связывания с mAb 15EVQ (фиг. 6В и табл. 5b). Антитело не связывается с мутантами TLR3 K467E, R489E, K467E/Y468A и R488E/R489E/K493E (фиг. 6В и 6С). У остальных вариантов белка активность связывания была средней в сравнении с наибольшей активностью R488E. Все эти мутанты связываются с mAb 12QVQ/QSV. Эти результаты говорят о том, что остатки K467 и R489 были критическими детерминантами эпитопа mAb 15EVQ. Остаток R488 также является частью эпитопа. Эти остатки находились близко друг от друга на той же поверхности TLR3 (фиг. 7А). Полученные результаты продемонстрировали также, что остатки

Y465, Y468, N517, D536, Q538, H539, N541, E570 и K619, расположенные на той же поверхности, что и K467, R488 и R489, также являются частью эпитопа. Этот вывод был в дальнейшем подкреплен исследованиями по замене H/D в mAb 15EVQ. На фиг. 7A показаны участки связывания эпитопа mAbs 12QVQ/QSV и 15EVQ (черным) и C1068 mAb (серым), наложенные на структуру человеческого TLR3. Эпитоп для mAb 15EVQ охватывает остатки Y465, K467, Y468, R488, R489, N517, D536, Q538, H539, N541, E570 и K619.

Исследования с заменой H/D. При замене H/D методики, используемые для анализа возмущений антителами, были аналогичны описанным ранее (Hamuro et al., J. Biomol. Techniques 14:171-182, 2003; Horn et al., Biochemistry 45:8488-8498, 2006) с некоторыми модификациями. Рекомбинантный TLR3 ECD (экспрессированный из клеток Sf9 с гистиридиновым хвостом на C-конце и очищенный) инкубировали в растворе на основе дейтерированной воды в течение указанного периода времени, при этом в него внедрялся дейтерий, замещающий атомы водорода. Дейтерированный TLR3 ECD отделяли на колонке, содержащей иммобилизованные mAb 15EVQ, и промывали буферным водным раствором. Затем белок TLR3 ECD элюировали с колонки и - после обработки протеазами - определяли местоположение дейтерий-содержащих фрагментов с помощью масс-спектрометрического анализа. Используемый в качестве эталона образец TLR3 ECD был обработан тем же способом, но с дейтерированной водой его выдерживали после иммобилизации на колонке с антителами, а затем промывали и элюировали так же, как экспериментальный образец. Предполагалось, что областями, связанными с антителом, являются участки, относительно защищенные от обмена дейтерия на водород и, следовательно, содержащие больше дейтерия, эталонный образец TLR3 ECD. Около 80% белка можно было картировать относительно специфических пептидов. Карты замен H/D при возмущении TLR3 ECD антителами mAb 15EVQ показаны на фиг. 7B. Для ясности изображен только сегмент TLR3 вблизи участка, подвергнувшегося воздействию mAb 15EVQ. Оставшиеся части белка TLR3 ECD дальше к N- и C-концу практически не были затронуты.

В исследованиях с заменой H/D были идентифицированы пептидные сегменты ⁴⁶⁵YNKYLQL₄₇₁, ⁵¹⁴SNNNIANINDDM₅₂₆ и ⁵²⁹LEKL₅₃₂ SEQ ID NO: 2, которые являлись участками, где TLR3 особенно сильно изменился при связывании с mAb 15EVQ. По своей природе замена H/D является способом линейного картирования, и обычно с помощью этого способа нельзя определить, какие остатки пептидного сегмента в большей степени затронуты связыванием антитела. Однако значительное совпадение результатов исследований с заменой и мутациями дает дополнительные доказательства того, что показанная на фиг. 7A поверхность является участком связывания mAb 15EVQ. Этот участок связывания находится в том же участке последовательности аминокислот, что и участок, описанный выше для mAb c1068 (публикация PCT No. WO 06/060513A2), но который был обнаружен на неперекрывающейся поверхности (фиг. 7A), что согласуется с данными об отсутствии перекрестной конкуренции между этими антителами.

Эпитоп, с которым связывается mAb 15EVQ, располагается проксимальнее участка связывания двухцепочечной ДНК на C-конце TLR3 (Bell et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 103:8792-8797, 2006; Ranjith-Kumar et al., J Biol Chem, 282:7668-7678, 2007; Liu et al., Science, 320:379-381, 2008). Без связи с какой-либо теорией считается, что при связывании mAb 15EVQ с его эпитопом TLR3 возникает стерическое столкновение с молекулой лиганда двухцепочечной РНК и/или с димером-партнером, то есть становятся невозможными связывание лиганда и лиганд-индуцированная димеризация рецептора.

Таблица 5b

Вариант	mAb15	Вариант	mAb12
wt TLR3 ECD	+++	wt TLR3 ECD	+++
R64E	+++	D116R	-
K182E	+++	N140A	++
K416E	+++	V144A	+++
Y465A	++	K145E	+
K467E	-	K147E	++
R488E	+	K163E	++
R489E	-	Q167A	++
N517A	++	N196A	++
D536K	++		
D536A	++		
Q538A	++		
H539E	++		
H539A	++		
N541A	++		
E570R	++		
K619E	++		
K619A	++		
K467E/Y468A	-		
R488/R489/K493E	-		
T472S/R473T/N474S	+++		

Пример 7

Синтез вариантов с повышенной термостабильностью

Для создания вариантов антител с повышенной термостабильностью и с одновременным сохранением биологической активности и минимизацией иммуногенности применялись способы структурной инженерии.

Для инженерии выбрали mAb 15EVQ. С целью минимизации иммуногенности вызывали мутации только гаметического типа, которые, на основании данных о структуре, могли быть полезными. В результате поиска BLAST установили, что человеческим генам гаметического типа соответствовали VL и VH последовательности mAb 15EVQ (SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 216 соответственно). Наиболее близкородственными последовательностями гаметического типа были последовательности GenBank Acc. № AAC09093 и X59318 для VH и VL соответственно. Между VH и VL гаметического типа и VH и VL последовательностями mAb 15EVQ были обнаружены следующие отличия: (VH) V34I, G35S, F50R, A61S и Q67H; (VL) G30S, L31S и A34N. Выявленные отличия в последовательности нанесли на карту кристаллической структуры mAb 15EVQ и выбрали для инженерии те остатки, которые предположительно могли изменить упаковку и интерфейс взаимодействия. Остатки идентифицировали на основании кристаллической структуры антитела (см. пример 6). (1) В сердцевине VH вблизи V34 была обнаружена небольшая ограниченная полость. Эта полость была достаточно велика, чтобы вместить немного боковую цепь, например, Пе. (2) E99 в VH CDR3 был погружен в поверхность соприкосновения VH/VL без сети водородных связей. Отрицательно заряженная карбоксилатная группа E99 в практически гидрофобном окружении была связана с соседними остатками преимущественно вандерваальсовыми (вдв) связями. Погружение заряженной группы обычно является энергетически невыгодным и оказывает дестабилизирующее действие. (3) F50 VH - это остаток в составе VH/VL интерфейса. У него объемистая ароматическая боковая цепь, которая может, таким образом, отрицательно влиять на процесс конъюгации. Образование водородных связей и вдв в Fv были просчитаны и визуальны проверены в Rymol (www://_rymol_org). Погруженные полости в VH и VL доменах были просчитаны с помощью программы Caver (Petrek et al., BMC Bioinformatics, 7:316, 2006). Вся молекулярная графика создавалась в Rymol. Мутации в векторах экспрессии, кодирующих фрагменты Fab или IgG4 полностью человеческих антител, созданных в соответствии с методикой, описанной в примере 3, вносили с использованием стандартных способов клонирования с помощью набора для сайт-направленного мутагенеза Quick Change II XL (Stratagene, Сан-Диего, Калифорния), Change-IT Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit (USB Corporation, Кливленд, Огайо) или набора для сайт-направленного мутагенеза Quick Change II (Stratagene, Сан-Диего, Калифорния). Реакции проводили в соответствии с рекомендациями соответствующего производителя. Полученные клоны секвенировали для подтверждения, и полученные искусственные варианты обозначали как mAbs 15-1 - 15-10 в соответствии с модифицированной легкой или тяжелой цепью. Каждый вариант цепи (H или L) экспрессировался с диким типом L или H цепи mAb 15EVQ для получения антител mAb 15-10, за исключением того, что тяжелая цепь для mAb 1501- была из mAb 15-6. Список SEQ ID NO: относительно CDR, вариабельные области легкой и тяжелой цепей и полная длина тяжелой и легкой цепей mAb 15EVQ и их искусственных вариантов показаны в табл. 6. В табл. 7 показаны праймеры для получения каждого варианта.

Таблица 6

Кандидат №:	SEQ ID NO:									
	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3	LV	HV	Тяжелая IgG4	Легкая цепь
15	111	112	84	109	110	113	41	216	220	156
15-1	111	114	84	109	110	113	41	124	130	156
15-2	115	112	84	109	110	113	41	125	131	156
15-3	116	112	84	109	110	113	41	126	132	156
15-4	111	117	84	109	110	113	41	127	133	156
15-5	116	118	84	109	110	113	41	128	134	156
15-6	116	112	119	109	110	113	41	129	135	156
15-7	111	112	84	120	110	113	122	42	102	157
15-8	111	112	84	121	110	113	123	42	102	158
15-9	116	118	119	109	110	113	41	159	160	156
15-10	116	112	119	109	110	226	225	129	135	227

Связывание mAb 15-1 - 15-9 с TLR3 количественно оценивали с помощью ИФА. ECD человеческого TLR3 (100 мкл TLR3-ECD при концентрации 2 мкг/мл) иммобилизовали на черных планшетах Maxisorb (eBioscience) в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали и блокировали, растворенные антитела наносили порциями по 50 мкл в каждую лунку по два раза. Осторожно встряхивая, планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Связывание обнаруживали с помощью люминесцентного субстрата POD (Roche Applied Science, Маннхейм, Германия, кат. № 11582950001) и козьих античеловеческих Fc:HRP (Jackson ImmunoResearch, Вест Гроув, Пенсильвания, кат. № 109-035-098), планшет помещали в планшетный фотометр SpectraMax (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния) и проводили анализ.

Эксперименты с дифференциальной сканирующей калориметрией (ДСК) проводили на MicroCal's Auto VP-капиллярной системе для ДСК (MicroCal, LLC, Нортгемптон, Массачусетс), в которой температурные различия между эталонными и опытными лунками непрерывно измерялись и калибровались по блокам пита-

ния. Образцы нагревали с 10 до 95°C со скоростью нагрева 60°C/ч. Время до сканирования составляло 15 мин, период фильтрования 10 с. Концентрация при ДСК-экспериментах составляла приблизительно 0,5 мг/мл. Анализ полученных термограмм проводили с помощью программного обеспечения MicroCal Origin 7 (MicroCal, LLC).

Таблица 7

Кандидат №:	Мутанты	Праймеры	SEQ ID NO:
15-1	HC: F50R	GCCTGGAGTGGATGGGCGGATGACCCAGCG	142
		CGCTGGGGTGGATCCGGCCATCCATCCAGGC	143
15-2	HC: V34I	AGAGGTAACCTCCGTTGCGG	144
		GCATCTGGCGCACCCAGCCGATCCAGTAGTTGGTGAAG	145
15-3	HC: V34I/G35S	AGAGGTAACCTCCGTTGCGG	146
		GCATCTGGCGCACCCAGCTGATCCAGTAGTTGGTGAAG	147
15-4	HC: A61S/Q67H	AGAGGTAACCTCCGTTGCGG	144
		CGCTGATGGTCACTGGCCCTGGAAAGCTAGGGCTGATTTGGTGTAG	148
15-5	F50R/V34I/ G35S/ A61S/Q67H	CTTACCACTACTGGATCAGCTGGGTGGCCAGATGC	149
		CGCTGATGGTCACTGGCCCTGGAAAGCTAGGGCTGATTTGGTGTAG	148
15-6	HC: V34I/G35S/ E99Q	CGCCATGTACTACTGGCCCGCCAGCTGIACCAGGGCTAC	150
		GTAGCCCTGGTACAGCTGGCGGGCCAGTAGTACATGGCG	151
15-7	LC: G30S/L31S	GCCAGCCAGAGCATCAGCAGTACCTGGCCITGGTACCAGC	152
		GCTGTACCAGGCCAGGTAGCTGATGCTCTGGCTGGC	153
15-8	LC: A34N	AGAGGTAACCTCCGTTGCGG	144
		CGGGCTTCTGCTGGTACCAGTTCAGGTAGCTGATGCTCTG	154
15-9	HC: F50R/V34I/ G35S/ /A61S/Q67H/ E99Q	CGCCATGTACTACTGGCCCGCCAGCTGIACCAGGGCTAC	150
		GTAGCCCTGGTACAGCTGGCGGGCCAGTAGTACATGGCG	151
15-10	LC: S95P	CAGGGCAACACCCCTGCCCTACACCTTCGGCCAG	228
		CTGGCCGAAGGTGTAGGGCAGGGTGTGCCCTG	229

Термостабильность (Tm) созданных вариантов измеряли с помощью ДСК (табл. 8). Связывание вариантов антител с TLR3 было сопоставимым со связыванием исходного антитела.

Таблица 8. Краткий обзор температур плавления (Tm) вариантов и обоснование для их получения

Кандидат №:	Мутации	Обоснование	Tm (°C)	ΔTm (°C)
15EVQ	WT		64,7	0
15-1	NV F50R	поверхность соприкосновения VH/VL	69,3	4,6
15-2	NV V34I	упаковка ядра VH	66,9	2,2
15-3	NV V34I/G35S	водородная связь, упаковка ядра VH	71,2	6,5
15-4	NV A61S/Q67H	Упаковка VH/VL, поверхностный заряд VH	65,4	0,7
15-5	NV F50R/V34I/ G35S/ A61S/Q67H	Поверхность соприкосновения VH/VL, водородные связи, сердцевина VH	76,2	11,5
15-6	NV V34I/G34S/ E99Q	Водородные связи, упаковка сердцевини VH, удаление	75	10,3
15-7	LV G30S/L31S	поверхностные полярные остатки L-CDR1	63,1	-1,6
15-8	LV A34N	взаимодействие VL/VH	64	-0,7
15-9	NV F50R/V34I/ G35S/ A61S/Q67H/ E99Q	Поверхность соприкосновения VH/VL, водородные связи, сердцевина VH	76	11,3
15-10	LV S95P	Стабилизация канонической структуры	76,6	11,9

Пример 8

Создание суррогатного антитела против TLR3

Было получено химерное антагонистическое крысиное/мышинное антитело против мышинных TLR3, называемой здесь mAb 5429, для изучения эффектов ингибирования сигнального пути TLR3 *in vivo*, поскольку гуманизированные антитела, полученные в примере 1, не обладали достаточной специфичностью или антагонистической активностью в отношении мышинного TLR3. Суррогатное химерное mAb 5429, как и родительское крысиное антитело к мышинному TLR3 c1811, подавляло сигнальный путь TLR3 *in vitro* и *in vivo* и облегчало патогенные механизмы при нескольких экспериментально индуцированных заболеваниях у мышей.

Данные, которые обсуждаются ниже, наводят на мысль о роли TLR3 в индукции и поддержании патологического воспаления и частично обосновывают терапевтическое применение антагонистов TLR3 и антител-антагонистов TLR3, например, при острых и хронических воспалительных заболеваниях, в том числе при гиперцитокинемии, астме и воспалении дыхательных путей, воспалительных заболеваниях пищеварительного тракта и ревматоидном артрите, вирусных инфекциях и сахарном диабете II типа.

Создание суррогатного mAb 5429

CD крыс иммунизировали рекомбинантным мышинным эктодоменом TLR3 (аминокислоты 1-703 SEQ ID NO: 162, GenBank Acc. No. NP_569054), созданным обычными способами. Лимфоциты двух крыс, демонстрировавшие титры антител, специфичных к мышинному TLR3, сливали с FO миеломными клетками. Идентифицировали ряд моноклональных антител, реагирующих с мышинным TLR3, и проверили их эффективность в качестве антагонистов *in vitro* путем количественных измерений с мышинным люциферазным репортером и мышинными эмбриональными фибробластами. Для дальнейшей работы выбрали гибридную линию C1811A. Функциональные гены варибельного участка mAb c1811, секвенируемого гибридомой, секвенировали. Затем клонированные гены варибельных участков тяжелой и легкой цепи вставляли в плазмидные векторы экспрессии, что позволило получить кодирующие последовательности для создания химерного Rat/Balb C muIgG1/ mAb, созданного как и mAb 5429, с помощью рутинных методов. Антитела экспрессировались, как описано в примере 3. Аминокислотные последовательности варибельных участков тяжелой и легкой цепей mAb 5429 показаны соответственно в SEQ ID NO:164 и SEQ ID NO: 163, а полные последовательности тяжелой и легкой цепей показаны в SEQ ID NO:166 и SEQ ID NO: 165 соответственно. Полные последовательности тяжелой и легкой цепей mAb c1811 показаны соответственно в SEQ ID NO: 168 и SEQ ID NO: 167.

Характеристика mAb 5429

Способность mAb 5429 к нейтрализации сигналов TLR3 охарактеризовали в ходе анализов *in vitro*. Анализ и результаты активности описываются ниже.

Анализ мышинового люциферазного гена-репортера

кДНК мышинового TLR3 (SEQ ID NO: 161, GenBank Acc. No: NM_126166) амплифицировали методом ПЦР из кДНК селезенки мыши (BD Biosciences, Bedford, MA) и клонировали в вектор pCEP4 (Life Technologies, Carlsbad, CA) стандартными методами. 200 мкл Клеток HEK293T вносили в 96-луночные планшеты с белым прозрачным дном при концентрации 4×10^4 клеток на лунку в полной модифицированной среде Игла и на следующий день брали для трансфекции с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) и 30 нг pNF-kB люциферазы светлячка (Stratagene, San Diego, CA) или 30 нг pISRE люциферазы светлячка (BD Biosciences, Bedford, MA), 5 нг phRL-ТК контрольной люциферазы Renilla (Promega Corp., Madison, WI) репортерных плазмид, 1,5 нг CEP4, кодирующий полную длину мышинового TLR3, и 13,5 нг пустого вектора плазмидной ДНК 3.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA) до общего количества ДНК 50 нг/лунку. Через 24 ч после трансфекции клетки инкубировали от 30 мин до 1 ч при 37°C с антителами против мышинового TLR3 в свежей полной бессывороточной среде Игла перед добавлением 0,1 или 1 мкг/мл поли(I:C). Через 24 ч планшеты измеряли с помощью системы для анализа люциферазы Dual-Glo (Promega, Мэдисон, Висконсин). Количество относительных световых единиц измеряли с помощью мультиридера FLUOstar OPTIMA с программным обеспечением OPTIMA (BMG Labtech GmbH, Германия). Нормализованные уровни (люциферазные отношения) получали путем деления относительных световых единиц (RLU) со светлячковыми люциферазами на RLU Renilla. mAb 5429, а также его родительские mAb c1811 и mAb 15 (табл. 3а) уменьшали индуцированную поли(I:C) активацию NF-kB и пропорционально дозе (фиг. 8А и 8В), что доказывает их способность быть антагонистами TLR3. Измеренные в ходе анализа ISRE IC50 составляли соответственно 0,5, 22 и 0,7 мкг/мл для mAb 5429, mAb 15 и mAb c1811 соответственно.

Анализ с использованием мышинных эмбриональных фибробластов (MEF)

Клетки C57BL/6 MEF получили из компании Artis Optimus (Opti-MEF™ C57BL/6 - 0001). Клетки помещали в лунки 96-луночного плоскодонного планшета (BD Falcon) в количестве 20000 клеток/лунку в 200 мкл среды MEF (DMEM с глутамаксом, 10% инактивированных нагреванием FBS, 1× NEAA и 10 мкг/мл гентамицина). Инкубацию во всех случаях проводили при 37°C/5% CO₂. Через 24 ч в лунки планшетов добавляли mAb 5429 или mAb c1811. Планшеты инкубировали с mAb в течение 1 ч, после чего в каждую лунку добавляли поли(I:C) при концентрации 1 мкг/мл. Супернатанты собирали после 24 ч инкубации. Концентрацию цитокинов определяли с помощью набора бусин (Invitrogen Corp., Карлсбад, Калифорния) для обнаружения CXCL10/IP-10 согласно протоколу производителя. Результаты представили в виде графиков, созданных с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Оба антитела уменьшали индуцированные поли(I:C) концентрации CXCL10/IP-10 в зависимости от дозы. Это показывает, что такие антитела могут быть антагонистами эндогенных TLR3 и могут ингибировать сигналы TLR3 (фиг. 9).

Протоочная цитометрия - поверхностное окрашивание

Нокаутные мыши по гену C57BL/6 и TLR3 (TLR3KO) (C57BL/6 фон; самки, 8-12 недель, Ace Animals, Inc.), по 10 животных в группе, получали внутривенно дозу в 1 мл 3% тиогликолевой среды (Sigma), через 96 ч мышей подвергали эвтаназии и брюшину каждой мыши промывали 10 мл стерильного фосфатно-солевого буфера. Извлеченные тиогликолевой средой брюшинные макрофаги ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере, затем оценивали жизнеспособность клеток с помощью окрашивания Трипановым синим. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 250 мкл буфера FACS (ФБР -Ca²⁺-Mg²⁺, содержащий 1% инактивированного нагреванием FBS и 0,09% азида натрия) и хранили

на льду. Для блокирования Fc-рецепторов на макрофагах применяли реагент CD16/32 (eBioscience) в концентрации 10 мкг/10⁶ клеток в течение 10 мин. Клетки в концентрации 10⁶ клеток вносили аликвотами по 100 мкл/лунку для поверхностного окрашивания. Конъюгированные с Alexa-Fluor 647 (молекулярные зонды) mAb c1811 и mAb 1679 (крысиные антитела против мышинного TLR3, не специфичные по отношению к TLR3, используются в качестве изотипического контроля) добавляли в концентрации 0,25 мкг/10⁶ клеток и инкубировали на льду в темноте в течение 30 мин. Клетки промывали и ресуспендировали в 250 мкл буфера FACS. При окрашивании для оценки жизнеспособности 7-AAD (BD Biosciences, Bedford, MA) добавляли в концентрации 5 мкл/лунку не более чем за 30 мин до исследования образцов на FACS Calibur, что позволяло выявить мертвые клетки. Образцы собирали с помощью FACS Calibur, применяя программное обеспечение Cell Quest Pro. Для анализа собранных данных путем построения гистограмм применяли FCS Express.

Связывание mAb c1811 с мышинными брюшинными макрофагами (полученными с помощью тиогликолевой среды) из C57BL/6 и TLR3KO мышей оценивали способом проточной цитометрии для оценки специфичности связывания. mAb 5429 при таком количественном определении не использовали, так как мышинный Fc участок этого химерного антитела предположительно участвует в неспецифическом связывании. mAb c1811 не связывался с макрофагами TLR3KO и увеличивал связывание с поверхностью клеток C57BL/6 брюшинных макрофагов, что говорит о специфичности mAb по отношению к TLR3 (фиг. 10). mAb 5429 с теми же участками связывания, что и у mAb c1811, предположительно обладает такой же специфичностью при связывании, как и mAb c1811.

Пример 9

Антитела-антагонисты TLR3 защищают от опосредованного TLR3 системного воспаления

Модель

В качестве модели опосредованного TLR3 системного воспаления использовали индуцированную поли(I:C) системную цитокин/хемокиновую модель. В этой модели поли(I:C) (PIC), введенный внутрибрюшинно, индуцировал системные цитокиновый и хемокиновый ответы, которые были частично опосредованы TLR3.

Самки мышей C57BL/6 (8-10-недельные) или самки мышей TLR3KO (C57BL/6 фон; 8-10-недельные, Ace Animals, Inc.) получали подкожно: mAb 5429 в концентрации 10, 20 или мг/кг в 0,5 мл фосфатно-солевого буфера, mAb c1811 - в концентрации 2, 10 или 20 мг/кг в 0,5 мл ФСБ или 0,5 мл ФСБ (контроль с помощью среды). Через 24 ч после введения дозы антител мышам вводили внутрибрюшинно по 50 мкг поли(I:C) (Amersham кат. No. 26-4732 партия № ИН0156) в 0,1 мл ФСБ. Кровь из глазной орбиты собирали через 1 и 4 ч после инъекции поли(I:C). Сыворотку получали из цельной крови и определяли в ней концентрации цитокина и хемокина с помощью Lumiplex.

Результаты

Поли (I:C) при внутрибрюшинном введении индуцировал системный цитокиновый и хемокиновый ответ, который был частично опосредован TLR3, как было доказано по значительно уменьшившемуся синтезу ряда цитокинов и хемокинов у животных TLR3KO (табл. 9А). Зависимыми от TLR3 индуцированными поли(I:C) медиаторами служили IL-6, KC, CCL2/MCP-1 и TNF-α через 1 ч после инъекции поли(I:C) и IL-1, CCL5/RANTES и TNF-α через 4 ч после инъекции поли(I:C). Как mAb c1811, так и mAb 5429 значительно снижали концентрации этих TLR3-зависимых медиаторов, что доказывает способность антител уменьшать количество сигналов с TLR3 in vivo (табл. 9В). В табл. 9 указаны средние концентрации цитокина и хемокина (пг/мл) у шести животных на группу ± станд. ошибка среднего. Полученные данные наводят на мысль, что антагонисты TLR3 могут найти применение для снижения избыточных концентраций опосредованных TLR3 цитокинов и хемокинов при таких состояниях, как "цитокиновая буря" или смертельный шок.

Таблица 9А

	C57BL/6		TLR3KO	
PIC	-	+	-	+
mAb 5429 (mg/kg)	-	-	-	-
mAb c1811 (mg/kg)	-	-	-	-
1 ч обработка PIC				
TNFα	6,005±0,32	319,4±34,1*	9,13±4,41	43,80±10,13**
KC	129,3±9,83	2357±491,5*	152,0±21,34	432,3±90,66**
IL-6	40,91±5,66	5317±856,7*	120,1±99,99	1214±294,9**
MCP-1	84,67±18,45	694,6±127,8*	67,85±34,16	249,9±55,60**
4 ч обработка PIC				
IL-1α	28,21±17,78	796,7±45,0*	13,94±13,84	408,5±29,91**
RANTES	20,87±1,738	4511±783,4*	36,01±4,484	706,3±84,36**
TNFα	0,10±0	561,7±81,84*	3,215±3,115	305,8±53,63**

*p<0,001 Однофакторный дисперсионный анализ для C57BL/6 ФБР

**p<0,001 Однофакторный дисперсионный анализ для C57BL/6 PIC

	C57BL/6					
PTC	+	+	+	+	+	+
mAb 5429 (mg/kg)	50	20	10		-	
mAb c1811 (mg/kg)	-	-	-	20	10	2
1 ч обработка PTC						
TNF- α	29,33 \pm 3,78***	31,05 \pm 1,59***	59,55 \pm 12,71***	32,54 \pm 3,89***	42,22 \pm 7,04***	42,61 \pm 10,58***
KC	466,3 \pm 92,35***	440,3 \pm 10,01***	744,6 \pm 103,1**	637,3 \pm 151,0***	944,2 \pm 130,9**	919,3 \pm 231,2**
IL-6	480,2 \pm 62,88***	375,9 \pm 46,14***	705,2 \pm 149,8***	739,2 \pm 113,3***	1047 \pm 222***	1229 \pm 378,4***
MCP-1	168,5 \pm 15,04**	321,6 \pm 206,7	219,2 \pm 70,58*	184,0 \pm 14,92**	278,3 \pm 53,57	414,9 \pm 97,17
4 ч обработка PTC						
IL-1 α	343,0 \pm 33,01***	452,6 \pm 94,86**	481,1 \pm 121,0*	354,8 \pm 45,43***	351,7 \pm 68,85***	352,4 \pm 39,60***
RANTES	1381 \pm 169,7***	2439 \pm 308,7**	1601 \pm 398,9***	1303 \pm 168,0***	1365 \pm 474,1***	2209 \pm 402,5**
TNF- α	100,1 \pm 8,5***	205,1 \pm 41,85***	226,1 \pm 64,72***	138,9 \pm 26,0***	121,6 \pm 38,85***	223,8 \pm 47,74***

***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05: Статистические данные однофакторного дисперсионного анализа сравнивали с группой C57BL/6 + PTC

Пример 10

Антитела-антагонисты TLR3 снижают гиперчувствительность дыхательных путей

Модель

Гиперчувствительность дыхательных путей индуцировали поли(I:C).

Самок мышей C57BL/6 (12-недельных) или самок мышей TLR3KO (C57BL/6 фон; 12-недельные, Ace Animals, Inc.) анестезировали изофлураном и вводили им интраназально несколько доз (10-100 мкг) поли(I:C) в 50 мкл стерильного ФСБ. Мышам трижды вводили поли(I:C) (или ФСБ) с 24-часовым периодом отдыха перед каждым введением. Через 24 ч после последнего введения поли(I:C) (или фосфатно-солевого буфера) измеряли функцию легких и гиперреактивность дыхательных путей к метахолину методом плетизмографии всего тела (система BUXCO). Мышей помещали в камеру для плетизмографии всего тела и позволяли привыкнуть к обстановке в течение 5 мин. После определения исходных показателей мышам давали увеличивающиеся дозы распыленного метахолина (Sigma, Сент-Луис, Миссури). Распыляемый метахолин давали в течение 2 мин, затем в течение 5 мин собирали данные, затем делали 10-минутный перерыв перед последующими увеличивающимися дозами метахолина. Измеряли резистентность к увеличению потока воздуха (улучшенный показатель паузы (Penh)) и представляли в виде среднего значения Penh за 5 мин записи (система BUXCO). После измерений легочной функции мышь подвергали эктаназии и канюлировали легкие. Делали инъекцию 1 мл ФСБ в легкие, вытягивали жидкость обратно и получали таким образом смыв с бронхов и легких (БАЛ). Ткани легких вынимали и замораживали. БАЛ центрифугировали (1200 об/мин, 10 мин), собирали бесклеточные супернатанты и хранили при -80°C до момента анализа. Осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл ФСБ для подсчета общего количества клеток и отдельных фракций клеток. Мультиплексный анализ проводили в соответствии с протоколом производителя с помощью набора Multiplex Immunoassay (Millipore, Биллерика, Массачусетс).

Результаты

Предшествующие наблюдения показали, что интраназальное введение поли(I:C) индуцировало опосредованное TLR3 ухудшение функции легких у мышей при одновременном повышении улучшенного показателя паузы (PenH) в ходе плетизмографии всего тела (Buxco) в сравнении с исходным показателем и повышение гиперчувствительности к распыляемому метахолину (индикатору гиперчувствительности дыхательных путей) (публикация PCT No. WO 06/060513A2). Такое ухудшение функции легких связано с притоком нейтрофилов в легкие и увеличением уровней провоспалительных цитокинов/хемокинов в легких. В этом исследовании эффект mAb 1811 и mAb 5429 оценивали при индуцированном поли(I:C) ухудшении функции легких путем подкожного введения каждого из антител в дозе 50 мг/кг перед введением поли(I:C).

Опосредованное TLR3 ухудшение функции легких значительно уменьшалось при введении животным антител-антагонистов TLR3 перед введением поли(I:C). Опосредованное TLR3 повышение исходного PenH и чувствительности дыхательных путей к метахолину удалось предотвратить у животных, которым вводили антитела против TLR3 (фиг. 11). У животных, получивших антитела против TLR3, опосре-

дованный TLR3 приток нейтрофилов в легкие мышей и образование хемокинов в дыхательных путях снижался. Число нейтрофилов (фиг. 12) и уровень CXCL10/IP-10 (фиг. 13) определяли в бронхолегочном смыве. Исследования повторяли по меньшей мере три раза с похожими результатами. Данные, приведенные на фиг. 11-13, получены в одном репрезентативном исследовании. Каждый символ представляет собой один результат по одной мышце, а горизонтальные черточки показывают среднее значение для группы. Исследование показало, что антитела-антагонисты TLR3 при системном введении достигают легких, снижая в используемой модели опосредованное TLR3 ухудшение функции легких, инфильтрацию нейтрофилами дыхательных путей, образование хемокинов и воспаление дыхательных путей. Таким образом, антагонисты TLR3 могут быть полезны при лечении или профилактике респираторных заболеваний, для которых характерна гиперчувствительность дыхательных путей, например, астмы, аллергического ринита, хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ) и муковисцидоза.

Пример 11

Антитела-антагонисты TLR3 защищают от воспалительных заболеваний пищеварительного тракта
Модель

В качестве модели воспалительного заболевания пищеварительного тракта использовали колит, индуцированный ДСН.

Самок мышей C57BL/6 (<8-недельных) или мышей TLR3KO (C57BL/6 фон; <8-недельных, массой от 16,5 до 18 г, Ace Animals, Inc.) кормили кормом, обученным гамма-лучами, начиная с дня -1. ДСН (декстрансульфат) (MP Biomedicals, Aurora, OH, кат. №: 160110; 35-50 кДа; 18-20% серы, лот № 8247J) разводили в автоклавированной подкисленной питьевой воде до конечной концентрации 5%. Воду с декстрансульфатом давали в течение 5 дней, после чего заменяли ее обычной водой. Воду мышам на протяжении всего исследования давали без ограничений. Каждый день все бутылки с водой взвешивали для учета потребления воды. На 0, 2 и 4 день мышам вводили внутривентриально 5 мг/кг (0,1 мг в 0,1 мл ФСБ) mAb 5429, мышинных антител против TNF- α или фосфатно-солевой буфер в качестве контроля. За мышами наблюдали ежедневно на протяжении всего исследования и взвешивали их на 0-4 дни и на 7 день. На 2 и 7 дни исследования мышей подвергали эвтаназии. Брюшную полость мышей вскрывали, восходящую ободочную кишку отрезали в месте соединения со слепой кишкой. Отрезки кишки собирали и фиксировали в 10% нейтральном буферном формалине. Затем отрезки кишки заливали парафином, готовили срезы и окрашивали гематоксилином-эозином (H&E) (Qualtek Molecular Labs, Санта-Барбара, Калифорния). Гистопатологические исследования кишки проводили ветеринарные патологи "слепым" способом, описанным ниже (PathoMetrix, Сан-Хосе, Калифорния).

Гистопатологические исследования

Исследовали два сегмента толстого кишечника, тонкого кишечника и прямой кишки и рассчитывали следующие изменяющиеся показатели: (i) некроз отдельных клеток; (ii) эпителиальные язвы; (iii) отторжение эпителиальных масс; (iv) абсцесс крипт; (v) пролиферацию клеток; (vi) пролиферацию клеток крипт; (vii) образование грануляционной ткани в lamina propria (собственной пластинке слизистой оболочки); (viii) грануляционной ткани в подслизистой оболочке; (ix) инфильтрации подслизистой оболочки воспалительными клетками, преимущественно нейтрофилами; и (x) отек подслизистой оболочки.

Однократно определяли тяжесть состояния на основании следующих стандартных определений:

0 - отсутствуют;

1 - легкие, очаговые или редко встречается;

2 - легкие, множественные очаги;

3 - умеренные, часто встречаются, но на ограниченных участках;

4 - тяжелые, часто встречаются на многих участках или на больших участках соответствующей ткани;

5 - очень тяжелые, на больших участках соответствующей ткани.

Результаты

Предшествующие наблюдения показали, что у животных TLR3KO значительно меньше гистопатологических изменений в сравнении с мышами дикого типа при моделировании воспалительного заболевания пищеварительного тракта, индуцированного приемом ДСН внутрь (публикация PCT No. WO 06/60513A2), что наводит на мысль о том, что сигналы TLR3 играют какую-то роль при патогенезе этой модели. Известно, что РНК условно-патогенных бактерий или РНК млекопитающих, высвобождающаяся из некротических клеток, может быть эндогенным лигандом, стимулирующим сигналы TLR3 (Kariko et al., Immunity 23165-231175 2005; Kariko et al., J. Biol. Chem. 279:12542-12550 2004), и, следовательно, стимуляция эндогенными лигандами TLR3 кишечника может усиливать и закреплять воспаление при колите, индуцированном декстрансульфатом.

Тяжесть заболевания была меньше у получивших ДСН животных при введении им антител против TLR3, судя по суммарным гистопатологическим показателям (фиг. 14). На фиг. 14 в виде горизонтальных линий показаны средние значения, стандартные отклонения и 95% доверительные интервалы параметров, используемых при оценке тяжести заболевания. Значительное ухудшение параметров наблюдалось у животных дикого типа, получивших ДСН, при введении антител против TLR3 ($p < 0,05$) в сравнении с животными дикого типа, не получившими антител. TLR3KO животные, получившие ДСН, были

защищены от индуцированных ДСН заболеваний. У получавших декстрансульфат животных, которым вводили mAb против мышинового TNF- α , отсутствовало улучшение гистопатологических параметров в эксперименте с декстрансульфатом. Следовательно, такая модель может быть полезна при оценке изучаемых терапевтических средств, предназначенных для людей, не отвечающих на терапию анти-TNF- α , а нейтрализующие антитела против TLR3 могут быть полезны пациентам с воспалительными заболеваниями пищеварительного тракта, которые не отвечают на терапию анти-TNF- α .

Модель

В качестве модели воспалительного заболевания пищеварительного тракта использовали модель переноса Т-клеток. При этом у мышей SCID индуцировали воспаление кишечника переносом популяции избежавших Т-супрессоров наивных Т-клеток иммунокомпетентных мышей, которые атаковали антиген-представляющие клетки в слизистой кишечника.

Для индукции хронического колита наивные Т-клетки (CD4+CD45RB Т-клетки) инъецировали внутрибрюшинно реципиентам - мышам SCID. Мышам вводили либо ФСБ (500 мкл/мышь внутрибрюшинно; контроль со средой), mAb 5429 (0,1 мг/мышь внутрибрюшинно), либо антитела против TNF- α (0,05 мг/мышь внутрибрюшинно; положительный контроль), начиная с 48 ч после переноса Т-клеток, а после этого - дважды в неделю на протяжении 8 недель исследования. Через 8 недель после переноса Т-клеток (или когда мышь теряет >15% от начального веса тела) животных подвергали эвтаназии и извлекали кишечник. Кишечник фиксировали, заливали парафином и окрашивали гематоксилином-эозином (H&E). Гистопатологические параметры (инфильтрации клеток, абсцессы крипт, эпителиальные эрозии, потерю бокаловидных клеток и утолщение стенок пищеварительного тракта) количественно оценивали специалисты "слепым" способом.

Результаты

У животных, которым переносили Т-клетки, при лечении антителами против TLR3 тяжесть заболевания уменьшалась, о чем говорит значительное снижение у них сводной гистопатологической оценки в сравнении с контрольными животными ($p < 0,05$) (фиг. 15A). Для получения сводной оценки оценивали абсцессы крипт, язвы, нейтрофильный инфлюкс, потерю бокаловидных клеток, количество ненормальных крипт, воспаление собственной пластинки и вовлечение в процесс нескольких слоев стенки. Наблюдалось значительное уменьшение абсцессов крипт, числа язвенных очагов и нейтрофильных инфлюксов (для всех $p < 0,05$) (фиг. 15B). Антитела против TNF- α в дозах, достоверно обеспечивающих оптимальное улучшение, использовали как положительный контроль.

Исследования с помощью хорошо изученных моделей воспалительных заболеваний пищеварительного тракта (ДСН и перенос Т-клеток) показали, что при системном введении антитела-антагонисты TLR3 достигают слизистой кишечника и уменьшают воспаление пищеварительного тракта, индуцированное двумя разными патогенными механизмами. Таким образом, антагонисты TLR3 могут найти применение при лечении воспалительных заболеваний пищеварительного тракта, в том числе не поддающихся лечению анти-TNF- α , и в других случаях, опосредованных иммунными механизмами патологий пищеварительного тракта.

Пример 12

Антитела-антагонисты TLR3 защищают от коллаген-индуцированного артрита

Модель

Коллаген-индуцированный артрит (КИА) использовали как модель ревматоидного артрита.

Самцов мышей B10RIII (6-8-недельных, Jackson Labs) делили на группы по 15 животных в группе (группы артрита) или по 4 на группу (контрольные животные). Группе артрита под изофлюрановым наркозом вводили коллаген II типа путем инъекции (Elastin Products) и полный адьювант Фрейнда с добавлением *M. tuberculosis* (Difco) на 0 и 15 день. На 12 день мышей с развивающимся из-за коллагена II типа артритом рандомизировали в зависимости от веса тела на опытные группы и вводили им подкожно (п/к) на 12, 17 и 22 (d12, d17, 2d2) дни mAb 5429 (25 мг/кг), в качестве отрицательного контроля - антитело CVAM (рекомбинантное mAb, неспецифичное у мышей) (5 мг/кг) или антитела против TNF- (5 мг/кг, положительный контроль). Контрольным мышам вводили носитель (фосфатно-солевой буфер) или дексаметазон (0,5 мг/кг, Dex, стандартный компонент) подкожно (п/к) раз в сутки на 12-25 дни. За животными наблюдали ежедневно с 12 по 26 день. Осматривали передние и задние лапки для оценки по клинической системе (см. ниже). Животные подвергались эвтаназии на 26 день исследования, их гистопатологические показатели оценивали "слепым" способом (шкала приведена ниже). Исследование эффективности проводили с учетом веса тела животных и оценок по клинической шкале артрита. Все животные выжили к концу исследования.

Критерии клинической оценки дистальных частей передних и задних конечностей

0 - норма;

1 - затронуты суставы задних или передних лапок, или минимальная диффузная эритема и припухлость;

2 - затронуты суставы задних или передних лапок, или легкие диффузная эритема и припухлость;

3 - затронуты суставы задних или передних лапок, или умеренная диффузная эритема и припух-

лость;

4 - заметные диффузная эритема и припухлость, или затронуты суставы 4 пальцев;

5 - тяжелая диффузная эритема и тяжелая припухлость всей лапки, неспособность сгибать пальцы.

Способы гистопатологической оценки суставов мышей при артрите, спровоцированном коллагеном

II типа

При оценке лапок или голеностопных (лучезапястных) суставов у мышей с артритом, спровоцированным коллагеном II типа, учитывается тяжесть изменений, а также число отдельных пораженных заболеванием суставов. При поражении только 1-3 суставов лапы или голеностопных (лучезапястных) суставов без поражения запястных/плюсневых/пальцевых или предплюсневых/тибиотарсальных суставов произвольно оценивали максимальную тяжесть по 1, 2 или 3 параметрам из перечисленных ниже в зависимости от тяжести изменений. Если поражено более 2 суставов, критерии, перечисленные ниже, применяются к наиболее пораженному суставу/большинству суставов.

Клинические данные с целью оценки кистей анализировали с помощью площади под кривой в 1-15 дни и рассчитывали % ингибирования с учетом контрольных показателей.

Оценка

0 - норма;

1 - минимальная инфильтрация воспалительными клетками синовиального слоя и околоуставной ткани пораженных суставов;

2 - легкая инфильтрация, в случае лапок, ограниченность в пораженных суставах;

3 - умеренная инфильтрация с умеренным отеком, в случае лапок, ограниченность движений в пораженных суставах;

4 - заметная инфильтрация в большинстве участков с заметным отеком;

5 - тяжелая диффузная инфильтрация с тяжелым отеком.

Паннус

0 - норма;

1 - минимальная инфильтрация паннуса в хряще и субхондральной кости;

2 - легкая инфильтрация с краевыми зонами деструкции твердых тканей в пораженных суставах;

3 - умеренная инфильтрация с умеренной деструкцией пораженных суставов;

4 - заметная инфильтрация с заметной деструкцией архитектуры сустава в большинстве суставов;

5 - тяжелая инфильтрация и тотальная или почти тотальная деструкция архитектуры сустава, поражены все суставы.

Повреждения хряща

0 - норма;

1 - минимальная или небольшая потеря окраски толуидиновым синим в отсутствие явной потери хондроцитов или разрыва коллагена в пораженных суставах;

2 - небольшая потеря окраски толуидиновым синим с очаговой легкой (поверхностной) потерей хондроцитов и/или разрывами коллагена в пораженных суставах;

3 - умеренная потеря окраски толуидиновым синим и многоочаговой умеренной (глубокой в средней зоне) потерей хондроцитов и/или разрушением коллагена в пораженных суставах;

4 - заметная потеря окраски толуидиновым синим с многоочаговой заметной (глубокой в глубокой зоне) потерей хондроцитов и/или разрушением коллагена в большинстве суставов;

5 - сильная потеря окраски толуидиновым синим с многоочаговой выраженной (от глубокой до крайней) потерей хондроцитов и/или разрушением коллагена во всех суставах.

Резорбция кости

0 - норма;

1 - минимальная с маленькими участками резорбции, не явно выраженная при малом увеличении, редкие остеокласты в пораженных суставах;

2 - легкая с более многочисленными участками резорбции, не явно выраженная при малом увеличении, более многочисленные остеокласты в пораженных суставах;

3 - умеренная с заметной резорбцией медуллярной трабекулярной и кортикальной кости без распространяющихся на весь кортекс дефектов, потеря некоторых медуллярных трабекул, явные повреждения при малом увеличении, более многочисленные остеокласты в пораженных суставах;

4 - заметные распространяющиеся на все корковое вещество дефекты, часто с искаженным профилем остальной кортикальной поверхности, с заметной потерей медуллярной кости, многочисленными остеокластами, поражено большинство суставов;

5 - тяжелые распространяющиеся на все корковое вещество дефекты и разрушение архитектуры всех суставов.

Результаты

Дексаметазон (Dex) и антитела против мышинового TNF- α использовали как положительный контроль, фосфатно-солевой буфер использовали как контроль среды, а CVAM использовали как отрицательный контроль антител. Все виды терапии начинались на 12 день исследования при развитии заболевания суставов. Заболеваемость в контрольной группе, получавшей носитель, достигла 100% к 22 дню. У

групп отрицательного контроля, получавших антитела CVAM или носитель, были самые высокие оценки по системе клинической оценки. Значительное снижение клинической оценки наблюдалось в группах, получавших Dex ($p < 0,05$ для 18-26 дней), 5 мг/кг антител к TNF- α ($p < 0,05$, дни 18-26) или 25 мг/кг mAb 5429 ($p < 0,05$, дни 18-23 и 25-26) (фиг. 16). Клиническая оценка тяжести артрита, выраженная как площадь под кривой (AUC), значительно снижалась при применении 25 мг/кг mAb 5429 (43% снижение), 5 мг/кг антител к TNF- α (52%) или дексаметазона (69%) по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель. На фиг. 17 показаны средние и стандартные отклонения AUC для каждой группы.

Также оценивались гистопатологические эффекты разных препаратов. Резорбция костей кистей значительно снижалась при введении 25 мг/кг mAb 5429 (снижение на 47%) в сравнении с контролем при введении среды. У мышей из группы положительного контроля, получивших 5 мг/кг антител против TNF- α , значительно уменьшалось воспаление суставов лап (33%), повреждение хрящей (38%) и снижалась сводная оценка суставов лап (37%). Введение Dex значительно уменьшило все гистопатологические параметры суставов лап (73%-е снижение сводных оценок).

Эти данные демонстрируют, что антитела-антагонисты TLR3 облегчают симптомы клинических и гистопатологических заболеваний в модели КИА, что наводит на мысль о возможности применения антагонистов TLR3 для лечения ревматоидного артрита.

Пример 14

Антитела-антагонисты TLR3 защищают от острых летальных вирусных инфекций

Модель

Экспериментальное заражение вирусом гриппа А использовали в качестве модели острой летальной вирусной инфекции.

На -1, 4, 8 и 12 дни самки мышей C57BL/6 (12-недельные) или самки мышей TLR3KO (C57BL/6 фон; 12-недельные, ACE Animals, inc., по 15 мышей в группе) получали подкожно mAb 5429 в дозе 20 мг/кг или только ФСБ. На 0 день мышей подвергали анестезии изофлураном и вводили интраназально вирус гриппа A/PR/8/34 (ATCC, Рокленд, Мэриленд, партия № 218171) в 25 мкл ФБР (эквивалент $10^{5,55}$ CEID50). Животных в течение 14 дней осматривали дважды в день: измеряли вес тела и проверяли выживаемость. Для оценки прогрессирования заболевания и небольших улучшений в ответ на обработку вирусом гриппа А использовали шкалу клинической оценки.

Шкала клинической оценки

- 0 - нормальные, живые и реагирующие животные, без видимых признаков заболевания;
- 1 - взъерошенная шерсть, обычная или слегка уменьшенная подвижность;
- 2 - взъерошенная шерсть, сгорбленная поза при ходьбе, животное неохотно двигается, затрудненное дыхание;
- 3 - взъерошенная шерсть, затрудненное дыхание, неподвижность, тремор;
- 4 - взъерошенная шерсть, животное неспособно ходить даже при небольшом подталкивании, потеря сознания, холодное тело при прикосновении;
- 5 - смерть.

Результаты

В рамках исследования оценивали выживаемость, ежедневно определяли оценку по шкале клинической оценки и регистрировали изменения веса. Инфицированным гриппом А мышам в группе WT вводили mAb 5429 (20 мг/кг), тогда как инфицированные мыши в группе А TLR3KO не получали mAb 5429. При этом в обеих группах обнаружено статистически значимое увеличение выживаемости ($p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно) в сравнении с инфицированными вирусом гриппа мышами C57BL/6, что указывает на возможность профилактики гибели от гриппа с помощью антагонистов TLR3 или путем создания дефицита TLR3 (фиг. 18). Оценка по шкале клинической оценки была значительно ниже в группе, получавшей 20 мг/кг mAb 5429, а также в группе TLR3KO (фиг. 19). Вес мышей оценивали в течение 14 дней после введения вируса гриппа. У мышей C57BL/6, получивших дозу вируса гриппа А, вес неизменно снижался. Однако, и у мышей C57BL/6, получавших 20 мг/кг mAb 5429, и у мышей TLR3KO вес тела был значительно больше, чем у мышей WT C57BL/6, зараженных вирусом гриппа (фиг. 20). Полученные результаты показывают, что при моделировании острой летальной вирусной инфекции антитела-антагонисты TLR3 уменьшают тяжесть клинических симптомов и смертность и наводят на мысль о применении антагонистов TLR3 в качестве средства профилактики у людей с острыми инфекциями.

Пример 15

Антитела-антагонисты TLR3 улучшают течение гипергликемии и снижают уровень инсулина в плазме крови

Модель

Моделирование алиментарного ожирения использовали в качестве модели гипергликемии с инсулинорезистентностью и ожирением.

Животных C57BL/6 WT (приблизительно 3-недельных, Jackson Labs) и животных TLR3KO (C57BL/6 фон; приблизительно 3-недельных, Ace Animals, Inc.) содержали на диете с высоким содержанием жиров в течение 12-16 недель. Как мыши TLR3KO, так и мыши WT C57BL/6 получали либо нор-

мальную пищу, либо пищу с высоким содержанием жиров (Purina TestDiet кат. № 58126), содержащую 60,9% ккал жиров и 20,8% ккал углеводов. Цикл день:ночь составлял 12:12 ч, воду и пищу мыши получали без ограничений. Вес каждой мыши в каждой из групп измеряли еженедельно. mAb 5429 вводили внутривентриально дважды в неделю в течение первой недели, затем один раз в неделю в течение 7 недель. Для измерений концентраций инсулина в указанные сроки использовали сыворотку из образцов крови из глазницы. Проверку переносимости глюкозы проводили через 7 недель путем внутривентриального введения глюкозы в дозе 1,0 мг/г веса тела после ночи натощак. Кроме того, измеряли инсулин и глюкозу натощак.

НОМА-IR рассчитывали, подставляя концентрации глюкозы натощак и инсулина (12) в следующее уравнение: $\text{НОМА-IR} = ((\text{глюкоза натощак (ммоль/л)} \times \text{инсулин натощак (мЕд/л)}) / 22,5)$ (Wallace et al., *Diabetes Care* 27:1487-1495, 2004). Глюкозу в крови натощак (BG) определяли с помощью глюкозооксидазного анализа. Инсулин натощак определяли с помощью набора реагентов ELISA для определения инсулина у крыс/мышей (Crystal Chem, кат. № 90060).

Результаты

После 12-16 недель на диете с высоким содержанием жиров у животных WT DIO развивалась гипергликемия и гиперинсулинемия. Переносимость глюкозы была лучше у животных WT DIO, но не у TLR3KO DIO, при применении mAb 5429. У животных, получавших mAb 5429, через 60, 90, 120 и 180 мин после введения глюкозы концентрация глюкозы в сыворотке была значительно ниже, чем в контрольной группе, получавшей только фосфатно-солевой буфер 21А). По сравнению с мышами WT DIO, не получавшими mAb, AUC у получавших mAb 5429 животных WT DIO была ниже примерно на 21%. Также у животных WT DIO, получавших mAb 5429, уменьшались концентрации инсулина натощак (фиг. 22). У животных TLR3KO DIO улучшений концентрации инсулина натощак при введении mAb 5429 не наблюдалось. Анализ результатов исследования гомеостатической модели (НОМА) выявил улучшение чувствительности к инсулину у животных WT DIO, получавших mAb 5429, но не у животных TLR3KO DIO. Содержание НОМА-IR составляло соответственно $14,0 \pm 9,8$, $8,7 \pm 4,9$, $9,0 \pm 3,0$ у животных WT DIO, не получавших mAb 5429, животных WT DIO, получавших 5 мг/кг mAb 5429 и 20 мг/кг mAb 5429. Никакого воздействия на животных TLR3KO DIO антитела не оказывали.

Исследование показало, что антитела-антагонисты TLR3 повышали инсулинорезистентность и снижали уровни глюкозы натощак при моделировании DIO без потери веса, то есть антагонисты TLR3 могут быть полезными при лечении гипергликемии, инсулинорезистентности и диабета II типа.

Пример 16

Антитела-антагонисты TLR3 защищают от бактерий и индуцированных вирусами воспалительных реакций

Реагенты

Нетипируемые штаммы *Naemophilias influenza* (NTHi) 35, выделенные из организма пациентов с ХОЗЛ с бактериальными осложнениями, были получены от д-ра T.F. Murphy (Медицинский центр Buf-falo VA, Баффало, Нью-Йорк). Человеческий риновирус 16 получили из Американской коллекции типовых культур (ATCC) с TCID₅₀ = $2,8 \times 10^7$ /мл.

Анализ стимуляции NTHi

Клетки NHBE (Lonza, Уокерсвилл, Мэриленд) сеяли на 96-луночные планшеты для культивирования тканей Microtest (BD Biosciences, Бедфорд, Массачусетс) в количестве 1×10^5 /лунку. NTHi, выросшие на агаровых планшетах в течение 16-20 ч, ресуспендировали в питательной среде до концентрации $\sim 2 \times 10^8$ КОЕ/мл, добавляли 100 мкг/мл гентамицина на 30 мин и наносили при концентрации $\sim 2 \times 10^7$ /лунку на 96-луночные планшеты, содержащие NHBE. Через 3 ч собирали надосадочную жидкость и заменяли свежей питательной средой с антителами или без них (до конечной концентрации 0,08-50 мкг/мл). Еще через 24 ч инкубации трижды определяли содержание в клеточных супернатантах цитокинов и хемокинов с помощью набора реагентов Cytokine 25-plex AB bead, Human (включающим IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL12p40p70, IL-13, IL-15, IL-17, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10, MIG, Eotaxin, RANTES и MCP-1) (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) и мультиплексного флуоресцентного анализатора Luminex 100IS и ридера (Luminex Corporation, Остин, Техас).

Анализ стимуляции риновирусами

Клетки NHBE сеяли на 96-луночные планшеты для культивирования тканей Microtest (BD Biosciences, Бедфорд, Массачусетс) в количестве 1×10^5 клеток/лунку. На следующий день антитела (в конечной концентрации 0,08-50 мкг/мл) добавляли к клеткам NHBE или BEAS-2B и инкубировали в течение 1 ч, затем добавляли 10 мкл/лунку риновируса. Еще через 24 ч инкубации наличие цитокинов и хемокинов в клеточных супернатантах оценивали с помощью прибора luminex в соответствии с вышеприведенным описанием.

Результаты

mAb 15EVQ ингибировали индуцированный NTHi синтез IP-10/CXCL10 и RANTES/CCL5 в зависимости от дозы, тогда как при введении контрольного антитела, человеческого IgG4 (Sigma, Сент-Луис,

Миссури), было выявлено отсутствие ингибирования стимуляции NTHi (фиг. 23A). mAb 15EVQ также ингибировали индуцированный риновирусом синтез CXCL10/IP-10 и CCL5/RANTES (фиг. 23B).

Пример 17

Антитела-антагонисты TLR3 подавляют воспалительные реакции в астроцитах

Способы

Нормальные человеческие астроциты от 2 доноров (Lonza, Уолкерсвилл, Мэриленд) вносили в 24-луночный планшет в количестве 75000 клеток/луночку и оставляли на ночь для прикрепления к подложке. На следующий день к астроцитам добавили 200 нг/мл поли(I:C) и/или 10 мкг/мл mAb 18 на 24 ч. Концентрацию цитокинов измеряли с помощью прибора Lumiplex.

Результаты

Индукцированный поли(I:C) синтез IL-6, IL-8, IL-12, IFN- α , IFN- γ , CXCL9/MIG, CCL3/MIP-1a, CCL4, CCL5/RANTES и CXCL10/IP-10 ингибировали mAb 18, как показано в табл. 10.

Таблица 10

Донор 1	IL-6	IL-8	IL-12	IFN- α	IFN- γ
Без обработки	876,0 \pm 36,8	539,7 \pm 32,6	16,6 \pm 0,5	28,8 \pm 1,5	12,3 \pm 0,3
mAb 18	1011,9 \pm 57,4	1401,9 \pm 49,7	17,1 \pm 0,5	31,6 \pm 0,7	10,4 \pm 0,2
Поли (I:C)	o1*	o1	30,3 \pm 1,5	47,1 \pm 3,1	35,9 \pm 1,0
Поли (I:C)+ mAb 18	2225,0 \pm 108,1	6104,4 \pm 259,9	16,8 \pm 0,9	30,5 \pm 1,6	11,7 \pm 0,6
Донор 2					
Без обработки	729,1 \pm 7,1	248,2 \pm 4,7	14 \pm 0,5	19,5 \pm 1,8	10,5 \pm 0,5
mAb 18	779,0 \pm 9,8	1132,6 \pm 30,6	14,3 \pm 0,6	20,8 \pm 1,9	10,5 \pm 0,1
Поли (I:C)	o1	o1	25,5 \pm 0,4	36,3 \pm 1,9	30,8 \pm 0,9
Поли (I:C)+ mAb 18	3393,3 \pm 107,5	8660,4 \pm 354,3	16,2 \pm 0,3	24,7 \pm 1,2	12,6 \pm 0,3
Донор 1	CXCL9/MIG	CCL3/MIP-1a	CCL4	CCL5/RANTES	CXCL10/ IP-10
Без обработки	12,6 \pm 0,7	21 \pm 0,9	14,8 \pm 0,7	b1**	b1
mAb 18	14,8 \pm 1,7	19,5 \pm 1,5	14,8 \pm 1,1	b1	b1
Поли (I:C)	78,3 \pm 4,8	1569,3 \pm 36,9	159,7 \pm 12,7	788,2 \pm 94,9	461,4 \pm 10,3
Поли (I:C)+ mAb 18	18,5 \pm 1,6	31,2 \pm 1,9	13,2 \pm 0,9	b1	6,9 \pm 0,5
Донор 2					
Без обработки	9,9 \pm 1,6	12,3 \pm 1,7	11,3 \pm 0,3	b1	b1
mAb 18	8,9 \pm 0,7	13,2 \pm 1,5	11,1 \pm 0,7	b1	b1
Поли (I:C)	62 \pm 3,8	1552,9 \pm 41,1	140,7 \pm 4,8	546,8 \pm 21,7	533,2 \pm 15
Поли (I:C)+ mAb 18	18,3 \pm 2,7	66,6 \pm 3,8	12,1 \pm 0,8	b1	29,1 \pm 6,2

*o1: выше предела обнаружения

**b1: ниже предела обнаружения

Пример 18

Антитела-антагонисты TLR3 подавляют воспалительные реакции в клетках эндотелия

Способы

Клетки HUVEC (Lonza, Уолкерсвилл, Мэриленд) культивировали в содержащей сыворотку питательной среде, рекомендованной компанией Lonza. Клетки ресуспендировали в бессывороточной среде (Lonza, Уолкерсвилл, Мэриленд), сеяли на 96-луночные планшеты в количестве 3×10^5 клеток/мл и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 24 ч. Поли(I:C) (GE Healthcare, Piscataway, NJ) добавляли в увеличивающихся концентрациях (1,5-100 мкг/мл) и инкубировали 24 ч при 37°C. Для исследования ингибирования цитокинов mAb 15EVQ добавляли к клеткам в разных концентрациях (0-50 мкг/мл) и инкубировали 30 мин, а затем добавляли 20 мкг/мл поли(I:C) в течение 24 ч. Собирали надосадочную жидкость и измеряли концентрацию цитокинов с помощью набора для анализа человеческих цитокинов 30-plex и технологии Lumiplex MAP (Invitrogen Corp., Карлсбад, Калифорния). Для определения экспрессии sICAM-1 к клеткам HUVEC добавляли 20 мкг/мл поли(I:C) и различные концентрации mAb 15EVQ (0,8-50 мкг/мл). Уровни экспрессии sICAM-1 в клеточных супернатантах определяли с помощью ИФА (R&D systems). Жизнеспособность клеток измеряли с помощью набора реагентов CellTiterGlo (Promega, Мэдисон, Висконсин).

Результаты

Клетки HUVEC в ответ на поли(I:C) продуцировали следующие цитокины: IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-6, IL-7, CXCL8/IL-8, IL-12 (p40/p70), IL-15, IL-17, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , GM-CSF, CCL3/MIP-1a, CCL4/MIP-1 β , CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, VEGF, G-CSF, FGF-basic и HGF (табл. 11). mAb 15EVQ в зависимости от дозы снижали концентрации всех цитокинов, индуцированных поли(I:C)

(табл. 12). Способность mAb 15EVQ снижать индуцированный поли(I:C) синтез TNF- α , CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES и CXCL10/IP-10 наводит на мысль, что ингибирование опосредованных TLR3 реакций может защищать от инфильтрации лейкоцитами и Т-клетками (которая может привести к атеросклерозу). Ингибирование VEGF mAb 15EVQ также наводит на мысль о потенциальной пользе блокады TLR3 при патологиях, опосредованных VEGF, в том числе при ангиогенезе ряда злокачественных опухолей и заболеваний глаз, таких как возрастная макулодистрофия.

Функция TNF- α и IFN- γ при привлечении лейкоцитов и повышении экспрессии адгезионных молекул на активированном эндотелии (Doukas et al., Am. J. Pathol. 145:137-47, 1994; Pober et al., Am. J. Pathol. 133: 426-33, 1988). CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES и CXCL10/IP-10 участвовали в привлечении моноцитов и Т-клеток и вносили вклад в развитие атеросклероза (Lundberg et al., Clin. Immunol. 2009). Клетки эндотелия синтезируют VEGF при ангиогенезе при аномальном росте тканей или развитии ряда злокачественных опухолей (Livengood et al., Cell. Immunol. 249:55-62, 2007).

Таблица 11

Поли (I:C) мкг/мл	IL-6	CXCL8/IL-8	CCL2/MCP-1
10	848,8+50,9	12876,0+2314,0	11813,4+1420,9
5	751,3+2,1	11363,7+108,2	11365,7+113,1
2,5	607,1+91,6	10961,5+2200,7	11607,3+2155,7
1,25	419,2+178,4	9631,5+3675,8	11690,9+3189,9
0,63	263,8+81,4	6231,9+1568,0	9075,6+1152,2
0,31	183,5+168,3	5257,9+1855,0	8106,8+1193,1
0,16	111,9+72,5	4057,6+1127,4	6619,8+1728,2
не поли (I:C)	0,00	1286,6+300,8	1360,1+245,4

Поли (I:C) мкг/мл	IL-2R	IL-15	IL-17
100	784,4+45,4	61,3+12,5	43,8+5,3
50	718,6+56,8	61,3+12,5	47,6+0
25	735,7+23,4	56,7+18,9	58,3+4,9
12,5	650,5+29,8	38,8+6,5	39,8+10,9
6,25	643,4+39,9	34,2+0	32,1+0
3,13	681,8+24,3	38,8+6,5	43,8+5,3
1,56	578,6+10,5	29,4+6,7	36,1+5,6
не поли (I:C)	0,0	0,0	0,0

Поли (I:C) мкг/мл	IFN α	CXCL10/IP-10	CCL4/MIP-1P
100	50,7+0	3803,1+185,5	234,5+19,7
50	44,9+1,7	2235,9+184,6	291,6+41,8
25	46,1+0	2403,0+271,9	278,7+4,7
12,5	41,2+3,5	2185,4+64,9	243,8+63,4
6,25	36,1+0	2100,0+288,1	201,9+46,2
3,13	40,0+1,8	3553,2+197,1	191,5+20,8
1,56	42,5+1,7	2064,3+242,1	165,3+16,3
не поли (I:C)	0,0	0,0	0,0

Поли (I:C) мкг/мл	RANTES	TNF α	VEGF
100	6266,9+1708,7	12,8+3,2	581,1+181,4
50	2919,7+119,4	11,5+3,2	637,9+47,7
25	2805,1+176,7	9,8+2,8	700,3+62,5
12,5	2598,6+68,6	7,3+0,9	513,2+73,5
6,25	2449,2+830,6	6,9+1,4	440,4+29,5
3,13	3117,1+795,7	7,3+0,9	393,9+40,2
1,56	2481,0+719,3	6,0+1,8	358,4+74,8
не поли (I:C)	4,9+4,5	1,9+0,4	32,1+8,8

концентрация в пг/мл

Растворимый фактор межклеточной адгезии 1 (sICAM-1), образующийся при протеолизе, является маркером активации клеток эндотелия. ICAM-1 играет ключевую роль в миграции и активации лейкоцитов, его концентрация в клетках эндотелия и эпителия при воспалении повышается, он опосредует адгезию этих клеток к лейкоцитам через молекулы интегринов LFA-1 и Mac-1. В активированных с помощью поли(I:C) активировала клетки эндотелия, повышая экспрессию sICAM-1, которая снижалась при добавлении mAb 15EVQ (фиг. 24А).

Таблица 12

mAb 15 (мкг/мл)	50,00	10,00	2,00	0,40	0,08	0,016	0,003	0
PIС	+	+	+	+	+	+	+	-
IL-6	177,8±5,6*	214,6±3,6*	359,2±57,6*	727,2±50,5*	10000±0	10000±0	10000±0	10000 ± 0
CXCL8/IL-8	1040,7± 185,9	1765,9±97,1	6460,3± 3684,4	57349,5± 6293,4	72422,8± 88279,2	47047,5± 52393,1	76066,5± 11354,1	96478,0± 122298,4
CCL2/NCP-1	1187,7± 165,4*	1955,4±72,7*	9054,4± 4110,9*	20000±0,0	20000±0,0	20000±0,0	20000±0,0	20000±0,0
IL-2R	25,0±35,3*	0,0±0,0*	312,3± 137,6*	521,5±5,5	664,7±9,8	661,2±14,8	698,4±57,6	654,2±14,8
IL-15	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	4,1±0,0*	38,8±6,5	43,4±0,0	38,8±6,5	43,4±0,0
IL-17	1,3±1,8*	11,8±16,8	11,8±16,8	27,9±6,0	47,4±10,4	54,3±20,2	40,0±0,0	51,2±5,1
IFNα	0,9±1,3*	0,9±1,3*	19,0±7,7*	36,1±0,0	44,9±1,7	41,2±3,5	47,3±1,7	40,0±1,8
CXCL10/IP-10	0,0±0,0*	58,1±2,6*	633,0±471,6*	1441,4±97,1	3023,8± 166,1	2107,5±372,6	2346,4± 226,1	2157,4± 282,7
CCL4/MIP-1 β	0,0±0,0*	0,0±0,0*	2,9±4,1*	62,1±7,2*	176,6±21,3*	227,5±19,9	248,3±19,4	281,7±37,5
RANTES	3,0±0,0*	15,4±4,5*	201,1±169,1*	952,4±41,1*	2454,4± 98,5*	2698,1±88,6*	2624,4± 129,8 *	3459,7± 181,8
TNFα	1,9±0,4*	1,6±0,0*	2,2±0,0*	3,4±0,0	6,3±0,5	8,5±0,0	7,6±1,4	6,9±2,3
VEGF	87,2±8,7*	28,6±8,7*	88,3±52,1*	156,1±6,4*	479,6±14,1	544,6±8,3	533,5±70,2	607,3±29,9

* Показывает значимые значения p (менее 0,05) в сравнении концентраций mAb15 только с поли(I:C)

Значения представлены как среднее (пг/мл) ± станд. ошибка среднего

Это наводит на мысль о том, что антитела-антагонисты TLR3 могут ингибировать миграцию лейкоцитов и, следовательно, повреждение тканей, спровоцированное миграцией воспалительных клеток к очагу.

Для анализа жизнеспособности клетки HUVEC культивировали, сеяли на планшеты и стимулировали поли(I:C), как описывалось выше. mAb 15EVQ в зависимости от дозы восстанавливали индуцированное поли(I:C) снижение жизнеспособности клеток HUVEC (фиг. 24B).

Снижение активации клеток эндотелия может уменьшать избыточную инфильтрацию иммунных клеток и повреждение тканей, спровоцированное цитокинами, концентрация которых при воспалении увеличивается. Воспаление и сверхэкспрессия цитокинов и молекул адгезии в клетках эндотелия играют основную роль при развитии атеросклероза и гипертензии. Полученные данные позволяют обосновать потенциально полезное применение антагонистов TLR3 при болезнях кровеносных сосудов, в том числе васкулитах, и при болезнях, вызывающих дисфункцию эндотелия. Другое заболевание, для которого свойственно воспаление и сверхэкспрессия цитокинов, - это саркома Капоши (KS), которая часто встречается при иммуносупрессии и у ВИЧ-инфицированных пациентов, возбудителем которой является герпесвирус саркомы Капоши (KSHV). Синтез VEGF и цитокинов обуславливает выживание клеток саркомы Капоши (Livengood et al., Cell Immunol. 249:55-62, 2007). Антагонисты TLR3 могут быть полезны при снижении ангиогенного риска, связанного с саркомой Капоши и другими опухолями, при профилактике потери жизнеспособности клетками, при сохранении целостности защитного эндотелиального барьера, который предотвращает трансудацию, потенциально серьезное заболевание, связанное с повреждением органов и угрожающим жизни воспалением, таким как сепсис. Антагонисты TLR3 могут быть полезными и при вирусных инфекциях, провоцирующих патологии клеток эндотелия, например, при вирусной геморрагической лихорадке, возбудителями которой являются члены семейства флавивирусов (например, Денге, желтой лихорадки), филовирсов (Эбола, Марбурга), буньявирусов (например, хантавирус, найровирус, флебовирус) и аренавирусов (например, Луйо, Ласса, аргентинская, боливийская, венесуэльская геморрагические лихорадки (Sihibamiya et al., Blood 113:714-722, 2009).

Пример 20

Перекрестные реакции антител-антагонистов с TLR3 яванских макаков и мышей

Активность в отношении TLR3 яванского макака или мыши оценивали путем количественного определения гена-репортера ISRE, как описано в примере 2. кДНК TLR3 макака (SEQ ID NO: 217) и мыши (SEQ ID NO: 161) амплифицировали из цельной крови, клонировали в векторе pCEP4 (Clontech) и экспрессировали, как описано выше. У макаков при анализах NF-kB и ISRE IC50 mAb 15EVQ составляли соответственно 4,18 и 1,74 мкг/мл, тогда как для человеческого TLR3 при NF-kB и ISRE IC50 составляли 0,44 и 0,65 мкг/мл соответственно. Контрольные изотипные антитела не влияли на TLR3 по результатам этих анализов.

Пример 21

Терапевтическая доза антител-антагонистов TLR3 защищает от острых летальных вирусных инфекций

В примере 14 описывается профилактическое лечение инфекции вирусом гриппа А (введение в дни -1, 4, 8 и 12) антителами-антагонистами TLR3. Этот пример показывает, что терапевтическое применение

ние антител-антагонистов TLR3 (на 3 день после появления клинических симптомов инфекции вирусом гриппа А) эффективно увеличивает выживаемость.

Модель

В качестве модели острой летальной вирусной инфекции использовали экспериментальное заражение вирусом гриппа А, как описано в примере 14, за исключением того, что животным вводили mAb 5249 через 3 дня после заражения вирусом гриппа А, и возраст животных был 8 недель. В качестве контроля изотипа использовали антитела против IgG1 мыши производства BioLegend. Антитела вводили через 3, 7 и 11 дней после заражения вирусом гриппа А.

В рамках исследования оценивали выживаемость, ежедневно определяли оценку по шкале клинической оценки и регистрировали изменения веса. И у мышей C57B1/6, получивших mAb 5249, и у мышей TLR3KO показано статистически значимое повышение выживаемости ($p < 0,028$ и $p < 0,001$ соответственно), по сравнению с мышами C57BL/6, которым вводили антитела против IgG1 мыши в качестве контроля изотипа и вирус гриппа (фиг. 25). В группе мышей C57BL/6, получивших mAb 524, и мышей TLR3KO клиническая оценка была ниже (фиг. 26), а масса тела выше (фиг. 27) по сравнению с мышами C57BL/6, которым вводили антитела против IgG1 мыши в качестве контроля изотипа и вирус гриппа А. Полученные результаты показывают, что при моделировании острой летальной вирусной инфекции антитела-антагонисты TLR3 уменьшают тяжесть клинических симптомов и смертность и наводят на мысль о применении антагонистов TLR3 в качестве средства профилактики у людей с острыми инфекциями.

Пример 22

Эпитопы и паратопы антител-антагонистов TLR3 по результатам рентгенокристаллографии

Внеклеточный домен TLR3 человека кристаллизовали в комплексе с Fab-фрагментами mAb 15EVQ, mAb 12QVQ/QSV и mAb c1068.

Методы

Экспрессия и очистка белков

Экспрессию и очистку внеклеточного домена TLR3 (аминокислоты 1-703 из SEQ ID NO: 2) три Fab-фрагмента проводили, как описано выше.

Приготовление четвертичного комплекса TLR3 ECD-3 Fab

4 мг Внеклеточного домена человеческого TLR3 смешивали с 2,4 мг каждого Fab-фрагмента и инкубировали при 4°C в течение 3,5 ч, что соответствует молярному соотношению 1 TLR3 ECD:1.1 Fab. Комплекс очищали методом анионообменной хроматографии на колонке MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью Джерси), уравнивали 20 mM трис pH 8,5, 10% глицерином (буфер А) и элюировали 20 mM трис pH 8,5, 10% глицерином, 1 M NaCl (буфер В). Примерно 2,48 мг комплекса в 1,74 мл разводили до 10 мл буфером А, вносили в колонку со скоростью протекания 1 мл/мин и элюировали с линейным градиентом 0-40% В, подавая более 40 объемов колонки. Проводили пять последовательных циклов очистки. Фракции, соответствующие пику 1, сливали вместе, концентрировали с помощью центрифужного фильтра Amicon-15 mL Ultra-30000 MWCO и Microcon 30000 MWCO до 14,49 мг/мл в 20 mM трис pH 8,5, 27 mM NaCl, 10 % глицерина (коэффициент затухания: A_{280} (1 мг/мл) = 1,31).

Кристаллизация

Автоматический скрининг кристаллов проводили с помощью автомата для кристаллизации белков Oryx4 (Douglas Instruments), дозируя равные объемы белка и резервуарного раствора в формате сидячей капли с использованием планшета Corning 3550 (Corning Inc., Acton, MA). Начальный скрининг проводили с помощью лотка с ячейками для кристаллизации Hampton HT (HR2-130, Hampton Research, Aliso Viejo, CA). Мелкие кристаллы, полученные в разных условиях, использовали для получения кристаллов-затравок, а затем применяли метод микропереноса кристаллов (МПК) в качестве затравки для скрининга условий кристаллизации. Было проведено несколько циклов очистки, основанных на условиях начального скрининга, при которых получались мелкие кристаллы. Условия в резервуаре при МПК подбирались на основе тех, которые давали маленькие кристаллы после очистки: 18-28% полиэтиленгликоля (ПЭГ) 3350, 1M LiCl, pH 4,5 и 2,0-2,9 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5% ПЭГ400, pH 4,5, исследовались разные значения pH и разные добавки. Скрининг кристаллизации методом МПК проводился с помощью автомата для кристаллизации белков Oryx4 (Douglas Instruments), компоненты дозировались в следующих соотношениях: 1 часть белкового раствора:0,25 частей маточного кристалла-затравки:0,75 частей резервуарного раствора. Кристаллы с разрешением дифракционной решетки до ~ 10 -Å образовывались в растворе с концентрацией от 0,1 M Na ацетата pH 4,5, 2,9 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5% метилпентандиола (МПД) и 0,1 M Na ацетата pH 4,5, 26% ПЭГ3350, 1 M LiCl.

В попытке повысить разрешение кристаллов МПК в вышеуказанных условиях сочетали с дополнительным скринингом с использованием избранных компонентов комплекта для дополнительного скрининга Hampton HR2-428 (Hampton Research, Aliso Viejo, CA) в следующем объемном соотношении: 1 ч раствора белка:0,125 ч маточного раствора затравки:0,2 ч аддитивного раствора:0,675 резервуарного раствора. Кристаллы LR3 ECD в комплексе с Fab-фрагментами, подходящими для рентгеновской дифракции, с разрешением до ~ 5 -Å получали с помощью МПК в сочетании с дополнительным скринингом из раствора, содержащего 0,1 M Na ацетата pH 4,5, 28% ПЭГ 3350, 1 M LiCl и 30 mM Glu-Glu-Glu.

Сбор данных рентгенодифракционного анализа четвертичного комплекса TLR3 ECD

Для получения данных рентгенодифракционного анализа кристалл (размер $\sim 1,0 \times 0,5 \times 0,1$ мм³) на несколько секунд погружали в синтетический маточный раствор (0,1 М Na ацетата, pH 4,5, 28% ПЭГ3350, 1 М LiCl, 16% глицерина) и быстро замораживали в потоке азота при 100 К. Данные о дифракции рентгеновских лучей собирали и обрабатывали с помощью микрофокусного генератора рентгеновских лучей Rigaku MicroMax™-007HF, снабженного конфокальной оптикой Osmic™ VariMax™, детектором Saturn 944 CCD и системой криоохлаждения X-stream™ 2000 (Rigaku, Вудлендс, Техас). Интенсивность дифракции измеряли при вращении кристалла на 250° со временем экспозиции 1 мин на каждый поворот на половину градуса с максимальным разрешением 5 Å. Данные о дифракции рентгеновских лучей обрабатывали с помощью программы D*TREK (Pflugrath, Acta Crystallographica Section D, 55:1718-1725, 1999). Кристаллы принадлежат к группе моноклинных кристаллов C2 со следующими параметрами элементарной ячейки: $a = 214,90$ Å, $b = 142,08$ Å, $c = 125,04$ Å и $\beta = 103,17^\circ$. Асимметричная ячейка содержит одну молекулу комплекса. Статистика данных рентгенодифракционного анализа представлена в табл. 13.

Таблица 13

<u>Сбор данных</u>		
Пространственная группа	C2	
Оси элементарной ячейки (Å)	214,90, 142,08, 125,04	
Углы элементарной ячейки (°)	90, 103,17, 90	
Разрешение (Å)	30-5,0	(5,18-5,00)
Отсутствие уникальных отражений	15,877	(1589)
Полнота (%)	99,8	(99,6)
Избыток	5,2	(4,9)
R_{merge}^a	0,121	(0,312)
$\langle I/\sigma \rangle$	7,1	(2,9)
<u>Уточнение структуры</u>		
Разрешение (Å)	29,4-5,0	
$R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}}$ (%) ^b	26,8/30,0	
Число отражений		
Рабочий набор	15,792	
Исследуемый набор (5% данных)	788	
Rmsd идеальных значений		
Длина связи (Å)	0,007	
Углы связи (°)	0,744	
Число атомов белка	15,442	
График Рамачандрана		
Благоприятные области (%)	93,1	
Разрешенные (%)	98,8	
Запрещенные (%)	1,2	

Определение структуры

Кристаллическая структура TLR3 ECD - Fab 15EVQ - Fab 12QVQ/QSV - Fab C1068 определялась с помощью программы Phaser (Read, Acta Crystallogr. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 57:1373-1382, 2001). Моделями поиска были структуры ID 1ziw TLR3 ECD (банк данных о белках (PDB) после удаления всех гликанов, Choe et al., Science 309:581-585, 2005) и определенные кристаллические структуры высокого разрешения всех фрагментов Fab (итоговые данные о кристаллах и статистику для этих Fab-фрагментов см. в табл. 13). Угол изгиба фрагмента Fab 12QVQ/QSV значительно отличался от такового в свободной форме. Была получена серия моделей Fab 12QVQ/QSV путем подстановки разных углов изгиба с интервалом $\sim 5^\circ$, одна из которых хорошо согласовалась с электронной плотностью. Уточнение структуры проводили с помощью программы PHENIX (Adams et al., J. Synchrotron Radiat. 11:53-55, 2004). Уточненная структура представляла собой жесткие домены "остова" (каждый из доменов V или C) у Fab-фрагментов и 13 жестких сегментов (определения, использовавшиеся при детализации структуры: 30-60, 61-108, 109-156, 157-206, 207-257, 258-307, 308-363, 364-415, 416-464, 465-514, 515-570, 571-618, 619-687) для TLR3 ECD с одним B фактором для каждого жесткого остова Fab и одним B для всего комплекса TLR3 ECD.

Структуру каждого из жестких остовов Fab-фрагмента уточняли поправками на смещение/колебание/вращение атомов (TLS), а внеклеточный домен TLR3 ECD был разделен на 2 TLS сегмента по остатку 330 SEQ ID NO: 2. Плотность гликанов была видима в 10 из 15 участков N-гликозилирования. Затем добавляли модели углеводов из кристаллической структуры внеклеточного домена TLR3 (Choe et al., Science 309:581-585, 2005, PDB structure ID: 1ziw). После уточнения структуры жесткого остова видимая плотность короткого отсутствующего сегмента во внеклеточном домене TLR3 (остатки 337-342 из SEQ ID NO: 2) была введена в модель вместе с соответствующим сегментом из внеклеточной структуры TLR3 2a0z Bell et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 102:10976-10980, 2005, PDB structure ID: 2a0z). С-конец TLR3 ECD со-

держал дополнительную плотность, соответствующую 2a0z. Этот сегмент (647-703 of SEQ ID NO: 2) был затем заменен (остатки 647-687) 2a0w. Таким образом, модель TLR3 ECD представляла собой гибрид между структурами TLR3 1ziw и 2a0z и была определена как состоящая из 13 жестких сегментов основания (диапазон аминокислот: 30-60, 61-108, 109-156, 157-206, 207-257, 258-307, 308-363, 364-415, 416-464, 465-514, 515-570, 571-618, 619-687).

По-видимому, LCDR3 из Fab 12QVQ/QSV принимали конформацию, отличающуюся от таковой у свободной формы. Симулированный отжиг с несколькими точками старта проводили со стандартными параметрами с помощью программы PHENIX. Модели этого LCDR3 оценивали визуально по карте электронной плотности и включали в исходную модель конформацию с "лучшим соответствием". Процесс уточнения структуры контролировали по показателю R_{free} против 5% отражений, установленных до начала вычислений. В этом конечном цикле включали один В-фактор для каждого остатка. Исследование модели и ручное построение области изгиба Fab-фрагментов и боковых цепей на поверхности сопряжения белок-белок проводили с помощью программы COOT (Emsley et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60: 2126-32, 2004). Окончательные значения R_{cryst} и R_{free} составили 26,8 и 30,0% соответственно для всех 15 792 независимых отражений до 5,0 Å. Статистика определения точной структуры приведена в табл. 13 и 14.

Результаты

Молекулярная структура четвертичного комплекса LR3 ECD-три Fab

Общая молекулярная структура комплекса показана на фиг. 28. В асимметричной единице присутствует одна молекула TLR3 ECD и одна молекула каждого Fab. Модель структуры TLR3 ECD включает все остатки с 30 до 687 huTLR3 (SEQ ID NO: 2). Что касается трех Fab-фрагментов, были включены все остатки из соответствующих несвязанных форм, за исключением ионов растворителя и молекул воды. Молекула TLR3 ECD по общей топологии очень сходна с ранее описанными структурами (rmsd 0.79 Å для 1ziw, 613 C α 's и 1,37 Å для 2a0z, 595 C α 's). Все Fab-фрагменты по структуре идентичны своим несвязанным формам, за исключением LCDR3 в Fab 12QVQ/QSV, как описано в методах, а как и участки изгиба и некоторые боковые цепи в месте соединения TLR3 ECD/Fab.

Сбор данных	Fab 12QVQ/QSV		Fab 15EVQ		Fab c1068	
	P2 ₁		P2 ₁		P2 ₁	
Пространственная группа						
Размеры ячейки						
a, b, c (Å)	75,83, 80,35, 83,06		54,68, 74,74, 64,99		82,48, 136,94, 83,25	
α, β, γ (°)	90, 115,24, 90		90, 103,69, 90		90, 114,95, 90	
Разрешение (Å)	70-2,5 (2,59-2,50)		49-2,2 (2,28-2,20)		50-1,9 (2,0-1,9)	
Уникальные отражения	27,785 (1653)		24,439 (1859)		117,490 (5916)	
Полнота (%)	88,5 (53)		94,2 (72,8)		89,3 (45,2)	
Избыток	4 (1,8)		5,2 (4,3)		3,2 (2)	
R _{merge} ^a	0,164 (0,297)		0,088 (0,445)		0,065 (0,264)	
<Iσ> (без усреднения)	2,9 (1,2)		3,8 (1,4)		5,7 (1,6)	
Уточнение структуры						
Разрешение (Å)	15-2,5 (2,56-2,50)		15-2,2 (2,26-2,20)		75,38-1,90 (1,94-1,90)	
R _{cryst} /R _{free} (°) ^b	19,7/25,4 (30,8/40,8)		19,3/26,9 (24,6/31,1)		20,4/27,7 (39,8/51,1)	
Число отражений						
Рабочий набор	26,723		23,308		111,413	
Тестовая совокупность	882		1,008		5,917	
Число атомов						
Белки	7,046		3,705		13,421	
Растворитель (вода и т.п.)	486		333		1,779	
Длины связи (Å)	0,012		0,013		0,023	
RMSD углы связи (°)	16		1,5		2	
График Рамачандрана ^c						
Благоприятные области (%)	923		96,8		97,2	
Разрешенные (%)	98,9		99,3		99,7	
Запрещенные (%)	1,1		0,7		0,3	

Значения для наибольшего разрешения показаны в ()

$R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, где I - интенсивность измеренного отражения, а $\langle I \rangle$ - средняя интенсивность всех измеренных отражений.

$R_{cryst} = \sum |F_{набл.} - F_{расч.}| / \sum F_{набл.}$, где F_{набл.} и F_{расч.} - наблюдаемые и расчетные коэффициенты, а R_{free} вычисляется для набора произвольно выбранных 5% отражений перед уточнением структуры.

^c График Рамачандрана строили с помощью программы MolProbity (Davis, I.W., et al., Nucleic Acids Res, 32:W615-9, 2004).

Эпитопы и паратопы

Остатки, участвующие в связывании между TLR3 ECD и тремя Fab-фрагментами, показаны на фиг. 28B. Fab 12QVQ/QSV связывается вблизи N-конца TLR3 ECD. Конформационный эпитоп состоял из остатков TLR3 LRR 3-7 (аминокислоты 100-221 SEQ ID NO: 2). Связывание Fab 12QVQ/QSV приводило к погружению примерно на 928 Å² и 896 Å² для антигена и антитела соответственно. Что касается Fab 12QVQ/QSV, кристаллическая структура идентифицировала следующие остатки эпитопа TLR3 (SEQ ID NO: 2): S115, D116, K117, A120, K139, N140, N141, V144, K145, T166, Q167, V168, S188, E189, D192, A195 и A219. Что касается Fab 12QVQ/QSV, кристаллическая структура идентифицировала следующие остатки паратопа: (SEQ ID NO: 211): G28, S29, Y30, Y31, E49, D50, Y90, D91 и D92. Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 214): N32, Q54, R56, S57, K58, Y60, Y104, P105, F106 и Y107.

Fab 15EVQ и Fab c1068 связывали неперекрывающиеся эпитопы, охватывающие LRR 15-23 (аминокислоты 406-635 SEQ ID NO: 2) вблизи C-конца (фиг. 28). Fab-фрагмент 15EVQ погружен на 1080 Å² и 1064 Å² в поверхность антигена и антитела соответственно, тогда как Fab c1068 был погружен на 963 Å² и 914 Å² соответственно. Эпитоп для Fab 15EVQ включает остатки K416, K418, L440, N441, E442, Y465, N466, K467, Y468, R488, R489, A491, K493, N515, N516, N517, H539, N541, S571, L595 и K619 из TLR3, показанные в SEQ ID NO: 2. Что касается Fab 15EVQ, его кристаллическая структура идентифицировала следующие остатки паратопа (SEQ ID NO: 41): Q27, Y32, N92, T93, L94 и S95. Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 216): W33, F50, D52, D55, Y57, N59, P62, E99, Y101, Y104 и D106.

Относительно Fab c1068 кристаллическая структура идентифицировала следующие остатки эпитопа TLR3 (SEQ ID NO: 2): E446, T448, Q450, R453, R473, N474, A477, L478, P480, S498, P499, Q503, P504, R507, D523, D524, E527, E530 и K559. Относительно Fab c1068 его кристаллическая структура идентифицировала следующие остатки паратопа: легкая цепь: H30, N31, Y32, N50, E66, S67, G68 (glyc). Тяже-

лая цепь: T30, T31, Y32, W33, H35, E50, N52, N54, N55, R57, N59, V99, M102, I103 и T104.

Механизмы нейтрализации и предпосылки функции TLR3

mAb 15EVQ: эпитоп mAb 15EVQ содержит остатки TLR3 N517, H539 и N541, перекрывающиеся с С-концом участка связывания двухцепочечной РНК (Bell et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:8792-7, 2006). Таким образом, не вдаваясь в конкретную теорию, полагают, что mAb 15EVQ конкурирует за связывание с TLR3 с его лигандом и препятствует лиганд-индуцированной димеризации, необходимой для формирования сигнальной единицы (Liu et al., Science 320:379-81, 2008). На фиг. 29 показан механизм прямой конкуренции mAb 15EVQ. В зависимости от концентрации антител этот механизм приведет к полному ингибированию активации TLR3, индуцированному поли(I:C) или двухцепочечной РНК.

mAb 12QVQ/QSV и mAb c1068: как показано на фиг. 30, эти два антитела не соприкасаются непосредственно с лигандом двухцепочечной ДНК. Таким образом, маловероятно, что они будут нейтрализовать функцию TLR3 по механизму, сходному с таковым у mAb 15EVQ. Кроме того, Fab-фрагменты ориентированы в сторону от лиганда (фиг. 30). По структуре и mAb 12QVQ/QSV, и Fab c1068 способны связываться с сигнальной единицей, не нарушая ее функцию. Со стерической точки зрения маловероятно, что два Fab-фрагмента молекулы mAb способны одновременно связываться с двумя молекулами TLR3 в одной сигнальной единице, тем самым препятствуя димеризации TLR3, опосредованной двухцепочечной РНК. Не вдаваясь в конкретную теорию, полагают, что связывание mAb 12QVQ/QSV или mAb c1068 с TLR3 препятствует объединению сигнальной единицы из-за стерических столкновений антител и соседних сигнальных единиц. Связывание TLR3 с двухцепочечной РНК не ограничено сигнальной единицей, определяемой комплексом двухцепочечной РНК:TLR3 (Liu et al., Science, 320: 379-81, 2008). Возможно, что группировка нескольких сигнальных единиц может привести к усилению сигнализации, или эффективная сигнализация TLR3 требует такой группировки. Расположение mAb 12QVQ/QSV и mAb c1068 может блокировать объединение и приводить к нейтрализации активности TLR3. Следовательно, максимальный нейтрализующий эффект антител будет зависеть от степени разделения сигнальных единиц из-за связывания антитела. Как показано на фиг. 30, mAb 12QVQ/QSV будет способствовать большему разделению, чем mAb c1068, что может обуславливать большую силу действия mAb 12QVQ/QSV. Это согласуется с наблюдением, что mAb c1068 и mAb 15EVQ способны привести к ~50 и 100% нейтрализации TLR3, при концентрации насыщения соответственно, и что активность mAb 12QVQ/QSV проявляется сразу. Таким образом, исследования структуры и нейтрализации TLR3 позволяют предположить модель сигнализации посредством TLR3, в которой для эффективной сигнализации необходимо объединение сигнальных единиц двухцепочечной РНК:TLR3. mAb 12QVQ/QSV и mAb c1068 также определяют класс антител, способных к частичной модуляции сигнализации посредством TLR3, не препятствуя связыванию лиганда или димеризации рецептора.

Список последовательностей

<110> CENTOSOR ORTNO BIOTECН INC.

<120> АНТАГОНИСТЫ ТОЛЛ-ПОДОВНОГО РЕЦЕПТОРА 3

<130> CEN5242PCT1

<140> PCT/US2010/032964

<141> 2010-04-29

<150> 12/609675

<151> 2009-10-30

<150> 61/109974

<151> 2008-10-31

<150> 61/161860

<151> 2009-03-20

<150> 61/165100

<151> 2009-03-31

<150> 61/173686

<151> 2009-04-29

<160> 229

<170> FastSEQ для Windows версия 4.0

<210> 1

<211> 2712

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgagacaga ctttgccctg tatctacttt tgggggggccc ttttgccctt tgggatgctg 60
tgtgatcct ccaccaccaa gtgcaactgtt agccatgaag ttgctgactg cagccacctg 120
aagttgactc aggtaccoga tgatctacc cacaacataa cagtggtgaa ccttaccat 180
aatcaactca gaagattacc agccggccaac ttcacaaggt atagccagct aactagcctg 240
gatgtaggat ttaacaccat ctcaaaactg gagccagaat tgtgccagaa acttcccatg 300
ttaaagttt tgaacctcca gcaacaatgag ctatctcaac tttctgataa aacctttgcc 360
ttctgcacga atttgactga actccatctc atgtccaact caatccagaa aattaaaaat 420
aatccctttg tcaagcagaa gaatttaac acattagatc tgtctcataa tggctgtgca 480
tctacaaaat taggaactca ggttcagctg gaaaatctcc aagagcttct attatcaaac 540
aataaaattc aagcgctaaa aagtgaagaa ctggatatct tggccaattc atcttataaa 600
aaattagagt tgtcatcgaa tcaaatataa gagttttctc caggggtgtt tcacgcaatt 660
ggaagattat ttggcctctt tctgaacaa gtccagctgg gtcccagcct tacagagaag 720
ctatgtttgg aattagcaaa cacaaagcatt cggaaatctgt ctctgagtaa cagccagctg 780
tccaccacca gcaatacaac tttcttggga ctaaaatgga caaatctcac tatgctgat 840
ctttctaca caaacttaaa tgtggttgg aacgattcct ttgcttggct tccacaacta 900
gaatatttct tccatagata taataataa cagcatttgt tttctcactc ttgcaacggg 960
cttttcaatg tgaagtaact gaatttgaaa cggcttttta ctaaaacaag tatttccctt 1020
gcctcactcc ccaagattga tgatttttct tttcagtgcc taaaatgttt ggagcacctt 1080
aacatggaag ataatgatat tccaggcata aaaagcaata tgttccacgg attgataaac 1140
ctgaataact taagtctatc caactccttt acaagtttgc gaactttgac aatgaaaca 1200
tttgtatcac ttgctcattc tccctacac atactcaacc taaccaagaa taaaatctca 1260
aaaatagaga gtgatgcttt ctcttggttg gcccacctag aagtacttga cctgggctt 1320
aatgaaattg ggcagaact cacagccag gaatggagag gtctagaaaa tattttcgaa 1380
atctatcttt cctacaacaa gtacctgacg ctgactagga actcctttgc ctgggtcca 1440
agccttcaac gaactgatct ccgaaggggt gcccttaaaa atgtggatag ctctcttca 1500
ccattccagc ctctctgtaa cttgaccatt ctggatctaa gcaacaacaa catagccaac 1560

```

ataaatgatg acatgttga gggcttgag aaactagaaa ttctcgatt gcagcataac 1620
aacttagcac ggctctggaa acacgcaaac cctgggtgct ccatttattt cctaaagggg 1680
ctgtctcacc tccacatcct taacttgag tccaacggct ttgacgagat cccagttgag 1740
gtcttcaagg atttatttga actaaagatc atcgatttag gattgaataa tttaaacaca 1800
cttccagcat ctgtctttaa taatcagggt tctctaaagt cattgacac tcaagaagaat 1860
ctcataacat ccggttgagaa gaaggttttc gggccagctt tcaggaacct gactgagtta 1920
gatatgctt ttaatccctt tgattgcaag tgtgaaagta ttgcctgggt tgtaaattgg 1980
attaacgaga cccataccaa catccctgag ctgtcaagcc actaccttgg caaacctcca 2040
cctcactatc atgggttccc agtgagactt tttgatacat catcttgcaa agacagtgcc 2100
ccctttgaac ctttttcat gatcaatacc agtaccctgt tgatttttat ctttattgta 2160
cttctcatcc actttgaggg ctggaggata tctttttatt ggaatttttc agtacatcga 2220
gttcttggtt tcaaagaaat agacagacag acagaacagt ttgaatatgc agcatatata 2280
attcatgctc ataaagataa ggattgggtc tgggaacatt tctcttcaat gaaaaaggaa 2340
gaccaatctc taaaattttg tctggaagaa agggactttg agggcgggtg ttttgaacta 2400
gaagcaattg ttaacagcat caaaagaagc agaaaaatta tttttgttat aacacacat 2460
ctattaaaag acccattatg caaaagattc aaggtacatc atgcagttca acaagctatt 2520
gaacaaaatc tggattccat tatattggtt ttccttgagg agattccaga ttataaactg 2580
aaccatgcac tctgttttgc aagaggaatg tttaaatctc actgcactct gaactggcca 2640
gttcagaaag aacggatagg tgcctttcgt cataaattgc aagtagcact tggatccaaa 2700
aactctgtac at 2712

<210> 2
<211> 904
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Arg Gln Thr Leu Pro Cys Ile Tyr Phe Trp Gly Gly Leu Leu Pro
1 5 10 15
Phe Gly Met Leu Cys Ala Ser Ser Thr Thr Lys Cys Thr Val Ser His
20 25 30
Glu Val Ala Asp Cys Ser His Leu Lys Leu Thr Gln Val Pro Asp Asp
35 40 45
Leu Pro Thr Asn Ile Thr Val Leu Asn Leu Thr His Asn Gln Leu Arg
50 55 60
Arg Leu Pro Ala Ala Asn Phe Thr Arg Tyr Ser Gln Leu Thr Ser Leu
65 70 75 80
Asp Val Gly Phe Asn Thr Ile Ser Lys Leu Glu Pro Glu Leu Cys Gln
85 90 95
Lys Leu Pro Met Leu Lys Val Leu Asn Leu Gln His Asn Glu Leu Ser
100 105 110
Gln Leu Ser Asp Lys Thr Phe Ala Phe Cys Thr Asn Leu Thr Glu Leu
115 120 125

His Leu Met Ser Asn Ser Ile Gln Lys Ile Lys Asn Asn Pro Phe Val
130 135 140
Lys Gln Lys Asn Leu Ile Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gly Leu Ser
145 150 155 160
Ser Thr Lys Leu Gly Thr Gln Val Gln Leu Glu Asn Leu Gln Glu Leu
165 170 175
Leu Leu Ser Asn Asn Lys Ile Gln Ala Leu Lys Ser Glu Glu Leu Asp
180 185 190
Ile Phe Ala Asn Ser Ser Leu Lys Lys Leu Glu Leu Ser Ser Asn Gln
195 200 205
Ile Lys Glu Phe Ser Pro Gly Cys Phe His Ala Ile Gly Arg Leu Phe
210 215 220
Gly Leu Phe Leu Asn Asn Val Gln Leu Gly Pro Ser Leu Thr Glu Lys
225 230 235 240
Leu Cys Leu Glu Leu Ala Asn Thr Ser Ile Arg Asn Leu Ser Leu Ser
245 250 255
Asn Ser Gln Leu Ser Thr Thr Ser Asn Thr Thr Phe Leu Gly Leu Lys
260 265 270
Trp Thr Asn Leu Thr Met Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Asn Leu Asn Val
275 280 285

Val Gly Asn Asp Ser Phe Ala Trp Leu Pro Gln Leu Glu Tyr Phe Phe
 290 295 300
 Leu Glu Tyr Asn Asn Ile Gln His Leu Phe Ser His Ser Leu His Gly
 305 310 315
 Leu Phe Asn Val Arg Tyr Leu Asn Leu Lys Arg Ser Phe Thr Lys Gln
 325 330 335
 Ser Ile Ser Leu Ala Ser Leu Pro Lys Ile Asp Asp Phe Ser Phe Gln
 340 345 350
 Trp Leu Lys Cys Leu Glu His Leu Asn Met Glu Asp Asn Asp Ile Pro
 355 360 365
 Gly Ile Lys Ser Asn Met Phe Thr Gly Leu Ile Asn Leu Lys Tyr Leu
 370 375 380
 Ser Leu Ser Asn Ser Phe Thr Ser Leu Arg Thr Leu Thr Asn Glu Thr
 385 390 395
 Phe Val Ser Leu Ala His Ser Pro Leu His Ile Leu Asn Leu Thr Lys
 405 410 415
 Asn Lys Ile Ser Lys Ile Glu Ser Asp Ala Phe Ser Trp Leu Gly His
 420 425 430
 Leu Glu Val Leu Asp Leu Gly Leu Asn Glu Ile Gly Gln Glu Leu Thr
 435 440 445
 Gly Gln Glu Trp Arg Gly Leu Glu Asn Ile Phe Glu Ile Tyr Leu Ser
 450 455 460
 Tyr Asn Lys Tyr Leu Gln Leu Thr Arg Asn Ser Phe Ala Leu Val Pro
 465 470 475
 Ser Leu Gln Arg Leu Met Leu Arg Arg Val Ala Leu Lys Asn Val Asp
 485 490 495
 Ser Ser Pro Ser Pro Phe Gln Pro Leu Arg Asn Leu Thr Ile Leu Asp
 500 505 510
 Leu Ser Asn Asn Asn Ile Ala Asn Ile Asn Asp Asp Met Leu Glu Gly
 515 520 525
 Leu Glu Lys Leu Glu Ile Leu Asp Leu Gln His Asn Asn Leu Ala Arg
 530 535 540
 Leu Trp Lys His Ala Asn Pro Gly Gly Pro Ile Tyr Phe Leu Lys Gly
 545 550 555
 Leu Ser His Leu His Ile Leu Asn Leu Glu Ser Asn Gly Phe Asp Glu
 565 570 575
 Ile Pro Val Glu Val Phe Lys Asp Leu Phe Glu Leu Lys Ile Ile Asp
 580 585 590
 Leu Gly Leu Asn Asn Leu Asn Thr Leu Pro Ala Ser Val Phe Asn Asn
 595 600 605
 Gln Val Ser Leu Lys Ser Leu Asn Leu Gln Lys Asn Leu Ile Thr Ser
 610 615 620
 Val Glu Lys Lys Val Phe Gly Pro Ala Phe Arg Asn Leu Thr Glu Leu
 625 630 635
 Asp Met Arg Phe Asn Pro Phe Asp Cys Thr Cys Glu Ser Ile Ala Trp
 645 650 655
 Phe Val Asn Trp Ile Asn Glu Thr His Thr Asn Ile Pro Glu Leu Ser
 660 665 670
 Ser His Tyr Leu Cys Asn Thr Pro Pro His Tyr His Gly Phe Pro Val
 675 680 685
 Arg Leu Phe Asp Thr Ser Ser Cys Lys Asp Ser Ala Pro Phe Glu Leu
 690 695 700
 Phe Phe Met Ile Asn Thr Ser Ile Leu Leu Ile Phe Ile Phe Ile Val
 705 710 715
 Leu Leu Ile His Phe Glu Gly Trp Arg Ile Ser Phe Tyr Trp Asn Val
 725 730 735
 Ser Val His Arg Val Leu Gly Phe Lys Glu Ile Asp Arg Gln Thr Glu
 740 745 750
 Gln Phe Glu Tyr Ala Ala Tyr Ile Ile His Ala Tyr Lys Asp Lys Asp
 755 760 765
 Trp Val Trp Glu His Phe Ser Ser Met Glu Lys Glu Asp Gln Ser Leu
 770 775 780
 Lys Phe Cys Leu Glu Glu Arg Asp Phe Glu Ala Gly Val Phe Glu Leu
 785 790 795 800
 Glu Ala Ile Val Asn Ser Ile Lys Arg Ser Arg Lys Ile Ile Phe Val
 805 810 815
 Ile Thr His His Leu Leu Lys Asp Pro Leu Cys Lys Arg Phe Lys Val
 820 825 830
 His His Ala Val Gln Gln Ala Ile Glu Gln Asn Leu Asp Ser Ile Ile
 835 840 845
 Leu Val Phe Leu Glu Glu Ile Pro Asp Tyr Lys Leu Asn His Ala Leu
 850 855 860
 Cys Leu Arg Arg Gly Met Phe Lys Ser His Cys Ile Leu Asn Trp Pro
 865 870 875
 Val Gln Lys Glu Arg Ile Gly Ala Phe Arg His Lys Leu Gln Val Ala
 885 890 895
 Leu Gly Ser Lys Asn Ser Val His
 900

<210> 3
 <211> 2109
 <212> RHK
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 atgagacaga ctttgccctg tatctacttt tgggggggccc ttttgccctt tgggatgctg 60
 tgtgcactcc ccaccaccaa gtgcactggt agccatgaag ttgctgactg cagccaccgt 120
 aagttgactc aggtaccoga tgatctacc acaacataa cagtgttgaa ccttaccact 180
 aatcaactca gaagattacc agccgccaac ttcacaaggt atagccagct aactagcttg 240
 gatgtaggat ttaacaccat ctcaaaactg gagcagaat tggccagaa acttccactg 300
 ttaaaagttt tgaacctcca gcacaatgag ctatctcaac ttctgataa aacctttgcc 360
 ttctgcagca atttgactga actcactctc atgtccaact caatccagaa aatataaaat 420
 aatccctttg toaagcagaa gaatttaatc acattagatc tgtctcataa tggctgtgca 480
 tctacaaaat taggaactca ggttcagctg gaaaatctcc aagagcttct atattcaaac 540
 aataaaatcc aagcgctaaa aagtgaaaga ctggatatct ttgccaatc atcttataaa 600
 aaattagagt tgcctcga tcaaaatata gagttttctc caggggtgtt tcaagcaatt 660
 ggaagattal ttggcctctt tctgaacaat gtccagctgg gtcccagcct tacagagaag 720
 ctatgtt199 aattagcaaa caaaagcatt cggatctctg ctctgagtaa cagccagctg 780
 tccaccacca gcaatacaac ttctctgoga ctaaagtgga caatctcaac tatgtctgat 840
 ctttctlaca acaacttaaa tgggttgggt aacgattctt ttgcttggct tccacaacta 900
 gaattattct tctagagata taataataa cagcatttgt ttctcactc ttgaccggg 960
 cttttcaatg tgagtaact gaattgaaa cggcttttta ctaaaacaag tatttccctt 1020
 gcctcactcc ccaagatgta tgaattttct ttctagtgcc taaaatgttt ggagcaccct 1080
 aacatggaag ataagatgat tccagcgata aaaagcaata tgttcacag attgataaac 1140
 ctgaaatact taagtctatc caactccttt acaagtttgc gaactttgac aaatgaaaca 1200
 ttgtatcac ttgctcattc tcctttacac atactcaacc taaccaagaa taaaatctca 1260
 aaaatagaga gtgatgcttt ctcttggttg gcccactgag aagtaactga cctggcctct 1320
 aatgaaattg ggcaagaact cacaggccag gaatggagag gtctagaaaa tattttcgaa 1380
 atctatcttt cctacaacaa gtacctgcag ctgactagga actcctttgc cttgttccca 1440
 agccttcaac gactgatgct cgaaggggtg gccctaaaa atgtggatag ctctccttca 1500
 ccattccagc ctcttctgaa cttgaccatt ctggatctaa goaacacaaa catagccaac 1560
 ataaatgatg acatgttggaa gggctctgag aaactagaaa ttctcgattt gcagcataac 1620
 aacttagcac ggtcttggaa acacgcaaac cctggttggtc ccatttattt cctaaaggtg 1680
 ctgtctcacc tccacatcct taacttggag tccaacgctt tgaagagat cccagttgag 1740
 gtcttcaagg atcttattga actaaagatc atcgatttag gattgataaa tttaaacaca 1800
 ctctccagct ctgtctttta taatcaggtg tcttaaggt cctgaaacct tcaagaagat 1860
 cbataacat ccgttgagaa gaaggttttc gggccagctt tcaagaaacct gactgattta 1920
 gatatgcgct ttaatcctt tgaattcagc tgiagaagta ttgcttggtt tggtaattgg 1980
 attaacgaga cccatccaaa catcctctgag ctgtcaagcc actacctttg caacactcca 2040
 cctcactac atgggttccc agtgagactt ttgatacat catcttgcaa agacagtgcc 2100
 cccttgaa 2109

<210> 4
 <211> 703
 <212> PRI
 <213> Homo sapiens

021512

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

Lys Leu Pro Met Leu Lys Val Leu Asn Leu Gln His Asn Glu Leu Ser
100 105 110
Gln Leu Ser Asp Lys Thr Phe Ala Phe Cys Thr Asn Leu Thr Glu Leu
115 120 125
His Leu Met Ser Asn Ser Ile Gln Lys Ile Lys Asn Asn Pro Phe Val
130 135 140
Lys Gln Lys Asn Leu Ile Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gly Leu Ser
145 150 155 160
Ser Thr Lys Leu Gly Thr Gln Val Gln Leu Glu Asn Leu Gln Glu Leu
165 170 175
Leu Leu Ser Asn Asn Lys Ile Gln Ala Leu Lys Ser Glu Glu Leu Asp
180 185 190
Ile Phe Ala Asn Ser Ser Leu Lys Lys Leu Glu Leu Ser Ser Asn Gln
195 200 205
Ile Lys Glu Phe Ser Pro Gly Cys Phe His Ala Ile Gly Arg Leu Phe
210 215 220
Gly Leu Phe Leu Asn Asn Val Gln Leu Gly Pro Ser Leu Thr Glu Lys
225 230 235 240
Leu Cys Leu Glu Leu Ala Asn Thr Ser Ile Arg Asn Leu Ser Leu Ser
245 250 255
Asn Ser Gln Leu Ser Thr Thr Ser Asn Thr Thr Phe Leu Gly Leu Lys
260 265 270
Trp Thr Asn Leu Thr Met Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Asn Leu Asn Val
275 280 285
Val Gly Asn Asp Ser Phe Ala Trp Leu Pro Gln Leu Glu Tyr Phe Phe
290 295 300
Leu Glu Tyr Asn Asn Ile Gln His Leu Phe Ser His Ser Leu His Gly
305 310 315 320
Leu Phe Asn Val Arg Tyr Leu Asn Leu Lys Arg Ser Phe Thr Lys Gln
325 330 335
Ser Ile Ser Leu Ala Ser Leu Pro Lys Ile Asp Asp Phe Ser Phe Gln
340 345 350
Trp Leu Lys Cys Leu Glu His Leu Asn Met Glu Asp Asn Asp Ile Pro
355 360 365
Gly Ile Lys Ser Asn Met Phe Thr Gly Leu Ile Asn Leu Lys Tyr Leu
370 375 380
Ser Leu Ser Asn Ser Phe Thr Ser Leu Arg Thr Leu Thr Asn Glu Thr
385 390 395 400
Phe Val Ser Leu Ala His Ser Pro Leu His Ile Leu Asn Leu Thr Lys
405 410 415
Asn Lys Ile Ser Lys Ile Glu Ser Asp Ala Phe Ser Trp Leu Gly His
420 425 430
Leu Glu Val Leu Asp Leu Gly Leu Asn Glu Ile Gly Gln Glu Leu Thr
435 440 445
Gly Gln Glu Trp Arg Gly Leu Glu Asn Ile Phe Glu Ile Tyr Leu Ser
450 455 460
Tyr Asn Lys Tyr Leu Gln Leu Thr Arg Asn Ser Phe Ala Leu Val Pro
465 470 475 480
Ser Leu Gln Arg Leu Met Leu Arg Arg Val Ala Leu Lys Asn Val Asp
485 490 495

Ser Ser Pro Ser Pro Phe Gln Pro Leu Arg Asn Leu Thr Ile Leu Asp
500 505 510
Leu Ser Asn Asn Asn Ile Ala Asn Ile Asn Asp Asp Met Leu Glu Gly
515 520 525
Leu Glu Lys Leu Glu Ile Leu Asp Leu Gln His Asn Asn Leu Ala Arg
530 535 540
Leu Trp Lys His Ala Asn Pro Gly Gly Pro Ile Tyr Phe Leu Lys Gly
545 550 555 560
Leu Ser His Leu His Ile Leu Asn Leu Glu Ser Asn Gly Phe Asp Glu
565 570 575
Ile Pro Val Glu Val Phe Lys Asp Leu Phe Glu Leu Lys Ile Ile Asp
580 585 590
Leu Gly Leu Asn Asn Leu Asn Thr Leu Pro Ala Ser Val Phe Asn Asn
595 600 605
Gln Val Ser Leu Lys Ser Leu Asn Leu Gln Lys Asn Leu Ile Thr Ser
610 615 620
Val Glu Lys Lys Val Phe Gly Pro Ala Phe Arg Asn Leu Thr Glu Leu
625 630 635 640
Asp Met Arg Phe Asn Pro Phe Asp Cys Thr Cys Glu Ser Ile Ala Trp
645 650 655
Phe Val Asn Trp Ile Asn Glu Thr His Thr Asn Ile Pro Glu Leu Ser
660 665 670
Ser His Tyr Leu Cys Asn Thr Pro Pro His Tyr His Gly Phe Pro Val
675 680 685
Arg Leu Phe Asp Thr Ser Ser Cys Lys Asp Ser Ala Pro Phe Glu
690 695 700

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 16 VL

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

<210> 6
<211> 116
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 16 VH

<400> 6
Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

021512

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

<210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 17 VL

<400> 7
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ala Leu Gly Gly Tyr Phe Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Asp Gly Asp Glu Phe Thr
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 8
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 17 VH

<400> 8
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Thr Arg
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Ile Tyr Met Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Thr Tyr Pro Tyr Leu Ser Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 18 VL

<400> 9
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gln Phe Ser Phe
 85 90 95
 Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 10
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 18 VH

<400> 10
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Ile Ile Gln Lys Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asn Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>

021512

<223> Кандидат 19 VL
<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Leu Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Val Ser Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 12
<211> 121
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность
<220>
<223> Кандидат 19 VH

<400> 12
Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Trp Val Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Phe Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 108
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность
<220>
<223> Кандидат 1 VL

<400> 13
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Asp Ile Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Leu Ser
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 14
<211> 119
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность
<220>
<223> Кандидат 1 VH

<400> 14
Gly Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Asn
20 25 30
Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Trp Gly Ile Gly Gly Met Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность
<220>
<223> Кандидат 2 VL

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

<210> 16
<211> 116
<212> PRT

021512

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Кандидат 2 VH

<400> 16

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

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Кандидат 3 VL

<400> 17

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

<210> 18

<211> 122

<212> PRT

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Кандидат 3 VH

<400> 18

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

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Кандидат 4 VL

<400> 19

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

<210> 20

<211> 122

<212> PRT

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Кандидат 4 VH

<400> 20

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

<210> 21
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Кандидат 5 VL

<400> 21
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ala Leu Gly Tyr Phe Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Glu Asp Ser Ala Thr
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 22
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Кандидат 5 VH

<400> 22
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Thr Arg
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Ile Tyr Met Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Thr Tyr Pro Tyr Leu Ser Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Кандидат 6 VL

<400> 23
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ala Leu Gly Tyr Phe Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Tyr Asp Ser Asn Ser Leu Thr
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 24
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Кандидат 6 VH

<400> 24
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Thr Arg
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Ile Tyr Met Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Thr Tyr Pro Tyr Leu Ser Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Кандидат 7 VL

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

021512

85 90 95
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 26
<211> 122
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 7 VH

<400> 26
Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Thr Arg
20 25 30
Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Gly Arg Ile Tyr Met Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60
Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80
Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95
Tyr Tyr Cys Ala Arg His Thr Tyr Pro Tyr Leu Ser Phe Asp Val Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27
<211> 108
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 8 VL

<400> 27
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Val
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gln Phe Ser Phe
85 90 95
Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 28
<211> 122
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 8 VH

<400> 28
Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30
Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Gly Ile Ile Gln Thr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60
Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80
Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29
<211> 108
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 9 VL

<400> 29
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Val
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gln Phe Ser Phe
85 90 95
Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 30
<211> 122
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 9 VH

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

021512

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 31
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 10 VL

<400> 31
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Pro Val Tyr Ser
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 32
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 10 VH

<400> 32
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Ile Ile Gln Lys Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asn Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 33
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 11 VL

<400> 33
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Asp Glu Pro Asn Phe Asn
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 34
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 11 VH

<400> 34
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Ile Ile Gln Lys Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asn Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 12 VL

<400> 35
 Asp Ile Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu

021512

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

<210> 36
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 12 VH

<400> 36
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Ile Ile Gln Lys Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asn Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 13 VL

<400> 37
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Leu Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Glu Ser Ile Leu Ser
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 38
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 13 VH

<400> 38
 Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Val Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 39
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 14 VL

<400> 39
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Leu Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Glu Thr Val Ser Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 40
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 14 VH

<400> 40
 Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

021512

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

<210> 41
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 15 VL

<400> 41
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Leu Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Ser Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 42
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 15 VH

<400> 42
 Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Val Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 1 LCDR1

<400> 43
 Gln Tyr Ile Asp Ile Ser Tyr
 1 5

<210> 44
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 1 LCDR2

<400> 44
 Asp Ala Ser
 1

<210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 1 LCDR3

<400> 45
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Leu Ser Ile Thr
 1 5

<210> 46
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 1 HCDR1

<400> 46
 Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Asn Trp
 1 5

<210> 47
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 1 HCDR2

021512

<400> 47
Ile Asp Pro Ser Asp Ser Gln Thr
1 5

<210> 48
<211> 12
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 1 HCDR3

<400> 48
Ala Arg Glu Trp Gly Ile Gly Gly Met Val Asp Ile
1 5 10

<210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 2 LCDR1

<400> 49
Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 50
<211> 3
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 2 LCDR2

<400> 50
Gly Ala Ser
1

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 2 LCDR3

<400> 51
Gln Gln Tyr Asp Asp Phe Ser Ile Thr
1 5

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 2 HCDR1

<400> 52
Gly Tyr Ser Phe Asn Asn Tyr Trp
1 5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 2 HCDR2

<400> 53
Ile Asp Pro Gln Asp Ser Trp Thr
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 2 HCDR3

<400> 54
Ala Arg Asn Ile Tyr Glu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 55
<211> 6
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidates 3,4,5,6, 7 LCDR1

<400> 55
Ala Leu Gly Gly Tyr Phe
1 5

<210> 56
<211> 3
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidates 3,4,5,6, 7 LCDR2

<400> 56
Asp Asp Asp
1

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Candidates 3,4 LCDR3
 <400> 57
 Ala Ser Tyr Asp Gly Asp Glu Phe Thr Val
 1 5 10
 <210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Candidates 3 HCDR1
 <400> 58
 Gly Asp Ser Val Ser Thr Arg Ser Ala Ala
 1 5 10
 <210> 59
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Candidates 3 HCDR2
 <400> 59
 Ile His Arg Arg Ser Lys Tyr Trp Asn Asp
 1 5 10
 <210> 60
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Candidates 3,4,5,6,7 HCDR3
 <400> 60
 Ala Arg His Thr Tyr Pro Tyr Leu Ser Phe Asp Val
 1 5 10
 <210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Candidates 4,5,6,7 HCDR1
 <400> 61
 Gly Asp Ser Val Ser Thr Arg Ser Ala Ala
 1 5 10
 <210> 62
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Candidate 4 HCDR2
 <400> 62
 Ile Ser Tyr Arg Ser Arg Trp Tyr Asn Asp
 1 5 10
 <210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Candidate 5 LCDR3
 <400> 63
 Gln Ser Tyr Asp Glu Asp Ser Ala Thr Val
 1 5 10
 <210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Candidates 5,6,7 HCDR2
 <400> 64
 Ile Tyr Met Arg Ser Lys Trp Tyr Asn
 1 5
 <210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Candidate 6 LCDR3
 <400> 65
 Gly Ser Tyr Asp Ser Asn Ser Leu Thr Val
 1 5 10
 <210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

021512

<220>
 <223> Candidate 7 LCDR3

 <400> 66
 Ser Ser Tyr Asp Ser Asp Ser Leu Thr Val
 1 5 10

 <210> 67
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Candidate 8,9,10,11,12 LCDR1

 <400> 67
 Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr
 1 5

 <210> 68
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Candidate 8,9,10,11,12 LCDR2

 <400> 68
 Glu Asp Ser
 1

 <210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Candidate 8,9 LCDR3

 <400> 69
 Gln Ser Tyr Asp Ser Gln Phe Ser Phe Gly Val
 1 5 10

 <210> 70
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Candidate 78,9,10,11,12 HCDR1

 <400> 70
 Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala
 1 5 10

 <210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Candidate 8 HCDR2

 <400> 71
 Ile Gln Thr Arg Ser Lys Tyr Trp Asn
 1 5

 <210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Candidate 8,9,10,11,12 HCDR3

 <400> 72
 Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 73
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Candidate 9 HCDR2

 <400> 73
 Ile Gln Ile Arg Ser Lys Tyr Trp Asn
 1 5

 <210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Candidate 10 LCDR3

 <400> 74
 Gln Ser Tyr Asp Thr Pro Val Tyr Ser Val
 1 5 10

 <210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

021512

```

<220>
<223> Candidate 10 HCDR2

<400> 75
Ile Gln Lys Arg Ser Lys Tyr Trp Asn
1 5

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidate 11 LCDR3

<400> 76
Ser Ser Tyr Asp Glu Pro Asn Phe Asn Val
1 5 10

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidate 11,12 HCDR2

<400> 77
Ile Gln Lys Arg Ser Lys Trp Tyr Asn
1 5

<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidate 12 LCDR3

<400> 78
Ser Ser Tyr Asp Asp Pro Asn Phe Gln Val
1 5 10

<210> 79
<211> 6
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidate 13, 14, 15 LCDR1

<400> 79
Gln Ser Ile Gly Leu Tyr
1 5

<210> 80
<211> 3
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidate 13, 14, 15 LCDR2

<400> 80
Ala Ala Ser
1

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidate 13 LCDR3

<400> 81
Gln Gln Gly Glu Ser Ile Leu Ser Thr
1 5

<210> 82
<211> 8
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidate 13, 14, 15 HCDR1

<400> 82
Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp
1 5

<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidate 13 HCDR2

<400> 83
Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr
1 5

<210> 84
<211> 14
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidates 13, 14, 15, 15-1, 15-2, 15-3, 15-4, 15-5, 15-7,15-8 HCDR3

```

<400> 84
Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidate 14 LCDR3

<400> 85
Gln Gln Ala Glu Thr Val Ser Pro Thr
1 5

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidate 14, 15 HCDR2

<400> 86
Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr
1 5 10

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidate 15 LCDR3

<400> 87
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Ser Tyr Thr
1 5

<210> 88
<211> 8
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidate 16 HCDR3

<400> 88
Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr
1 5

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Candidate 10 LCDR3

<400> 89
Gln Gln Tyr Gly Ser Val Ser Ile Thr
1 5

<210> 90
<211> 443
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Кандидат 16, полная длина тяжелой цепи

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

021512

325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 340 345 350
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 91
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 17, полная длина тяжелой цепи

<400> 91
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Thr Arg
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Ile Tyr Met Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 80 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Thr Tyr Pro Tyr Leu Ser Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255 80
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 92
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 18, полная длина тяжелой цепи

<400> 92
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Ile Ile Gln Lys Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asn Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

021512

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

<210> 93
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 19, полная длина тяжелой цепи

<400> 93
 Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Val Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 94
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 1, полная длина тяжелой цепи

<400> 94
 Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Asn
 20 25 30
 Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Trp Gly Ile Gly Gly Met Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

021512

165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 95
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 2, полная длина тяжелой цепи

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

130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 260 265 270
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 340 345 350
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 96
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 3, полная длина тяжелой цепи

<400> 96
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Thr Arg
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Ile His Arg Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Thr Tyr Pro Tyr Leu Ser Phe Asp Val Trp

021512

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

<210> 97
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 4, полная длина тяжелой цепи

<400> 97
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Thr Arg
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Lys Ile Ser Tyr Arg Ser Arg Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Thr Tyr Pro Tyr Leu Ser Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 98
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидаты 5, 6, 7, полная длина тяжелой цепи

<400> 98
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

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

<210> 99

<211> 449

<212> PRT

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Кандидат 8, полная длина тяжелой цепи

<400> 99

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

<210> 100
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 9, полная длина тяжелой цепи

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

<210> 101
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидаты 10,11, 12, полная длина тяжелой цепи

<400> 101
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Ile Ile Gln Lys Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asn Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 225 230 235
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430 435
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 102
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидаты 13,14,15,15-7,15-8 полная длина тяжелой цепи

<400> 102
 Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Val Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 103
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> N-концевая лидерная последовательность для экспрессии тяжелых цепи

<400> 103
 Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15
 Ile Gln Ala

<210> 104
 <211> 1401
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Полная длина тяжелых цепей IgG4 Кандидата15EVQ с лидерной последовательностью

<400> 104
 atggcttagg tgtggacctt gclattccctg atggcagctg cccaagtat ccaagcagag 60
 gtgcagctgg tgacagaggg ccgagaggtg asgaagcccg gcgagagcct gaagatcagc 120
 tgcaagggca cgggctacag cttccaaccac tactgggtgg gctgggtgag ccagatgccc 180
 ggcaagggcc tggagtgat gggcttcctc gaccccaagc acagctacac caactacgag 240
 cctagcttcc agggccaggt gaccatcagc gccgcaaga gcatcagcac ccgctacctg 300
 cagtggagca gctgaagggc cagcgacacc gccatgtact actgcccgc cgagctgtac 360
 caggctaca tggcacaggt cgacagctgg ggccaaggca cctgggtgac cgtgagcagc 420
 gcttccaaca agggccctac cgtcttcccc ctggcgcctt gctccaggag caactccagag 480
 agcacagccg cctggggctg cctgtccaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgctg 540
 tggaaactca ggcacctgac cagcgggtg caccacttcc cggctgtcct acagtcctca 600
 ggactact cctcagcag cgtgggtgacc gtgcctcca cagccttggg cacgaaaacc 660
 tacacctgca acgtagatca caagcccaagc aacaccaagg tggcaagag agttgagtc 720
 aaataggttc ccccatgccc accatgcccac gcacctgagg ccgcccgggg accatcagtc 780
 ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcagtactt cccggaccct tgaagtcacg 840
 tgcctggagg tggactgag ccagaagac ccagagctcc agtccaactg gtactgagat 900
 ggcgtgagg tgcataatgc caagacaag ccgagagagg agcagttcaa cagcagctac 960
 cgtatgctca gcctctcac cgtcctgcac caggactgac tgaacggcaa gtagtacaag 1020
 tgcaggctct ccaaaaagg cctccccttc tcatcagaga aaacctctc caaagccaaa 1080
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccagagaga gatgaccaag 1140
 aaccagctca cctgacctg cctggtcaaa ggttctacc ccagcagat cgcctggag 1200
 tggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagca cgcctccctg cctggactcc 1260

gacggctcct tcttctccta cagcagccta acogtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1320
 aatgtctctc catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1380
 ctctccctgt ctctgggtaa a 1401

<210> 105
 <211> 1344
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Тяжелые цепи IgG4 Кандидата 15EVQ без лидерной последовательности

<400> 105
 gaggcagc tggtgcagag cggcggcag gtaagaagc ccggcgagag cctgaagatc 60
 agctcgaag gcagcggcta cagcttcaac aactactggg tggctgggt gcgcaagatg 120
 cccgcgaag gctcggagt gatgggttc atcgaccaca ggcacagata caccactac 180
 ggcctagct tccagggcca ggtgaccate agcggcaca agagcatcag caccgctac 240
 ctgcaatgga gcagcctgaa ggcgacgac accgcatgt actactggc ccgcgagctg 300
 taccagggct acatggacac gttogacagc tggggccag gcaccctgt gaccgtgagc 360
 agcgttcca ccaagggccc atcctgttc ccctggcgc cctgctccag gacgacctcc 420
 gagagcacag ccgcccctgg ctgctggtc aaggactact tcccgaacc ggtgacggtg 480
 tctggaact cagcgcctcc gaccagggc gtcacacct tcccggctg cctacatgcc 540
 tcaagactct actccctcag cagcgtggg acogtgcct ccagcagctt ggcacgaaa 600
 acctacacct gcaactaya tcaaacccc agcaacacca aggtggaca gagagtgag 660
 tccaatag gtcccccatg cccaccatgc ccagcactg agcggccgg gggaccatca 720
 gtcttctgt tcccccaaa aaccaaggac acttcatga tctccggac cctgaggtc 780
 acgtgctgg tggtagcgt gagccaggaa gaccccgag tccagtcaa ctgtagcgtg 840
 gatggctgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgggg aggagcgtt caacagcagc 900
 taccgtggg tcaagcctct caccgtcctg caccagact ggtgaaacgg caaggagtac 960
 aagtgaagg tctccaasa aggcctcccg tctccatcg gaaaaacct ctccaaaacc 1020
 aaagggcagc cctgagagcc acaggtgtac accctgccc catcccaga ggaagtgacc 1080
 aadaaccag tcaactgac ctgctggtc aaaggtctt accccagga caicggcgtg 1140
 gagtgagga gcaatggcca gccggagaac aactacaaga ccaagcctcc cgtgctgac 1200
 tccagcgtc ccttctcct ctacagcag ctaaccctgg acaagagcag gtagcagag 1260
 gggatgtct tctatgctc cgtgatgat gaggtctgc acaaccata cacacagaag 1320
 agctctccc tgtctctggg taaa 1344

<210> 106
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> N-концевая лидерная последовательность для экспрессии легких цепей

<400> 106
 Met Gly Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Asp Ala Arg Cys
 20

<210> 107
 <211> 702
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Полная длина легкой цепи Кандидата 15 с лидерной последовательностью

<400> 107
 atgggtgtgc caactcaggt attaggatta ctgctgtgt ggcttacaga tgcgaagatg 60
 gacatccaga tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggoga ccgctgacc 120
 atcaactgcc gcgccagcca gagcatggc ctgtactctg cctggtacca gcagaagccc 180
 gccaagggcc caaagctgt gatctacgc gccagcagc tgcagagcgg cgtgcccagc 240
 cgtctcagcg gcagcggag cggcaccgac tcaacctga ccaacagcag cctgcagccc 300
 gtagacttcg caactacta ctgcagcag gccaacccc ttagctaac cttggccag 360
 ggcaccaagg tggagatcaa gctacggtg gctgcacct ctgtctcat ctcccgcca 420
 tctgatgagc agttgaatc tggaaactgc tctgttgtt gctcctgaa taacttcat 480
 cccagagagg ccaagatca gtggaagtg gataacgccc tccaatcgg taactccag 540
 gagagtgtca cagagcaga cagcaaggac agcaactaca gctcagcag caccctgagc 600
 ctgagcaaa cagactaca gaaacaaaa gttaacct ctggaagtcac ccatcagggc 660
 ctgagctgc ccgtcaaaa gagcttcaac agggagaggt gt 702

<210> 108
 <211> 642
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Легкая цепь Кандидата 15 без лидерной последовательности (начинается с DIQ)

<400> 108
 gacatccaga tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggoga ccgctgacc 60
 atcaactgcc gcgccagcca gagcatggc ctgtactctg cctgtacca gcagaagccc 120
 gccaagggcc caaagctgt gatctacgcc gccagcagc tgcagagcgg cgtgcccagc 180
 cgtctcagcg gcagcggcag cggcaccgac tcaacctga ccatcagcag cctgcagccc 240
 gagacttcg caactacta ctgcagcag gccaacccc ttagctaac cttggccag 300
 ggcaccaagg tggagatcaa gctacggtg gctgaccat ctgtctcat ctcccgcca 360
 tctgatgagc agtgaatc tggaaactgc tctgttgtt gctgtgtaa taacttcat 420
 cccagagag ccaagatca gtggaagtg gataacgccc tccaatcgg taactccag 480
 gagagtgtca cagagcaga cagcaaggac agcaactaca gctcagcag caccctgagc 540
 ctgagcaaa cagactaca gaaacaaaa gttaacct ctggaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctgc ccgtcaaaa gagcttcaac agggagaggt gt 642

<210> 109
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Смешанная последовательность LCDR1 Кандидатов 15, 15-1, 15-2, 15-3, 15-4, 15-5, 15-6, 15-9

<400> 109
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Leu Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 110
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> LCDR2 Кандидатов 15, 15-1 _ 15-9

<400> 110
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

021512

<210> 111
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Смешанная последовательность HCDR1 Кандидатов 15, 15-1, 15-4, 15-7, 15-8

 <400> 111
 Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Val Gly
 1 5 10

<210> 112
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Смешанная последовательность HCDR2 Кандидатов 15, 15-2, 15-3, 15-6, 15-7, 15-8

 <400> 112
 Phe Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 113
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Смешанная последовательность LCDR3 Кандидатов 15, 15-1 _ 15-9

 <400> 113
 Gln Gln Gly Asn Thr Leu Ser Tyr Thr
 1 5

<210> 114
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> HCDR2 Кандидатов 15-1

 <400> 114
 Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 115
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Candidates 15-2 HCDR1

 <400> 115
 Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 116
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Candidates 15-3, 15-5, 15-6, 15-9 HCDR1

 <400> 116
 Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Ser
 1 5 10

<210> 117
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Candidates 15-4 HCDR2

 <400> 117
 Phe Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 118
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Candidates 15-5, 15-9 HCDR2

 <400> 118
 Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 119
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Candidates 15-6, 15-9 HCDR3

 <400> 119
 Ala Arg Gln Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser
 1 5 10

021512

<210> 120
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Candidates 15-7 LCDR1

<400> 120
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 121
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Candidates 15-8 LCDR1

<400> 121
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Leu Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 122
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Candidates 15-7 VL

<400> 122
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Ser Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 123
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Candidates 15-8 VL

<400> 123
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Leu Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Ser Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 124
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Candidates 15-1 VH

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

<210> 125
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Candidate 15-2 VH

<400> 125
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly

021512

100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 126
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Candidate 15-3 VH

<400> 126
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 127
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Candidate 15-4 VH

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

<210> 128
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Candidate 15-5 VH

<400> 128
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 129
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Candidate 15-6 VH

<400> 129
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 130
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 15-1, полная длина тяжелой цепи

<400> 130
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Val Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430 435
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 131
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 15-2, полная длина тяжелой цепи

<400> 131
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430 435
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 132
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 15-3, полная длина тяжелой цепи

<400> 132
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

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

<210> 133
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 15-4, полная длина тяжелой цепи

<400> 133
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Val Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

021512

<210> 134
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Кандидат 15-5, полная длина тяжелой цепи

<400> 134

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

<210> 135
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Кандидат 15-6, полная длина тяжелой цепи

<400> 135

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

Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys
		435					440						445		

<210> 136
 <211> 40
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Праймер
 <400> 136
 ccttaccsat aatcaactcg agagattacc agccgccaac 40
 <210> 137
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Праймер
 <400> 137
 caagagcttc tattatcaaa caatgagatt caagcgctaa aaagtgaag 49
 <210> 138
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Праймер
 <400> 138
 ccttacacat actcaacctc accgagaata aatctcaaa aatag 45
 <210> 139
 <211> 47
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Праймер
 <400> 139
 gaatctatc ttctctaca cagagccctg cagctgacta ggaactc 47
 <210> 140
 <211> 58
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Праймер
 <400> 140
 gccttcaacg actgatgctc gaggaggtgg ccccttgagaa tgtggatagc tctccttc 58
 <210> 141
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Праймер
 <400> 141
 gtacctgcag ctgtctacga gctcctttgc cttggtccc 39
 <210> 142
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Праймер
 <400> 142
 gcctggagtg gatgggcccg atcgaccsca gcg 33
 <210> 143
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Праймер
 <400> 143
 cgctggggtc gatccggccc atccactoca ggc 33
 <210> 144
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Праймер
 <400> 144
 agaggtaaact cccgttgccg 20
 <210> 145
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Праймер
 <400> 145
 gcactctggcg caccagccg atccagtagt tggggaag 38
 <210> 146
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Праймер
 <400> 146
 agaggtaaact cccgttgccg 20

<210> 147
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Праймер

<400> 147
 gcatctggcg caccsagctg atccsagtagt tgggtgaag 38

<210> 148
 <211> 47
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Праймер

<400> 148
 cgtctggtgt cacgtggccc tggaaagctag ggctgtagtt ggtgtag 47

<210> 149
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Праймер

<400> 149
 cttaaccaaac tactggatca gctgggtgctg ccaagatgc 38

<210> 150
 <211> 40
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Праймер

<400> 150
 cgcscatgtac tactcgcgcc gccagctgta ccaaggctac 40

<210> 151
 <211> 40
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Праймер

<400> 151
 gtacgscctgg tacagctggc gggcgcagta gtacatggcg 40

<210> 152
 <211> 40
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 152
 gccagccaga gcatcagcag ctaccctggcc tggtaaccagc 40

<210> 153
 <211> 40
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Праймер

<400> 153
 gctggtacca ggccaggtag ctgctgatgc tctggctggc 40

<210> 154
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Праймер

<400> 154
 cgggctctctg ctggtaccag ttcaggtagc tgctgatgct ctg 43

<210> 155
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Кандидат 14, полная длина легкой цепи

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

<210> 156
 <211> 214
 <212> PRT

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Кандидат 15, 15-1, 15-2, 15-3, 15-4, 15-5, 15-6, 15-9, полная длина легкой цепи

<400> 156

```

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

```

<210> 157

<211> 214

<212> PRT

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Кандидат 15-7, полная длина легкой цепи

<400> 157

```

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

```

<210> 158

<211> 214

<212> PRT

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Кандидат 15-8, полная длина легкой цепи

<400> 158

```

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

```

<210> 159

<211> 121

<212> PRT

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> VH кандидата 15-9

<400> 159

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

```

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

<210> 160
 <211> 448
 <212> FRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Кандидат 15-9, полная длина тяжелой цепи

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

<210> 161
 <211> 2718
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 161
 atgaagggt gttcctetta tetaatgtac tcccttgggg gactttgttc cctatggatt 60
 ctctcgggtg cttccaacaa ccaatgcact gltgaatata acgtagctga ctcgagccat 120
 ttgaagctaa cacacaacac tgatgatctt ccccttaaca taacagtggt gaatcttact 180
 cacacaacac tcagaagatt accactacc aactttacaa gatacagcca acttgcctac 240
 ttggatgcag gatttaactc catttcaaaa ctggagccag aactgatgcca aatactccct 300
 ttgtgaaag tattgaacct gcaacataat gagctctctc agatttttga tcaaaccttt 360
 gtctctgca cgaacctgac agaactcgat ctaatgtcta actcaataca caaattaaa 420
 agcaaccttt tcaaaaacca gaagaatcta atcaaatagg atttgctcta taatggttta 480
 tcatctacaa agttgggaac gggggtocaa ctgagaacc tccaagaact gctcttagca 540
 aaaaataaaa tcttgcggtt gcaagtgaa gaacttgagt ttcttggcaa ttctctttaa 600
 cgaagttgg acttgcctc aaatccactt aaagattctt ccccggggtg ttccagaca 660
 atggcaagt tattgcctc cctcttgaac aacgccaac tgaaccccca cctcacagag 720
 aagctttgct ggaactttc aaacacaagc atccagaatc tctctctggc taacaaccag 780
 ctgctggcca ccagcgagag cactttctct gggctgaagt ggacaatct caaccagctc 840
 gatcttctct acacaacct ccatgatgc ggaacggtt cctctctcta tctccaagc 900
 ctgaggtatc tgtcttggga gtaacaacat atacaagctc tgtccctctg ctcttttat 960
 ggactctcca accctgagta cctgagtttg aagcgagcat ttaactaagca aagtgttcca 1020
 cttgcttccac atcccaacat tgacgatttt tctttcaat ggttaaaata ttggaatat 1080
 ctaacatggt atgacaataa tattccaagt accaaaagca ataccttcc gggatgggtc 1140
 agtctgaagt acctaaagct ttccaaaact ttcaaaagt tgcaaacctt acaaatgaa 1200
 acatttgggt caactgctca ttctcccttg ctcaacttca acttaacgaa aaatcacatc 1260
 tcaaaaatag caaatggtag ttctcttgg ttaggccaac tcaggatact tgatctcgcc 1320
 cttaatgaaa tgaacaaaa acctagcgcc caggaatgga gaggtctgag aaatatatt 1380
 gagacttacc tatctataa caataacctc caactgtcta ccaagtctct tgcattggtc 1440
 cccagcttcc aaagactgat gctcaggagg gtgcccctta aaaaatggga tatctccctc 1500
 tcaactttcc gccctcttgg taacttgacc attctggact taagcaacaa caacatagcc 1560
 aacataaatg agacttctgt ggaaggtctt gagaatccag aatctctgga ttltcaagcc 1620
 aataacttag ccaggtcttg gaaccggcga aaccctgtg gctcccttta ttctcgaag 1680
 gggctgtctc accccaactc ctgaaatta ggtccaacg ctttagatga aatccagtc 1740
 ggggttttca agaactattt cgaactaaag agcatcaatc taggactgaa taacttaaac 1800
 aaactgaaac cattcatitt tgatgaccag acatctctaa ggtcactgaa cctccagaag 1860
 aacctcaaaa catctgttga gaagatgatt ttccggccgc cttttcaaaa cctgaacagt 1920
 ttagatagtc gcttcaatcc gttcgactgc acgtgtgaaa gtatttctct gtttgttaac 1980
 ttgatcaacc agaccacaac taatatctct gagctgtcca cctcaacct ctgtaacct 2040
 cccatcattt attatggctt ccccttgaag cttttcgata catcatctct taaagacagc 2100
 gccctcttgg aactctctct cataatcagc acaagtatgc tctgtgtttt tatactgtg 2160
 gtactgctca tcaacatoga gggctggagg atctcttttt actggaatgt tcaagtgc 2220
 cggattctgt gtttcaagaa aatagacaca cagctgtagc agtttgaata tacagcctac 2280
 ataattcatg ccaataaaga cacagactgg gttctgggac atttctccc aatggaagaa 2340
 caagaccaat ctctcaaat ttgcttagaa gaaagggact ttgaagcagc cgtccttga 2400

cttgaagcaa ttgtaaatg catcaaaaaga agccgaaaaa tcattttcgt tatcacacac 2460
 cattatttaa aagaccctct gtgcagaaga tccaaggtac atcacgcagt tcagcaagct 2520
 attgagcaaa atctggattc aattactact attttctccc agaattatcc agattataaa 2580
 ctaaacatg cactctgttt gogaagagga atgtttaaat ctcatgcat cttgaactgg 2640
 coagttcaga aagaacggat aaatgccttt catcataat tgcaagtagc acttggatct 2700
 cgaattcag cacattaa 2718

<210> 162
 <211> 905
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 162
 Met Lys Gly Cys Ser Ser Tyr Leu Met Tyr Ser Phe Gly Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Trp Ile Leu Leu Val Ser Ser Thr Asn Gln Cys Thr Val Arg
 20 25 30
 Tyr Asn Val Ala Asp Cys Ser His Leu Lys Leu Thr His Ile Pro Asp
 35 40 45
 Asp Leu Pro Ser Asn Ile Thr Val Leu Asn Leu Thr His Asn Gln Leu
 50 55 60
 Arg Arg Leu Pro Thr Thr Asn Phe Thr Arg Tyr Ser Gln Leu Ala Ile
 65 70 75 80
 Leu Asp Ala Gly Phe Asn Ser Ile Ser Lys Leu Glu Pro Glu Leu Cys
 85 90 95
 Gln Ile Leu Pro Leu Leu Lys Val Leu Asn Leu Gln His Asn Glu Leu
 100 105 110
 Ser Gln Ile Ser Asp Gln Thr Phe Val Phe Cys Thr Asn Leu Thr Glu
 115 120 125
 Leu Asp Leu Met Ser Asn Ser Ile His Lys Ile Lys Ser Asn Pro Phe
 130 135 140
 Lys Asn Gln Lys Asn Leu Ile Lys Leu Asp Leu Ser His Asn Gly Leu
 145 150 155 160
 Ser Ser Thr Lys Leu Gly Thr Gly Val Gln Leu Glu Asn Leu Gln Glu
 165 170 175
 Leu Leu Leu Ala Lys Asn Lys Ile Leu Ala Leu Arg Ser Glu Glu Leu
 180 185 190
 Glu Phe Leu Gly Asn Ser Ser Leu Arg Lys Leu Asp Leu Ser Ser Asn
 195 200 205
 Pro Leu Lys Gln Phe Ser Pro Gly Cys Phe Gln Thr Ile Gly Lys Leu
 210 215 220
 Phe Ala Leu Leu Leu Asn Asn Ala Gln Leu Asn Pro His Leu Thr Glu
 225 230 235 240
 Lys Leu Cys Trp Glu Leu Ser Asn Thr Ser Ile Gln Asn Leu Ser Leu
 245 250 255
 Ala Asn Asn Gln Leu Leu Ala Thr Ser Glu Ser Thr Phe Ser Gly Leu
 260 265 270
 Lys Trp Thr Asn Leu Thr Gln Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Asn Leu His
 275 280 285
 Asp Val Gly Asn Gly Ser Phe Ser Tyr Leu Pro Ser Leu Arg Tyr Leu
 290 295 300
 Ser Leu Glu Tyr Asn Asn Ile Gln Arg Leu Ser Pro Arg Ser Phe Tyr
 305 310 315 320
 Gly Leu Ser Asn Leu Arg Tyr Leu Ser Leu Lys Arg Ala Phe Thr Lys
 325 330 335
 Gln Ser Val Ser Leu Ala Ser His Pro Asn Ile Asp Asp Phe Ser Phe
 340 345 350
 Gln Trp Leu Lys Tyr Leu Glu Tyr Leu Asn Met Asp Asp Asn Asn Ile
 355 360 365
 Pro Ser Thr Lys Ser Asn Thr Phe Thr Gly Leu Val Ser Leu Lys Tyr
 370 375 380
 Leu Ser Leu Ser Lys Thr Phe Thr Ser Leu Gln Thr Leu Thr Asn Glu
 385 390 395 400
 Thr Phe Val Ser Leu Ala His Ser Pro Leu Leu Thr Leu Asn Leu Thr
 405 410 415
 Lys Asn His Ile Ser Lys Ile Ala Asn Gly Thr Phe Ser Trp Leu Gly
 420 425 430
 Gln Leu Arg Ile Leu Asp Leu Gly Leu Asn Glu Ile Glu Gln Lys Leu
 435 440 445
 Ser Gly Gln Glu Trp Arg Gly Leu Arg Asn Ile Phe Glu Ile Tyr Leu
 450 455 460
 Ser Tyr Asn Lys Tyr Leu Gln Leu Ser Thr Ser Ser Phe Ala Leu Val
 465 470 475 480
 Pro Ser Leu Gln Arg Leu Met Leu Arg Arg Val Ala Leu Lys Asn Val
 485 490 495
 Asp Ile Ser Pro Ser Pro Phe Arg Pro Leu Arg Asn Leu Thr Ile Leu
 500 505 510
 Asp Leu Ser Asn Asn Asn Ile Ala Asn Ile Asn Glu Asp Leu Leu Glu
 515 520 525
 Gly Leu Glu Asn Leu Glu Ile Leu Asp Phe Gln His Asn Asn Leu Ala
 530 535 540
 Arg Leu Trp Lys Arg Ala Asn Pro Gly Gly Pro Val Asn Phe Leu Lys
 545 550 555 560
 Gly Leu Ser His Leu His Ile Leu Asn Leu Glu Ser Asn Gly Leu Asp
 565 570 575
 Glu Ile Pro Val Gly Val Phe Lys Asn Leu Phe Glu Leu Lys Ser Ile
 580 585 590
 Asn Leu Gly Leu Asn Asn Leu Asn Lys Leu Glu Pro Phe Ile Phe Asp
 595 600 605
 Asp Gln Thr Ser Leu Arg Ser Leu Asn Leu Gln Lys Asn Leu Ile Thr
 610 615 620
 Ser Val Glu Lys Asp Val Phe Gly Pro Pro Phe Gln Asn Leu Asn Ser
 625 630 635 640
 Leu Asp Met Arg Phe Asn Pro Phe Asp Cys Thr Cys Glu Ser Ile Ser
 645 650 655
 Trp Phe Val Asn Trp Ile Asn Gln Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Leu
 660 665 670
 Ser Thr His Tyr Leu Cys Asn Thr Pro His His Tyr Tyr Gly Phe Pro
 675 680 685
 Leu Lys Leu Phe Asp Thr Ser Ser Cys Lys Asp Ser Ala Pro Phe Glu
 690 695 700
 Leu Leu Phe Ile Ile Ser Thr Ser Met Leu Leu Val Phe Ile Leu Val
 705 710 715 720
 Val Leu Leu Ile His Ile Glu Gly Trp Arg Ile Ser Phe Tyr Trp Asn
 725 730 735
 Val Ser Val His Arg Ile Leu Gly Phe Lys Glu Ile Asp Thr Gln Ala
 740 745 750
 Glu Gln Phe Glu Tyr Thr Ala Tyr Ile Ile His Ala His Lys Asp Arg
 755 760 765
 Asp Trp Val Trp Glu His Phe Ser Pro Met Glu Glu Gln Asp Gln Ser
 770 775 780
 Leu Lys Phe Cys Leu Glu Glu Arg Asp Phe Glu Ala Gly Val Leu Gly
 785 790 795 800
 Leu Glu Ala Ile Val Asn Ser Ile Lys Arg Ser Arg Lys Ile Ile Phe
 805 810 815
 Val Ile Thr His His Leu Leu Lys Asp Pro Leu Cys Arg Arg Phe Lys
 820 825 830
 Val His His Ala Val Gln Gln Ala Ile Glu Gln Asn Leu Asp Ser Ile
 835 840 845
 Ile Leu Ile Phe Leu Gln Asn Ile Pro Asp Tyr Lys Leu Asn His Ala
 850 855 860
 Leu Cys Leu Arg Arg Gly Met Phe Lys Ser His Cys Ile Leu Asn Trp
 865 870 875 880
 Pro Val Gln Lys Glu Arg Ile Asn Ala Phe His His Lys Leu Gln Val
 885 890 895
 Ala Leu Gly Ser Arg Asn Ser Ala His
 900 905

<210> 163
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<400> 163
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Gly
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ser Asn Ser Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Arg Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Arg Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 164
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<400> 164
 Glu Val Gln Leu Val Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ala Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Pro Met Glu Tyr Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Lys Ser Asp Gly Ser Lys Val Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Asn Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Asn Arg Asp Ile Gly Pro Asp Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Pro Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 165
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Гибрид варибельной области крысы и постоянной области мыши

<400> 165
 Met Gly Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Ile Thr
 1 5 10 15
 Asp Ala Ile Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Leu Gly Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
 50 55 60
 Gln Leu Leu Ile Tyr Asp Ser Asn Ser Leu His Thr Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Arg Ile Asn
 85 90 95
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr
 100 105 110
 Asp Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 130 135 140
 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 165 170 175
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 195 200 205
 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 210 215 220
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230

<210> 166
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Hybrid of rat variable region and mouse constant region

<400> 166
 Met Lys Leu Arg Leu Ser Leu Ile Phe Ile Cys Ala Leu Leu Lys Asp
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asp Tyr Trp Met Ala Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Pro Met
 50 55 60
 Glu Tyr Ile Gly Asp Ile Lys Ser Asp Gly Ser Lys Val Asn Tyr Ala
 65 70 75 80
 Pro Ser Leu Lys Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Thr
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Asn Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Asn Arg Asp Ile Gly Pro Asp Trp Tyr Phe Asp Phe Trp
 115 120 125
 Gly Pro Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
 130 135 140
 Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met
 145 150 155 160
 Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175
 Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190
 Ala Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His
 210 215 220
 Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys

021512

225 230 235 240
 Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
 245 250 255
 Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
 260 265 270
 Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
 275 280 285
 Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 290 295 300
 Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
 305 310 315 320
 Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
 325 330 335
 Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 340 345 350
 Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
 355 360 365
 Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
 370 375 380
 Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
 385 390 395 400
 Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn
 405 410 415
 Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
 420 425 430
 Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
 435 440 445
 Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 167
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<400> 167
 Met Gly Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Ile Thr
 1 5 10 15
 Asp Ala Ile Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Leu Gly Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
 50 55 60
 Gln Leu Leu Ile Tyr Asp Ser Asn Ser Leu His Thr Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Arg Ile Asn
 85 90 95
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr
 100 105 110
 Asp Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 130 135 140
 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 165 170 175
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 195 200 205
 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 210 215 220
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230

<210> 168
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<400> 168
 Met Lys Leu Arg Leu Ser Leu Ile Phe Ile Cys Ala Leu Leu Lys Asp
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asp Tyr Trp Met Ala Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Pro Met
 50 55 60
 Glu Tyr Ile Gly Asp Ile Lys Ser Asp Gly Ser Lys Val Asn Tyr Ala
 65 70 75 80
 Pro Ser Leu Lys Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Thr
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Asn Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Asn Arg Asp Ile Gly Pro Asp Trp Tyr Phe Asp Phe Trp
 115 120 125
 Gly Pro Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
 130 135 140
 Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met
 145 150 155 160
 Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175
 Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190
 Ala Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His
 210 215 220
 Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
 225 230 235 240
 Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
 245 250 255
 Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
 260 265 270
 Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
 275 280 285
 Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 290 295 300
 Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
 305 310 315 320
 Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
 325 330 335
 Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 340 345 350
 Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
 355 360 365
 Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
 370 375 380
 Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
 385 390 395 400
 Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn
 405 410 415
 Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp

021512

	420	425	430	
Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His				
	435	440	445	
Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys				
	450	455	460	

<210> 169
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза TLR3

<400> 169
 gaagaactgg atatctttgc cgttcctatct ttaaaaaaat tagagttg 48

<210> 170
 <211> 44
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 170
 gtcctctaca aaattaggaa ctgcggttca gctggaaaat ctcc 44

<210> 171
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 171
 ctcataatgg ctgtctatct acagaattag gaactcaggt tcagc 45

<210> 172
 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 172
 gaaaattaaa aataatccct ttgtcaagca ggagaattta atcacattag atctgtc 57

<210> 173
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 173
 gaaaattaaa aataatccct ttgtcgagca gaagaattta atcacattag 50

<210> 174
 <211> 52
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 174
 saaaaatta aaaataatcc ctttgcaag sagaagaatt taatcacatt ag 52

<210> 175
 <211> 47
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 175
 csaactcaat cagaaaaatt aaagctaadc cctttgtcaa gcagaag 47

<210> 176
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 176
 saatgagcta tctcaacttt ctctgtaaac ctttgcttc tgcac 45

<210> 177
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 177
 gtcttgagaa actagaaaatt ctcaagttgc agcataaaa cttagcac 48

<210> 178
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 178
 cttgagaaac tagaaattct cgcattgcag cataacaact tagcac 46

<210> 179
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 179
 ctaaagtcac tgaaccttca ggagaatctc ataacatccg ttg 43

021512

<210> 180
 <211> 47
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

 <400> 180
 ctctaaagcc attgaacctt caggcgaatc tcataacatc cgttgag 47

 <210> 181
 <211> 37
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

 <400> 181
 ccacatcctt aacttgaggt ccaacggctt tgacgag 37

 <210> 182
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

 <400> 182
 gaaattctcg atttgcagca taacgcctta gcacggctct ggaaac 46

 <210> 183
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

 <400> 183
 gagaactag aaattctcga ttggcgcat aacaacttag cacggc 46

 <210> 184
 <211> 44
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

 <400> 184
 ctagaaattc tcgattgca ggaaaacaac ttagcacggc tctg 44

 <210> 185
 <211> 44
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

 <400> 185
 ctagaaattc tcgattgca ggctaacaac ttagcacggc tctg 44

 <210> 186
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

 <400> 186
 cattctggat ctaagcaaca acgscatagc caacataaat gatgac 46

 <210> 187
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

 <400> 187
 gaaaatattt tcgaaatcta tctttccgcc aacaagtacc tgcagctgac 50

 <210> 188
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

 <400> 188
 gcctcaacg actgatgctg aaaggggtgc ccttaaaaat g 41

 <210> 189
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

 <400> 189
 ctccaacgac tgatgctccg agaggtggcc cttaaaaatg tgg 43

 <210> 190
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

 <400> 190
 cgaatctat ctttctaca acgagtacct gcagctgact ag 42

 <210> 191
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Консенсусная последовательность для семейства 17 LCDR3

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (1)
 <223> Где Хаа может быть Ала, Глн, Гли или Сер

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (5)
 <223> Где Хаа может быть Глу, Гли или Сер

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (6)
 <223> Где Хаа может быть Асп или Асн

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (7)
 <223> Где Хаа может быть Глу или Сер

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (8)
 <223> Где Хаа может быть Фен, Ала или Лей

<400> 191
 Хаа Ser Tyr Asp Хаа Хаа Хаа Хаа Thr Val
 1 5 10

<210> 192
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Консенсусная последовательность для семейства 17 HCDR2

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (1)
 <223> Где Хаа может быть Арг или Лиз

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (3)
 <223> Где Хаа может быть Тир, Гис или Сер

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (4)
 <223> Где Хаа может быть Мет, Арг или Тир

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (7)
 <223> Где Хаа может быть Лиз или Арг

<400> 192
 Хаа Ile Хаа Хаа Arg Ser Хаа Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Ser

<210> 193
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Консенсусная последовательность для семейства 18B LCDR3

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (1)
 <223> Где Хаа может быть Глн или Сер

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (5)
 <223> Где Хаа может быть Тре, Глу или Асп

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (7)
 <223> Где Хаа может быть Вал или Асн

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (8)
 <223> Где Хаа может быть Тир или Фен

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (9)
 <223> Где Хаа может быть Сер, Асн или Глн

<400> 193
 Хаа Ser Tyr Asp Хаа Pro Хаа Хаа Хаа Val
 1 5 10

<210> 194
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Консенсусная последовательность для семейства 18B HCDR3

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (4)
 <223> Где Хаа может быть Лиз, Тре или Иле

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (11)
 <223> Где Хаа может быть Асн или Асп

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (14)
 <223> Где Хаа может быть Вал или Лей

021512

<400> 194

Ile Ile Gln Xaa Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Xaa Tyr Ala Xaa Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Ser

<210> 195

<211> 9

<212> PRT

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность для семейства 19 Lcdr3

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (3)

<223> Где Xaa может быть Тир, Глу или Ала

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (4)

<223> Где Xaa может быть Глу, Гли или Асп

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (5)

<223> Где Xaa может быть Сер или Тре

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (6)

<223> Где Xaa может быть Вал, Иле или Лей

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (7)

<223> Где Xaa может быть Сер или Лей

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (8)

<223> Где Xaa может быть Иле, Сер, Про или Тир

<400> 195

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
 1 5

<210> 196

<211> 17

<212> PRT

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность для семейства 19 HCDR2

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (1)

<223> Где Xaa может быть Фен или Арг

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (12)

<223> Где Xaa может быть Ала или Сер

<400> 196

Xaa Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Xaa Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 197

<211> 107

<212> PRT

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность переменной области легкой цепи семейства 17

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (88)

<223> Где Xaa может быть Ала, Гли, Гли или Сер

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (92)

<223> Где Xaa может быть Глу, Гли или Сер

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (93)

<223> Где Xaa может быть Асп или Асп

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (94)

<223> Где Xaa может быть Глу или Сер

<220>

<221> Прочие приложения

<222> (95)

<223> Где Xaa может быть Фен, Ала или Лей

<400> 197

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

<210> 198
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Консенсусная последовательность вариательной области тяжелой цепи семейства 17

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (52)
 <223> Где Хаа может быть Арг или Лиз

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (54)
 <223> Где Хаа может быть Тир, Лис или Сер

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (55)
 <223> Где Хаа может быть Мет, Арг или Тир

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (58)
 <223> Где Хаа может быть Лиз или Арг

<400> 198
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Thr Arg
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Xaa Ile Xaa Xaa Arg Ser Xaa Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Thr Tyr Pro Tyr Leu Ser Phe Asp Val Tyr
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 199
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Консенсусная последовательность вариательной области легкой цепи семейства 18B

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (88)
 <223> Где Хаа может быть Глн или Сер

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (92)
 <223> Где Хаа может быть Тре, Глу или Асп

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (94)
 <223> Где Хаа может быть Вал или Асн

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (95)
 <223> Где Хаа может быть Тир или Фен

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (96)
 <223> Где Хаа может быть Сер, Асн или Глн

<400> 199
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Tyr Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Ser Tyr Asp Xaa Pro Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 200
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Консенсусная последовательность вариательной области тяжелой цепи семейства 18A и 18B

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (55)
 <223> Где Хаа может быть Лиз, Тре или Иле

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (62)
 <223> Где Хаа может быть Асн или Асп

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (63)
 <223> Где Хаа может быть Вал или Лей

021512

<400> 200
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Ile Ile Gln Xaa Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Xaa Tyr Ala
 50 55 60
 Xaa Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 201
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Консенсусная последовательность вариабельной области легкой цепи семейства 19

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (91)
 <223> Где Xaa может быть Тир, Глу или Ала

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (92)
 <223> Где Xaa может быть Глу, Гли или Асп

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (93)
 <223> Где Xaa может быть Сер или Тре

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (94)
 <223> Где Xaa может быть Вал, Иле или Лей

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (95)
 <223> Где Xaa может быть Сер или Лей

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (96)
 <223> Где Xaa может быть Иле, Сер, Про или Тир

<400> 201
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Leu Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 202
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Консенсусная последовательность вариабельной области тяжелой цепи семейства 19

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (50)
 <223> Где Xaa может быть Фен или Арг

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (61)
 <223> Где Xaa может быть Ала или Сер

<400> 202
 Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Val Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Xaa Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Xaa Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 203
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Полная длина консенсусной последовательности легкой цепи, семейство 17

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (88)
 <223> Где Xaa может быть Ала, Гли, Гли или Сер

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (92)
 <223> Где Хаа может быть Глу, Гли или Сер

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (93)
 <223> Где Хаа может быть Асп или Асн

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (94)
 <223> Где Хаа может быть Глу или Сер

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (95)
 <223> Где Хаа может быть Фен, Ала или Лей

<400> 203
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ala Leu Gly Gly Tyr Phe Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Ser Tyr Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 204
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Полная длина консенсусной последовательности тяжелой цепи, семейство 17

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (52)
 <223> Где Хаа может быть Арг или Лиз

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (54)
 <223> Где Хаа может быть Тир, Гис или Сер

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (55)
 <223> Где Хаа может быть Мет, Арг или Тир

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (58)
 <223> Где Хаа может быть Лиз или Арг

<400> 204
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Thr Arg
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Xaa Ile Xaa Xaa Arg Ser Xaa Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Thr Tyr Pro Tyr Leu Ser Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 205
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Полная длина консенсусной последовательности легкой цепи, семейство 18B

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (88)
 <223> Где Xaa может быть Глн или Сер
 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (92)
 <223> Где Xaa может быть Тре, Глу или Асп
 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (94)
 <223> Где Xaa может быть Вал или Асп
 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (95)
 <223> Где Xaa может быть Тир или Фен
 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (96)
 <223> Где Xaa может быть Сер, Асп или Глн

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

<210> 206
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> Полная длина консенсусной последовательности тяжелой цепи, семейство 18A
 и 18B
 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (55)
 <223> Где Xaa может быть Лиз, Тре или Иле
 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (62)
 <223> Где Xaa может быть Асп или Асп
 <220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (65)
 <223> Где Xaa может быть Вал или Лей

<400> 206
 Gln Val Glu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Ile Ile Gln Xaa Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Xaa Tyr Ala
 50 55 60
 Xaa Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335

 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 207
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Полная длина консенсусной последовательности легкой цепи, семейство 19

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (91)
 <223> Где Хаа может быть Тир, Глу или Ала

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (92)
 <223> Где Хаа может быть Ала или Сер

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (93)
 <223> Где Хаа может быть Сер или Тре

<220>

<221> Прочие приложения
 <222> (94)
 <223> Где Хаа может быть Вал, Иле или Лей

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (95)
 <223> Где Хаа может быть Сер или Лей

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (96)
 <223> Где Хаа может быть Иле, Сер, Про или Тир

<400> 207
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Leu Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 208
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Полная длина консенсусной последовательности тяжелой цепи семейства 19

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (50)
 <223> Где Хаа может быть Фен или Арг

<220>
 <221> Прочие приложения
 <222> (61)
 <223> Где Хаа может быть Ала или Сер

<400> 208
 Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Val Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Xaa Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Xaa Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 209
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Варибельная область легкой цепи варианта QSV Кандидата 9

<400> 209
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gln Phe Ser Phe
 85 90 95
 Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 210
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Варибельная область легкой цепи варианта QSV Кандидата 10

<400> 210
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gln Phe Ser Phe
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 211
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Варибельная область легкой цепи варианта QSV Кандидата 12

<400> 211
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu

021512

65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Asp Asp Pro Asn Phe Gln
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 212
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Варибельная область тяжелой цепи варианта QVQ Кандидата 9

<400> 212
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly ile ile Gln ile Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Leu Ser Val Lys Ser Arg ile Thr ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 213
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Варибельная область тяжелой цепи варианта QVQ Кандидата 10

<400> 213
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly ile ile Gln Lys Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asn Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg ile Thr ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 214
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Варибельная область тяжелой цепи варианта QVQ Кандидата 12

<400> 214
 Gln Val Gln Leu Val Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly ile ile Gln Lys Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asn Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg ile Thr ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 215
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Вариант EVQ кардиата 14

<400> 215
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Val Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Phe ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr ile Ser Ala Asp Lys Ser ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 216
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Вариант EVQ кардиата 15

<400> 216
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

021512

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

<210> 217
 <211> 2712
 <212> ДНК
 <213> Macaca fascicularis

<400> 217
 atgagacaga ctttgcccta taactacttt tggtagggac ttitgcoctt lgggatgctg 60
 tggatccct ccaccaacaa atgactgttt agccaagaag ttgctgactg cagccacctg 120
 aagttaacct aggtaccoga tggctccccc acaaacataa cagtggtgaa tcttaccctat 180
 agcttaactac gactgtgctt cccagggctg gaccttaaaa atgtaggact atcttcttga 240
 gatgttagat ttaactccat ctcaaaactg gaggccagat ttgctcaaaa acttcccatg 300
 ttaaaagtgt tgaacctcca gcacaatgag ctatctcaac ttctgataa aacttttgcc 360
 ttctgcacga atttgacgga actccatctc atgtccaact caatccagaa aataaaaaat 420
 aatccctttg taagcagaaa gaatttaatc acattagatc tgtctcaata tggcttgaca 480
 tctcaaaaat taggaactca ggttcagctg gaaaatctcc aagagcttct attatcaaac 540
 aataaaatcc aagcgtctaa aagtgaagaa ctgtgtatcc ttgccaattc atcttataaa 600
 aagtttagat tgcctatgaa tcaaatataa gattttcttc cagggtgttt tcaagcaatt 660
 ggaagattat tgggcctctt tctgaacaat gtccaactga gtccccgctt cacagagaag 720
 ctatgtttgg aattagcaaa cacaagcgtt cggaaatctgt ctctgagtaa cagccagctg 780
 tccaccacca gcaatcaaac ttctctgaga ctaaaagtga caaactcac tagctcgat 840
 ctctccaca acaacttaaa tgtgattggt aacgattcct ttgtttgct tccaacicta 900
 gaatatttct tctggagta taataataa cagctattgc tctctcactc ttgcaagcgg 960
 ctlttcaag tccgtactt gaatttgaaa cgtctttita ctaaacaaag talttccctt 1020
 gcttgcctcc caagattga tgattttct ttctgtgctc taacatgltt ggagcaacct 1080
 aacatggaag ataagatatt ttcaggcata aaaagcaata tggttcacagg attgataaac 1140
 ctgaataact taagtctatc caactccttt acaagtttgc aaacttgac aatgaacaca 1200
 ttgtctcac ttgctcattc tcccttacac atactcaacc taaccaagaa taaaatctca 1260
 aaaaatgaga gtggtgctct ctctgtggtg ggcacactag aagtaactga cttggcctct 1320
 aatgaattg ggcagaactc cacagggcag gaatggagtg gtctagaaaa taltttccaa 1380
 atctatcttt cctcaacaaa gtacctgcaa ctgactaaga actcctttgc cttggtccga 1440
 agcttaactac gactgtgctt cccagggctg gaccttaaaa atgtaggact atcttcttca 1500
 cacttccagc ctctgtgtaa cctgacctat ctggactcaa gcaacaacaa catagccaac 1560
 ataatgatg acatgttggg aggtcttggg aaactgaaa ttctggattt gcagcataac 1620
 aactagcac ggccttgaaa acacgcaaac cctgtgtgct ctgtttattt cctaaaggtg 1680
 ctgtctcaac tccacatcct taacttggag tctaatggct ttgacagat cccagttgag 1740
 gtcttcaagg atttatctga actaaagatc atgtatttag gattgaataa ttaaacaca 1800
 cttccagcgt ctgtctttga taactcaggt tctctaaagt cattgaacct tcaagaagat 1860
 ctataacat cagttgagaa gaaggttttc gggccagctt tcaagaaact gactaaacta 1920
 gatagcgtc ttaactcctt tgattgcaaa tgtgaaagta ttgctgtgtt tgtaattgg 1980
 attaacaaga cccacgcaaa catcctctgag ctgtcaagcc actacctttg caaacctcca 2040
 cccactatc atgggttccc agtgagactt ttgtacatc catctctgaa agacagtgcc 2100
 cctttgaac tctcttcat gatcaaac agtatcctgt tgatttira ctgtgtga 2160
 ctctctatcc actttgaggg ctggaggata tcttttact ggaatgttcc agtaacatga 2220
 gttctgtgt tcaaaagaat agacagcagc acagaacagt tgaatatgc agcatataa 2280
 attcaagccc ataaagataa ggattgggtc tgggaacatt tctctcaat ggaagaagaa 2340
 gaccaatctc tcaaattttg tctggaagaa agggactttg aggcaggtgt ttttgaactg 2400
 gaagcaatg ttaacagcat caaagaagc agaaaaatta tttttattat aacacacat 2460
 ctattaaag acccattatg caaagatcc aaggtacatc atgccttcca acaagctatt 2520
 gaacaaaac tggattccat tatattgatt tctcttgagg agattccaga ttataaactg 2580
 aaccatgac tctgtttgag aagagaagat ttaaatctc actgcatcct gaactggcca 2640

gtcagaag aacggatagg tgccttcat cataaactgc aagtagcact tggatccaaa 2700
 aactcagtaac at 2712

<210> 218
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Полная длина тяжелой цепи кандидата 9 EVQ с S229P, F235A/L236A

<400> 218
 Glu Val Gln Leu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Ile Ile Gln Ile Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Leu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys

021512

405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 219
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Тяжелая цепь кандидатов 10EVO, 12EVQ с S229P, F235A/L236A

<400> 219
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Ile Ile Gln Lys Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asn Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Pro Phe Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 220
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Полная длина тяжелой цепи варианта EVQ mAb14 и mAb15 S229P, F235A/L236A

<400> 220
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Val Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Glu Leu Tyr Gln Gly Tyr Met Asp Thr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 221
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 221
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
 85 90 95

<210> 222
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 222
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg

<210> 223
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 223
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 85

<210> 224
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 224
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg
 100

<210> 225
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Замена P95S из легкой цепи mAb 15

<400> 225
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Leu Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 226
<211> 9
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> mAb 15-10 LCDR3

<400> 226
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 227
<211> 214
<212> PRT
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Легкая цепь mAb 15-10

<400> 227
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Leu Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 228
<211> 33
<212> ДНК
<213> Синтетическая последовательность

<220>
<223> Праймер для мутагенеза для mAb 15-10

<400> 228
cagggcaaca cactgacctt caccttcgac cag 33

<210> 229
<211> 33
<212> ДНК
Синтетическая последовательность

<220>
<223> Праймер для мутагенеза для mAb 15-10

<400> 229
ctggccgaag gtgtagggca gggtgttgcc ctg 33

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированное антитело или его фрагмент, способное реагировать с TLR3, содержащее вари-
бельную область тяжелой и легкой цепи, где антитело содержит:

- a) варибельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 214; или
- b) варибельную область легкой цепи SEQ ID NO: 211; или
- c) варибельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 214 и варибельную область легкой цепи SEQ ID NO: 211; или
- d) аминокислотные последовательности гиперварибельных участков (CDR) 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) тяжелой цепи, представленные SEQ ID NO: 70, 77 и 72, или
- e) аминокислотные последовательности гиперварибельных участков (CDR) 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) легкой цепи, представленные SEQ ID NO: 67, 68 и 78, или
- f) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи, представленные SEQ ID NO: 70, 77 и 72, и аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи, представленные SEQ ID NO: 67, 68 и 78, или

г) вариабельную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична вариабельной области, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214, или

h) вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична вариабельной области, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211.

2. Изолированное антитело или его фрагмент по п.1, где антитело является полностью человеческим или адаптированным для человека.

3. Изолированное антитело или его фрагмент по п.1 или 2, имеющее изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

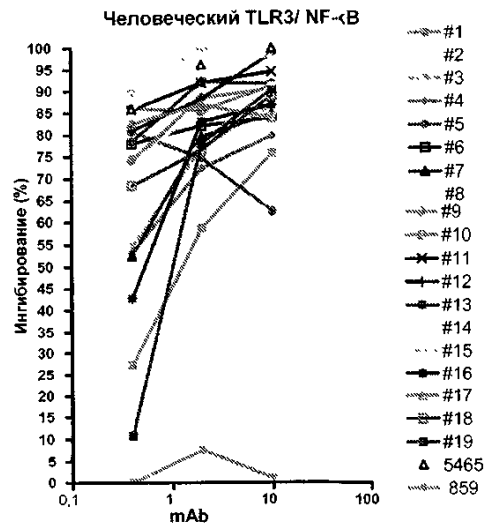
4. Выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела по пп.1-3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214.

5. Выделенный полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела по пп.1-3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211.

6. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.4 или 5.

7. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.6.

8. Способ получения антитела, способного реагировать с TLR3, включающий культивирование клетки-хозяина по п.7 и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.



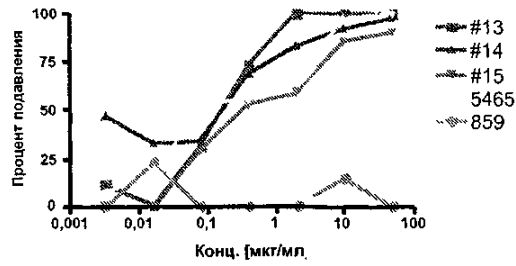
Фиг. 1

mAb (мкг/мл)	IL6	IP-10	RANTES	MCP-1	IL8
#1 10	36	66	11	23	34
2	30	65	38	19	35
0.4	10	34	9	14	20
#2 10	35	52	13	11	35
2	41	76	32	26	33
0.4	21	57	9	13	13
#3 10	47	65	33	37	44
2	49	82	36	35	50
0.4	26	25	8	19	32
#4 10	98	100	100	83	87
2	46	81	31	29	50
0.4	42	54	17	28	45
#5 10	69	87	47	55	63
2	60	82	33	42	55
0.4	41	61	7	26	46
#6 10	70	89	49	56	66
2	57	81	29	38	58
0.4	58	80	29	35	56
#7 10	71	91	30	60	67
2	67	85	12	30	63
0.4	49	72	27	44	50
#8 10	61	78	39	41	41
2	39	37	3	32	34
0.4	46	67	14	31	46
#9 10	59	83	37	52	45
2	55	83	33	41	53
0.4	48	66	20	40	46
#10 10	75	91	30	60	65
2	62	82	37	48	58
0.4	53	73	30	48	51

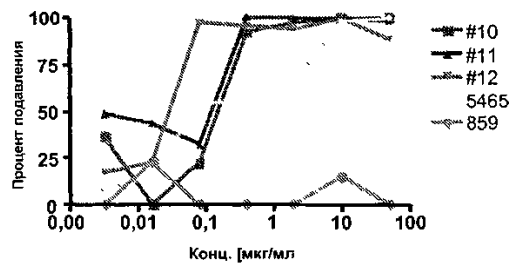
Фиг. 2А

№Ab [мкг/мл]	IL6	IP-10	RANTES	MCP-1	IL8
#11 10	83	96	74	71	55
2	62	83	32	55	50
0,4	61	77	29	46	54
#12 10	74	91	52	57	27
2	69	86	39	53	53
0,4	55	79	28	43	51
#13 10	87	97	81	72	80
2	71	88	50	51	68
0,4	66	80	24	49	60
#14 10	84	90	59	70	80
2	72	85	40	57	66
0,4	61	80	35	46	57
#15 10	84	93	66	70	79
2	69	84	31	55	69
0,4	69	66	18	55	56
#16 10	75	84	42	54	65
2	-12	4	20	-20	5
0,4	3	-17	-3	-17	6
#17 10	49	82	34	18	47
2	46	79	27	11	43
0,4	26	63	15	-1	34
#18 10	37	76	22	11	31
2	34	62	24	9	21
0,4	31	33	15	11	26
#19 10	32	41	11	9	36
2	32	59	12	14	36
0,4	33	47	5	-3	21
5465 10	78	94	63	48	68
2	56	79	36	29	55
0,4	67	77	25	33	47
859 10	16	57	3	10	17
2	29	55	10	10	10
0,4	1	36	-4	2	-3

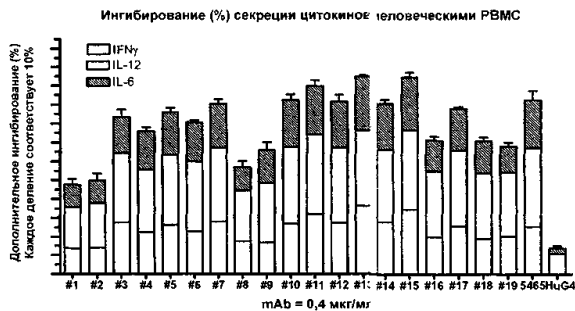
Фиг. 2В



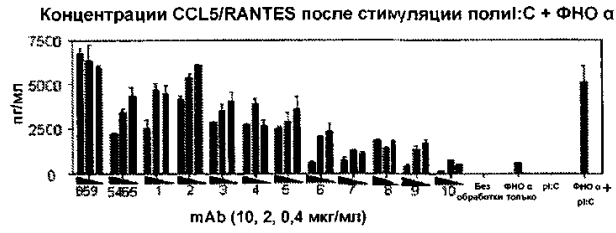
Фиг. 3А



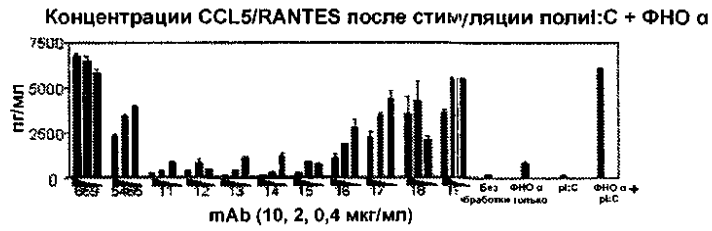
Фиг. 3В



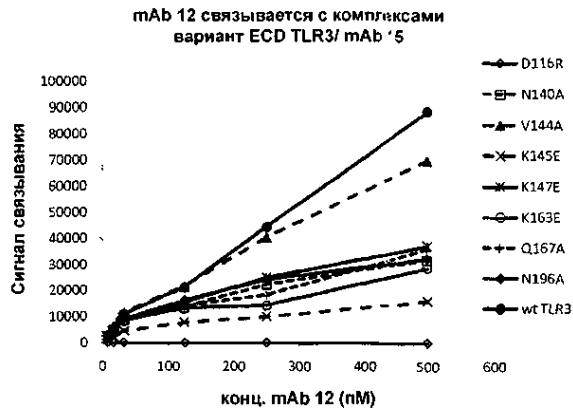
Фиг. 4



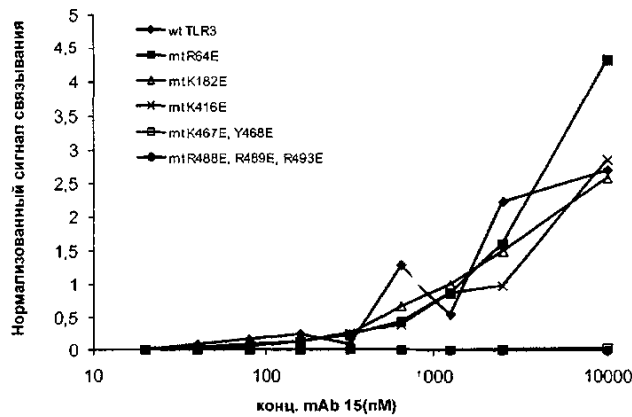
Фиг. 5А



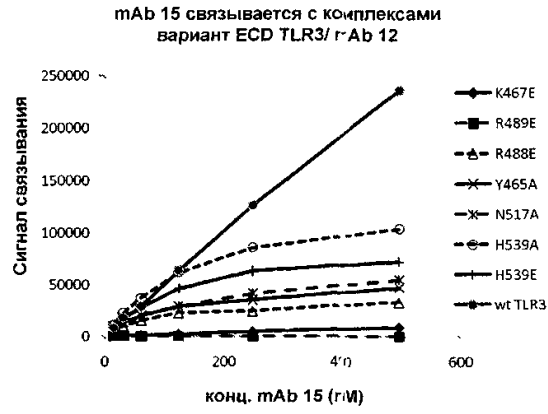
Фиг. 5В



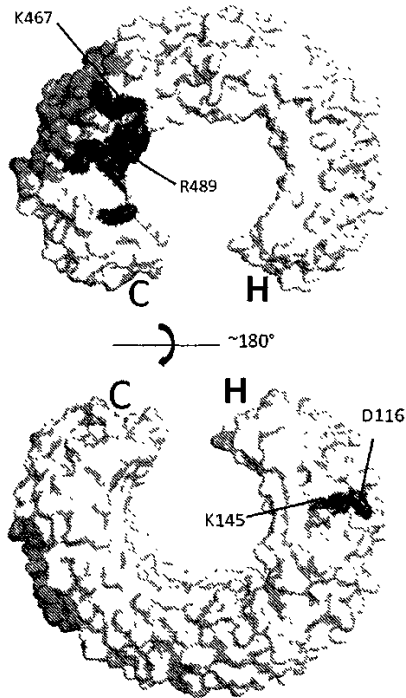
Фиг. 6А



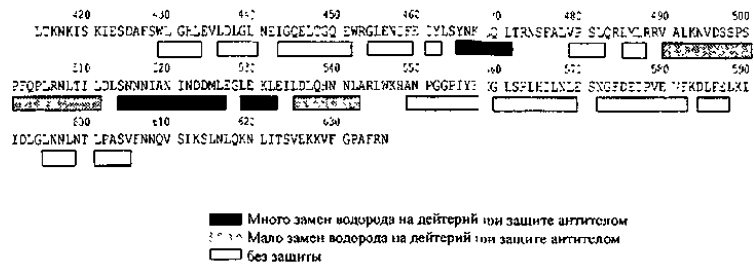
Фиг. 6В



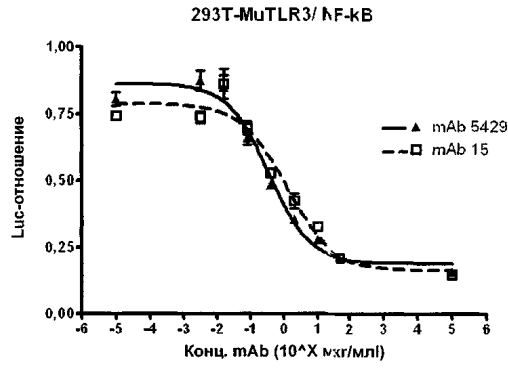
Фиг. 6С



Фиг. 7А

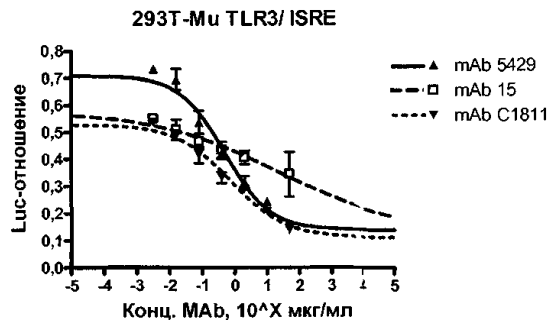


Фиг. 7В



ИК50 (мкг/мл) $\frac{5429}{0,3437}$ $\frac{mAb\ 15}{1,176}$

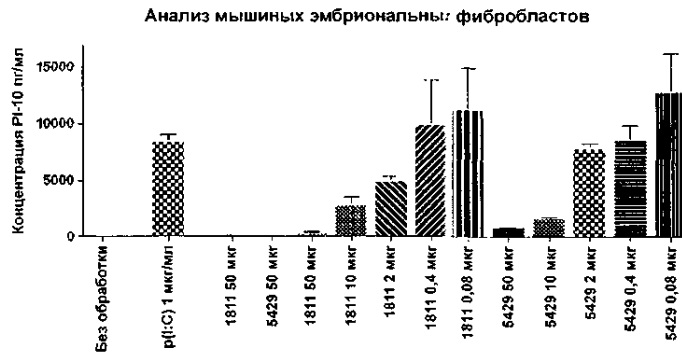
Фиг. 8А



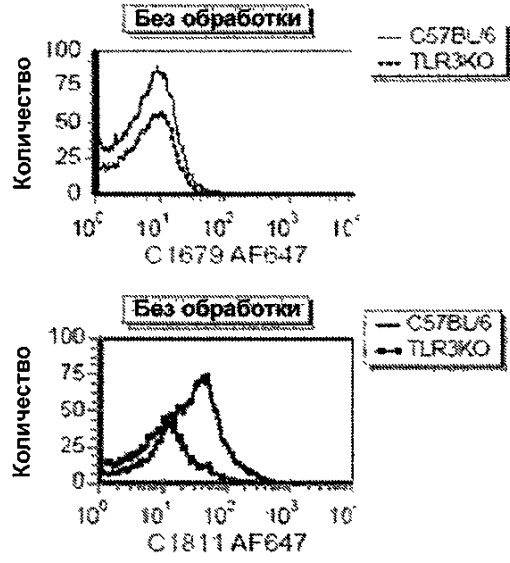
	mAb 5429	mAb 15	mAb C1:11
EC50	0,4856	22,13	0,7481

ЭК50 мкг/мл

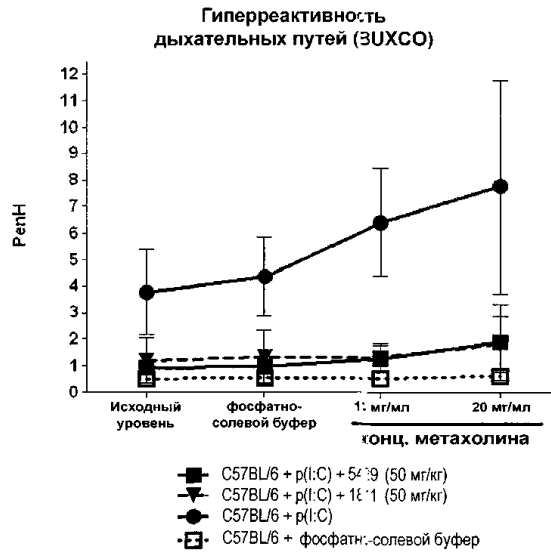
Фиг. 8В



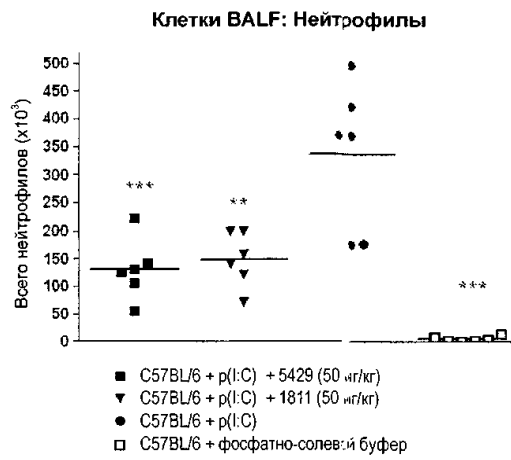
Фиг. 9



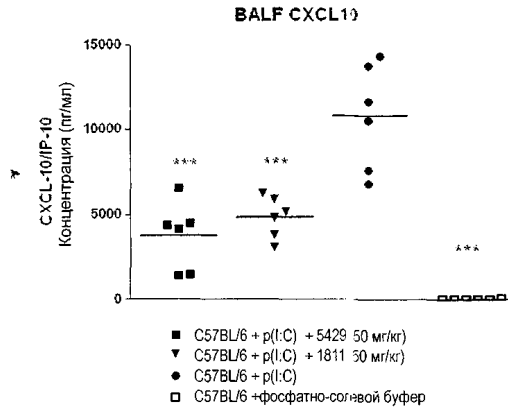
Фиг. 10



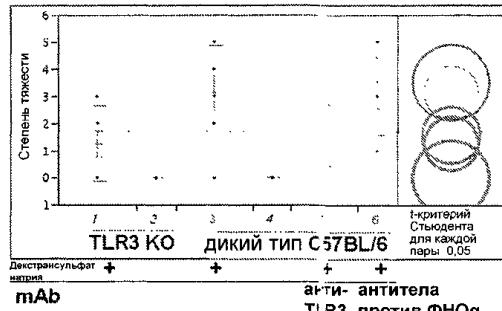
Фиг. 11



Фиг. 12

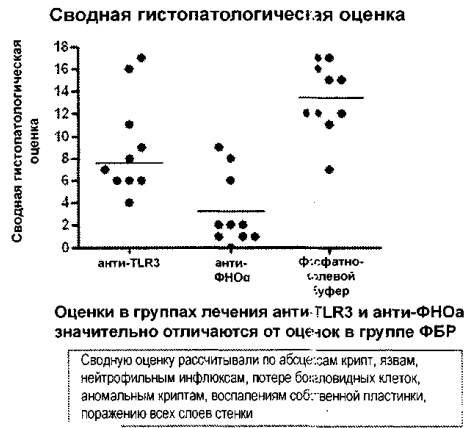


Фиг. 13

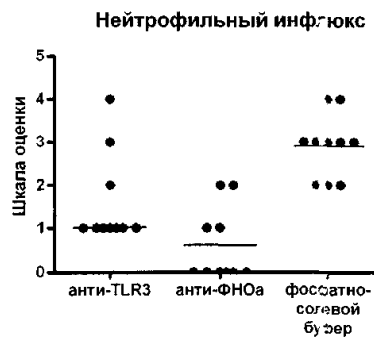


"Слепая" оценка на основании: Некроз отдельных клеток, изъязвление эпителия, Слизивание эпителия, абсцессы крипт, Пролиферация клеток крипт, LP Грануляций в подслизистой основе, Нейтрофилы в подслизистой основе, Отечности подслизистой оболочки

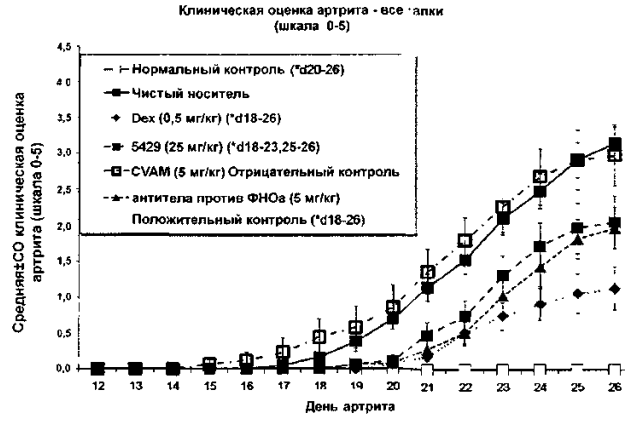
Фиг. 14



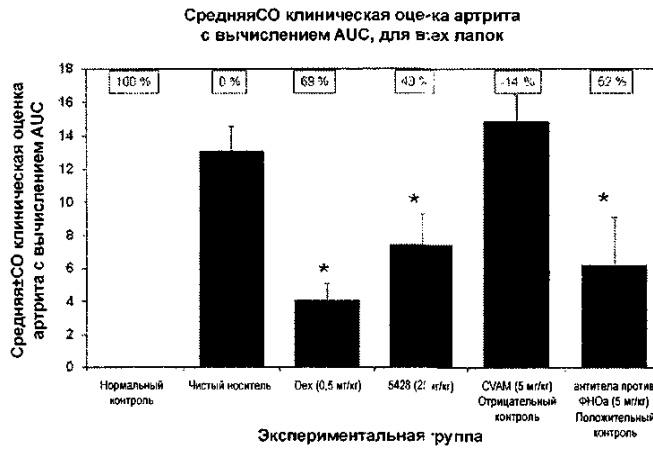
Фиг. 15А



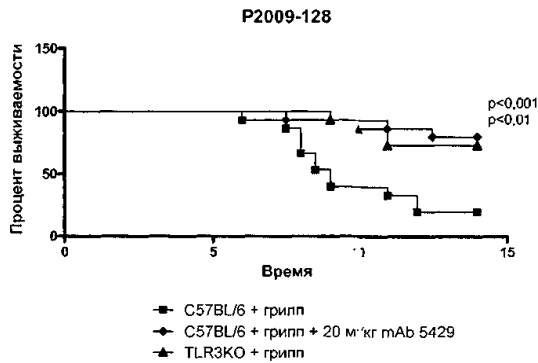
Фиг. 15В



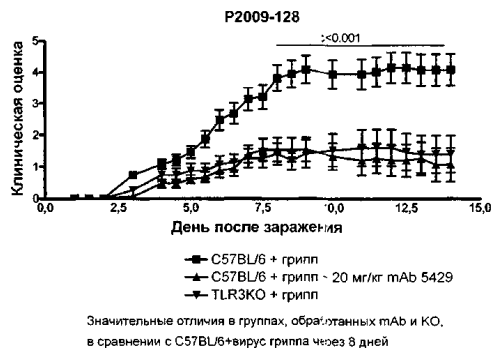
Фиг. 16



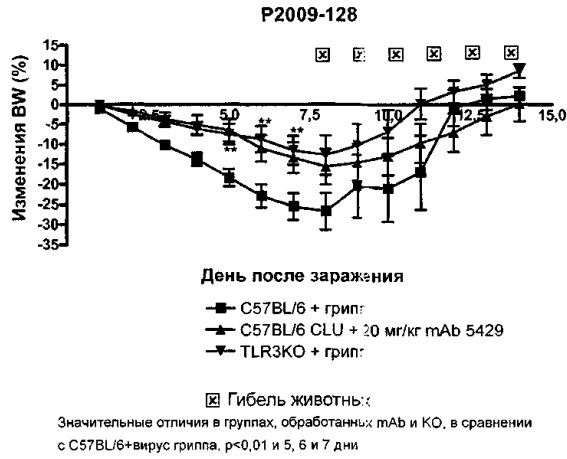
Фиг. 17



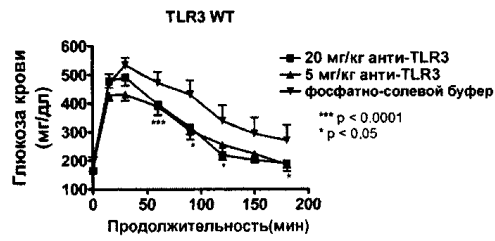
Фиг. 18



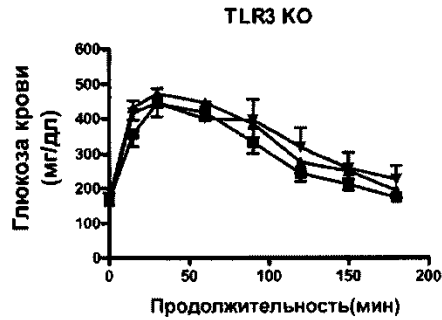
Фиг. 19



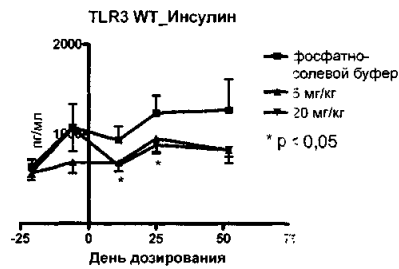
Фиг. 20



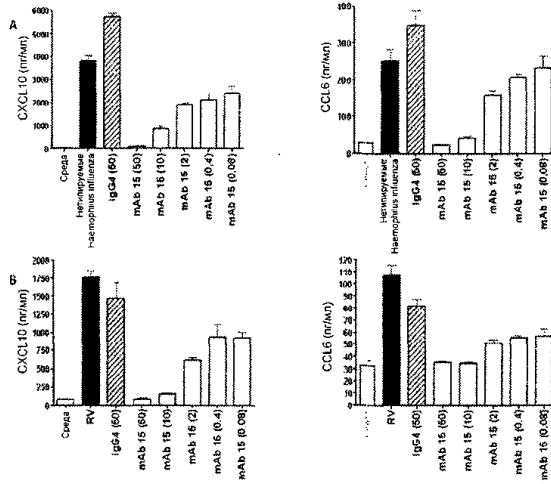
Фиг. 21А



Фиг. 21В

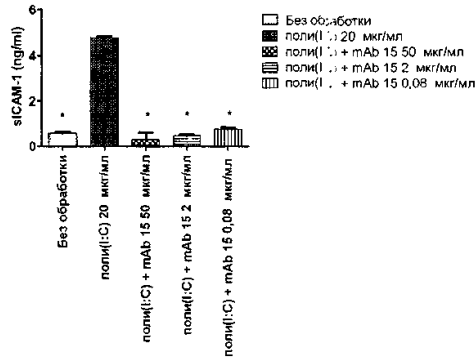


Фиг. 22



Фиг. 23

тАВ15 ингибирует sICAM-1 в HUVEC, стимулированных поли(I:C)

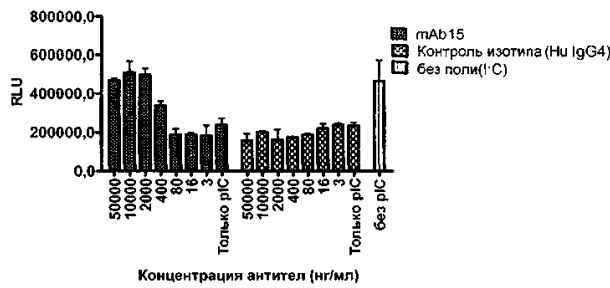


* средние значения, значимые (p < 0.05) в сравнении с поли(I:C)

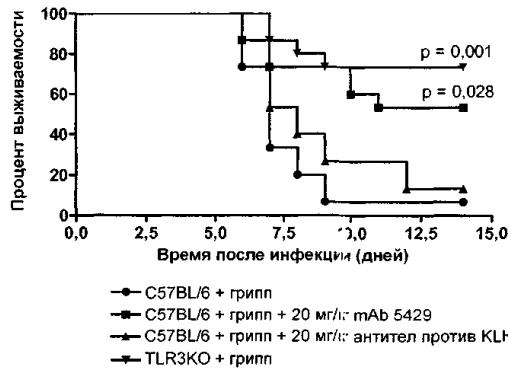
Стимуляция клеток эндотелия

Фиг. 24А

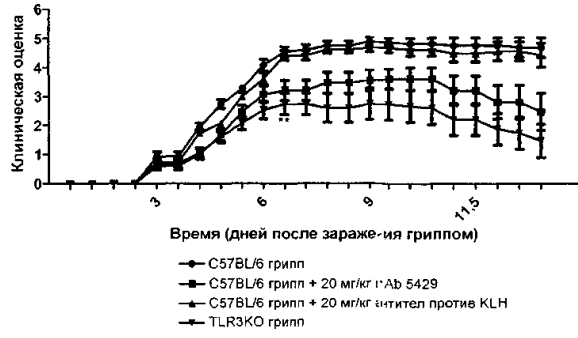
Выживаемость клеток восстанавливается тАВ15



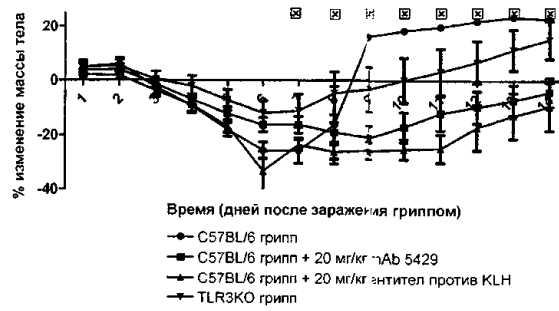
Фиг. 24В



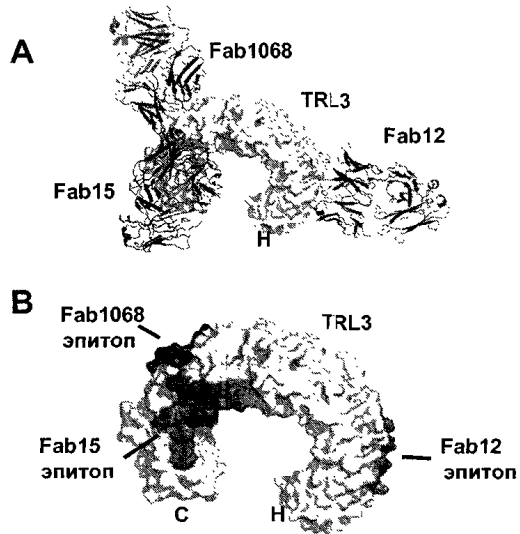
Фиг. 25



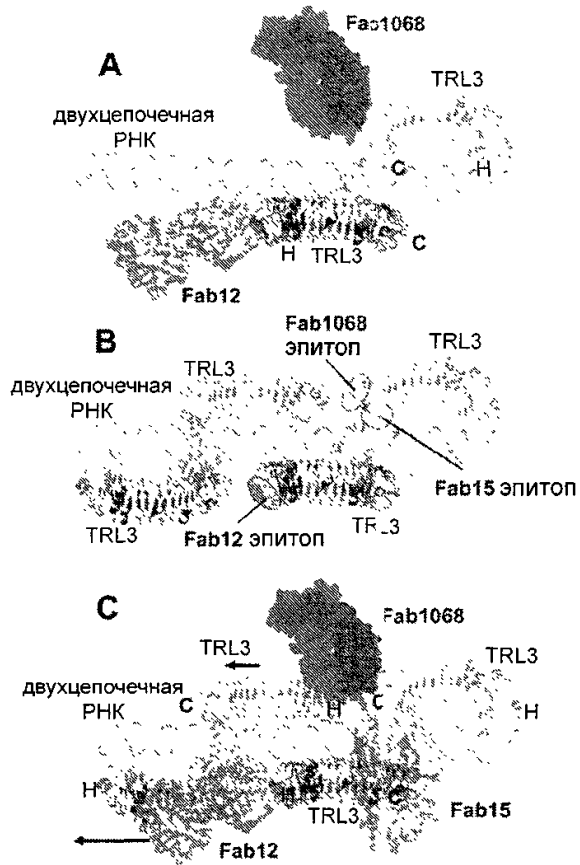
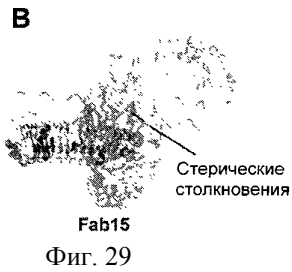
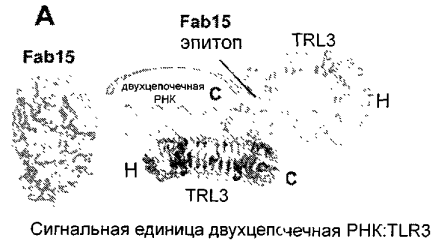
Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 30

mAb 15EVO				mAb 15EVO				mAb 15EVO			
Vk1	Нумерация			Vk1	Нумерация			Vk1	Нумерация		
Последовательная	Читая	Кабат		Последовательная	Читая	Кабат	Последовательная	Читая	Кабат		
D	1	1	1	Q	37	37	37	L	73	73	73
I	2	2	2	O	38	38	38	T	74	74	74
Q	3	3	3	K	39	39	39	I	75	75	75
M	4	4	4	P	40	40	40	S	76	76	76
T	5	5	5	G	41	41	41	S	77	77	77
Q	6	6	6	K	42	42	42	L	78	78	78
S	7	7	7	A	43	43	43	Q	79	79	79
P	8	8	8	P	44	44	44	P	80	80	80
S	9	9	9	K	45	45	45	E	81	81	81
S	10	10	10	L	46	46	46	D	82	82	82
L	11	11	11	L	47	47	47	F	83	83	83
S	12	12	12	I	48	48	48	A	84	84	84
A	13	13	13	Y	49	49	49	T	85	85	85
S	14	14	14	A	50	50	50	Y	86	86	86
V	15	15	15	A	51	51	51	Y	87	87	87
G	16	16	16	S	52	52	52	C	88	88	88
S	17	17	17	S	53	53	53	Q	89	89	89
R	18	18	18	L	54	54	54	Q	90	90	90
V	19	19	19	Q	55	55	55	G	91	91	91
T	20	20	20	S	56	56	56	N	92	92	92
I	21	21	21	G	57	57	57	T	93	93	93
T	22	22	22	V	58	58	58	L	94	94	94
C	23	23	23	P	59	59	59	S	95	95	95
R	24	24	24	S	60	60	60	Y	96	96	96
A	25	25	25	R	61	61	61	T	97	97	97
S	26	26	26	F	62	62	62	F	98	98	98
Q	27	27	27	S	63	63	63	G	99	99	99
S	28	28	28	G	64	64	64	Q	100	100	100
I	29	29	29	S	65	65	65	G	101	101	101
G	30	30	30	G	66	66	66	T	102	102	102
L	31	31	31	S	67	67	67	K	103	103	103
Y	32	32	32	G	68	68	68	V	104	104	104
L	33	33	33	T	69	69	69	E	105	105	105
A	34	34	34	D	70	70	70	I	106	106	106
W	35	35	35	F	71	71	71	K	107	107	107
Y	36	36	36	T	72	72	72				

Фиг. 31А

mAb 15EVO				mAb 15EVO				mAb 15EVO			
Vh5	Нумерация			Vh5	Нумерация			Vh5	Нумерация		
Последовательная	Читая	Кабат		Последовательная	Читая	Кабат	Последовательная	Читая	Кабат		
E	1	1	1	P	41	41	41	L	81	80	80
V	2	2	2	G	42	42	42	Q	82	81	81
Q	3	3	3	K	43	43	43	W	83	82	82
L	4	4	4	G	44	44	44	S	84	82a	82a
V	5	5	5	L	45	45	45	S	85	82b	82b
Q	6	6	6	E	46	46	46	L	86	82c	82c
S	7	7	7	W	47	47	47	K	87	83	83
G	8	8	8	M	48	48	48	A	88	84	84
A	9	9	9	C	49	49	49	S	89	85	85
E	10	10	10	F	50	50	50	D	90	86	86
V	11	11	11	I	51	51	51	T	91	87	87
K	12	12	12	D	52	52	52	A	92	88	88
K	13	13	13	P	53	53	53	M	93	89	89
F	14	14	14	S	54	54	54	Y	94	90	90
G	15	15	15	D	55	55	55	Y	95	91	91
E	16	16	16	S	56	56	56	C	96	92	92
S	17	17	17	Y	57	57	57	A	97	93	93
L	18	18	18	T	58	57	57	R	98	94	94
K	19	19	19	N	59	58	58	E	99	95	95
I	20	20	20	Y	60	59	59	L	100	96	96
S	21	21	21	A	61	60	60	Y	101	97	97
C	22	22	22	P	62	61	61	Q	102	98	98
K	23	23	23	S	63	62	62	G	103	99	99
G	24	24	24	F	64	63	63	Y	104	100	100
S	25	25	25	O	65	64	64	M	105	100a	100a
G	26	26	26	G	66	65	65	D	106	100b	100b
Y	27	27	27	Q	67	66	66	Y	107	100c	100c
S	28	28	28	V	68	67	67	F	108	100d	100d
F	29	29	29	T	69	68	68	D	109	101	101
T	30	30	30	I	70	69	69	S	110	102	102
N	31	31	31	S	71	70	70	W	111	103	103
Y	32	32	32	A	72	71	71	G	112	104	104
W	33	33	33	D	73	72	72	Q	113	105	105
V	34	34	34	K	74	73	73	G	114	106	106
G	35	35	35	S	75	74	74	T	115	107	107
W	36	36	36	I	76	75	75	L	116	108	108
V	37	37	37	S	77	76	76	V	117	109	109
H	38	38	38	T	78	77	77	T	118	110	110
Q	39	39	39	A	79	78	78	V	119	111	111
M	40	40	40	Y	80	79	79	S	120	112	112
								S	121	113	113

Фиг. 31В

Лаб12VQVQSV				Нумерация			
ВЗ	Последовательная	Четная	Кабат	ВЗ	Последовательная	Четная	Кабат
Q	1	1	1	Q	37	38	3
S	2	2	2	K	38	39	4
V	3	3	3	P	39	40	4
L	4	4	4	G	40	41	4
T	5	5	5	Q	41	42	4
Q	6	6	6	A	42	43	4
P	7	7	7	P	43	44	4
P	8	8	8	V	44	45	4
S	9	9	9	L	45	46	4
V	10	11	11	V	46	47	4
S	11	12	12	I	47	48	4
V	12	13	13	Y	48	49	4
A	13	14	14	E	49	50	5
P	14	15	15	D	50	51	5
G	15	16	16	B	51	52	5
Q	16	17	17	E	52	53	5
T	17	18	18	R	53	54	5
A	18	19	19	P	54	55	5
R	19	20	20	S	55	56	5
I	20	21	21	G	56	57	5
S	21	22	22	J	57	58	4
C	22	23	23	P	58	59	5
S	23	24	24	E	59	60	6
G	24	25	25	H	60	61	6
D	25	26	26	F	61	62	6
N	26	27	27	S	62	63	6
I	27	28	28	G	63	64	6
G	28	29	29	S	64	65	6
S	29	30	30	N	65	66	6
Y	30	31	31	S	66	67	6
Y	31	32	32	G	67	68	6
V	32	33	33	N	68	69	6
H	33	34	34	T	69	70	7
W	34	35	35	A	70	71	7
Y	35	36	36	T	71	72	7
Q	36	37	37	L	72	73	7

Нумерация			
ВЗ	Последовательная	Четная	Кабат
Q	37	38	3
K	38	39	4
P	39	40	4
G	40	41	4
Q	41	42	4
A	42	43	4
P	43	44	4
V	44	45	4
L	45	46	4
V	46	47	4
I	47	48	4
Y	48	49	4
E	49	50	5
D	50	51	5
B	51	52	5
E	52	53	5
R	53	54	5
P	54	55	5
S	55	56	5
G	56	57	5
J	57	58	4
P	58	59	5
E	59	60	6
H	60	61	6
F	61	62	6
S	62	63	6
G	63	64	6
S	64	65	6
N	65	66	6
S	66	67	6
G	67	68	6
N	68	69	6
T	69	70	7
A	70	71	7
T	71	72	7
L	72	73	7

Нумерация			
ВЗ	Последовательная	Четная	Кабат
T	73	74	7
I	74	75	7
S	75	76	7
G	76	77	7
T	77	78	7
G	78	79	7
A	79	80	8
E	80	81	8
D	81	82	8
F	82	83	8
A	83	84	8
D	84	85	8
Y	85	86	8
Y	86	87	8
C	87	88	8
S	88	89	8
S	89	90	9
Y	90	91	9
D	91	92	9
П	92	93	9
Q	93	94	9
N	94	95	9
C	95	96	9
S	96	97	9
Q	97	98	9
F	98	99	9
G	99	100	10
G	100	101	10
G	101	102	10
T	102	103	10
K	103	104	10
L	104	105	10
T	105	106	10
V	106	107	10
L	107	108	10

Фиг. 31С

Лаб12VQVQSV				Нумерация			
ВЗ	Последовательная	Четная	Кабат	ВЗ	Последовательная	Четная	Кабат
Q	1	1	1	Q	41	39	3
V	2	2	2	S	42	40	4
Q	3	3	3	P	43	41	4
L	4	4	4	G	44	42	4
Q	5	5	5	R	45	43	4
Q	6	6	6	G	46	44	4
S	7	7	7	L	47	45	4
C	8	8	8	E	48	46	4
P	9	9	9	W	49	47	4
C	10	10	10	L	50	48	4
L	11	11	11	G	51	49	4
V	12	12	12	I	52	50	5
K	13	13	13	I	53	51	5
P	14	14	14	Q	54	52	5
S	15	15	15	K	55	53	5
Q	16	16	16	R	56	54	5
T	17	17	17	S	57	55	5
L	18	18	18	K	58	56	5
S	19	19	19	W	59	57	5
L	20	20	20	Y	60	58	5
T	21	21	21	N	61	59	5
C	22	22	22	N	62	60	5
A	23	23	23	Y	63	61	5
I	24	24	24	A	64	62	6
S	25	25	25	V	65	63	6
C	26	26	26	S	66	64	6
D	27	27	27	V	67	65	6
S	28	28	28	K	68	66	6
V	29	29	29	S	69	67	6
S	30	30	30	П	70	68	6
S	31	31	31	T	71	69	6
N	32	31b	32	T	72	70	6
S	33	31b	33	I	73	71	6
A	34	32	34	N	74	72	6
A	35	33	35	P	75	73	7
W	36	34	36	D	76	74	7
Q	37	35	37	T	77	75	7
W	38	36	38	S	78	76	7
I	39	37	39	K	79	77	7
R	40	38	40	N	80	78	7

Нумерация			
ВЗ	Последовательная	Четная	Кабат
Q	41	39	3
S	42	40	4
P	43	41	4
G	44	42	4
R	45	43	4
G	46	44	4
L	47	45	4
E	48	46	4
W	49	47	4
L	50	48	4
G	51	49	4
I	52	50	5
I	53	51	5
Q	54	52	5
K	55	53	5
R	56	54	5
S	57	55	5
K	58	56	5
W	59	57	5
Y	60	58	5
N	61	59	5
N	62	60	5
Y	63	61	5
A	64	62	6
V	65	63	6
S	66	64	6
S	67	65	6
П	68	66	6
T	69	67	6
T	70	68	6
I	71	69	6
N	72	70	6
P	73	71	6
D	74	72	6
T	75	73	7
S	76	74	7
K	77	75	7
N	78	76	7

Нумерация			
ВЗ	Последовательная	Четная	Кабат
Q	81	77	7
F	82	78	7
S	83	79	7
L	84	80	8
Q	85	81	8
L	86	82	8
N	87	a	a
S	88	b	b
V	89	c	c
T	90	83	8
P	91	84	8
E	92	85	8
D	93	86	8
T	94	87	8
A	95	88	8
V	96	89	8
Y	97	90	9
Y	98	91	9
C	99	92	9
A	100	93	9
R	101	94	9
Y	102	95	9
S	103	96	9
L	104	97	9
P	105	98	9
F	106	99	9
Y	107	100	10
S	108	101	10
I	109	102	10
D	110	103	10
Y	111	104	10
W	112	105	10
Q	113	106	10
G	114	107	10
T	115	108	10
G	116	109	10
L	117	110	10
V	118	111	10
T	119	112	10
V	120	113	10
S	121	114	10
S	122	115	10

Фиг. 31D

	1	50
mAb 15EVQ Vκ	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1-39	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1D-39	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1-27	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1-33	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1D-33	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1-37	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1D-37	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1-12	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1D-12	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1-16	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1D-16	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1-17	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1-6	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1D-17	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1-8	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1D-8	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1D-43	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1D-42	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1-13*02	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1D-13	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1-5	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
IGKV1-9	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISL	LAWYQQKPGKAPKLLIYA
	51	95 107
mAb 15EVQ Vκ	ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQGNTLSYTFGGQTKVEIK
IGKV1-39	ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQSYSTP
IGKV1D-39	ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQSYSTP
IGKV1-27	ASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYNSAP
IGKV1-33	ASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYDNL
IGKV1D-33	ASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYDNL
IGKV1-37	ASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYDNL
IGKV1D-37	ASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYDNL
IGKV1-12	ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQANSFP
IGKV1D-12	ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQANSFP
IGKV1-16	ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYNSYP
IGKV1D-16	ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYNSYP
IGKV1-17	ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYNSYP
IGKV1-6	ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYNSYP
IGKV1D-17	ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYNSYP
IGKV1-8	ASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYNSYP
IGKV1D-8	ASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYNSYP
IGKV1D-43	ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYNSYP
IGKV1D-42	AKDLHPGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYNSYP
IGKV1-13*02	ASSLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYNSYP
IGKV1D-13	ASSLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYNSYP
IGKV1-5	ASSLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYNSYP
IGKV1-9	ASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEL	ATYYCQQYNSYP

Фиг. 32

	1	50
mAb15EVQ Vh	(1) EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	YSFTNYWVGWVRQMPGKGLEWWMGF
IGHV5-51	(1) EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	YSFTSYWVGWVRQMPGKGLEWWMGF
IGHV5-a	(1) EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGS	YSFTSYWTSWVRQMPGKGLEWWMGR
	51	100
mAb15EVQ Vh	(51) IDPSDSYTNYPSPFQGGVTSADKS	STAYLQWSSLKASDTAMYYCARFL
IGHV5-51	(51) IYPGDSYTRYSPSPFQGGVTSADKS	STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR--
IGHV5-a	(51) IDPSDSYTNYPSPFQGGVTSADKS	STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR--
	101	121
mAb15EVQ Vh	(101) YQGYMDTFDSWGQGLVTVSS	
IGHV5-51	(99) -----	
IGHV5-a	(99) -----	

Фиг. 33

```

1 50
mAb12 QSVLTQPPSVSVAPCGQTARITCSGDNIGSYVYVYQQKPGQAPVLIYED
IGLV3-1 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACVYQQKPGQSPVLIYQD
IGLV3-9 SYELTQPLSVSVALCQTARITCSGNNIGSKNVVYQQKPGQAPVLIYRD
IGLV3 10 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAVYQQKSGQAPVLIYED
IGLV3-12 SYELTQPHSVSVATAQMARITCSGNNIGSKAVVYQQKPGQDPVLIYSD
IGLV3-16 SYELTQPPSVSVSLGQMARITCSGALPKKYAVYQQKPGQAPVLIYKD
IGLV3-19 SSELTDPAVSVVALGQTVRITCSGDSLRSYAVYQQKPGQAPVLIYVK
IGLV3-21 SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCSGNNIGSKSVVYQQKPGQAPVLIYD
IGLV3-22 SYELTQPLSVSVSPGQTARITCSGDVLGENYAVYQQKPGQAPVLIYED
IGLV3-25 SYELMQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKQYAVYQQKPGQAPVLIYKD
IGLV3-27 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDVLAKKYAVYQQKPGQAPVLIYKD
IGLV3-32 SSGPTQVPAVSVVALGQMARITCSGDSMEGSYAVYQQKPGQAPVLIYDS

51 87 107
mAb12 SERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTAQAEDE/ YVCSSYDDPNFQVFGGTKLTVL
IGLV3-1 SKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTAQAEDE/ YVCQAWDSSTA
IGLV3-9 SNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAGAEDE/ YVCQVWDSSTA
IGLV3-10 SKRPSGIPERFSGSSGTMATLTISGAQAEDE/ YVCYSTDSSGNH
IGLV3-12 SNRPSGIPERFSGSNFGNTTTLTISRLEAEDE/ YVCQVWDSSTDH
IGLV3-16 SERPSGIPERFSGSSGTVTLTISGVAEAEDE/ YVCISADSSGTY
IGLV3-19 NNRPSGIPDRFSGSSGNTASLTITGAQAEDE/ YVCNSRDSSGNH
IGLV3-21 SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAEDE/ YVCQVWDSSTDH
IGLV3-22 SERVPSGIPERFSGSSGNTTTLTISRVLAEDE/ YVCLSGDEDN
IGLV3-25 SERPSGIPERFSGSSGTTVTLTISGVAEAEDE/ YVCQSADSSGTY
IGLV3-27 SERPSGIPERFSGSSGTTVTLTISGAQAEDE/ YVCYSAADNN
IGLV3-32 SDRPSRIPERFSGSKSGNTTTLTITGAQAEDE/ YYYQLIDNHA

```

Фиг. 34А

```

1 50
mAb 12 QVQLQQSGPGLVKPSQTLTSLTCAISGDSVSSNSA·HWIRQSPGRGLEWL
IGHV6-1 QVQLQQSGPGLVKPSQTLTSLTCAISGDSVSSNSA·HWIRQSPGRGLEWL

51 100
mAb 1/ GIQKRKSKWYNNYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL·NSVTPEDTAVYYCA
IGHV6-1 GRTYRKRKWNQYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL·NSVTPEDTAVYYCA

101 122
mAb 12 RYSYFPYSIDYWGQGLVTVSS
IGHV6-1 R

```

Фиг. 34В

```

mAb 15EVQ YTFGQGTKVEIK
IGKJ1 WTFGQGTKVEIK
IGKJ2 YTFGQGTKLEIK
IGKJ3 FTFGGTRKVEIK
IGKJ4 LTFGGGTRVEIK
IGKJ5 ITFGQGTKLEIK

```

```

mAb 12QVQ/QSV QVFGGTRKTV
IGLJ1 YVFGGTRKTV
IGLJ2 VVFGGTRKTV
IGLJ3 VVFGGTRKTV
IGLJ4 FVFGGTRKTV
IGLJ5 WVFGGTRKTV
IGLJ6 NVFGGTRKTV
IGLJ7 AVFGGTRKTV

```

```

mAb 15EVQ ..MDTFDSWGQGLVTV S
mAb 12QVQ/QSV ..SIDYWGQGLVTV S
IGHJ1 ...AEYFQHWGQGLVTV S
IGHJ2 ...YWFPLWGRGTLVTV S
IGHJ3 ....AFDWWGQGLVTV S
IGHJ4 ....YFDYWGQGLVTV S
IGHJ5 ....NWFDSWGQGLVTV S
IGHJ6 YYYYYGMDVWGQGLVTV S

```

Фиг. 35



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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