

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11)

**022832**

(13)

**B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации  
и выдачи патента: **2016.03.31**

**(51)** Int. Cl. *C12P 21/06* (2006.01)

**(21)** Номер заявки: **201170636**

**(22)** Дата подачи: **2009.10.30**

---

**(54) ВЫДЕЛЕННОЕ АНТИТЕЛО, СПОСОБНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ С TLR3**

---

**(31)** 61/109,974; 61/161,860; 61/165,100;  
61/173,686  
**(32)** 2008.10.31; 2009.03.20; 2009.03.31; 2009.04.29  
**(33)** US  
**(43)** 2012.03.30  
**(86)** PCT/US2009/062813  
**(87)** WO 2010/051470 2010.05.06  
**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**СЕНТОКОР ОРТО БАЙОТЕК ИНК. (US)**

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

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

**(56)** BURGNER IWAN A. et al.: "Antibodies specific for human or murine Toll-like receptors detect canine leukocytes by flow cytometry", *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 124, p. 184-191, реферат  
MATSUMOTO MISAKO et al.: "Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 293, p. 1364-1369, реферат  
DATABASE, GenBank: CAD32647, 27.05.2002, [найдено 08.11.2011], Найдено из Интернет: <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/21261396?report=genbank&log\$=proalign...>  
KANZLER HOLGER et al.: "Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists", *Nature Medicine*, 2007, Vol. 13, No. 5, p. 552-559, реферат  
CARIO ELKE et al.: "Differential Alteration in Intestinal Epithelial Cell Expression of Toll-Like Receptor 3 (TLR3) and TLR4 in Inflammatory Bowel Disease", *Infection and Immunity*, 2000, Vol. 68, No. 12, p. 7010-7017, реферат  
WO-A2-2009047791  
JP-A-2009029780  
DATABASE, GenBank: AAY75449, 13.06.2005, [найдено 08.11.2011], Найдено из Интернет: <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/6760748?report=genbank&log\$=proalign...>

---

**(57)** Описано выделенное антитело или его фрагмент, способное взаимодействовать с TLR3, содержащее переменные участки тяжелой и легкой цепи, при этом антитело содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи с определенными последовательностями.

---

**B1**

**022832**

**022832**

**B1**

Заявка на данный патент истребует приоритет заявок США сер. № 61/109974 от 31 октября 2008 г. и сер. № 61/161860 от 20 марта 2009 г., а также сер. № 61/165100 от 31 марта 2009 г. и сер. № 61/173686 от 29 апреля 2009 г., полное содержание которых включено в настоящее изобретение путем ссылки.

#### **Область применения 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 появление 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. Преимущественно внутриклеточные Толл-подобные рецепторы, TLR3, TLR7 и TLR9 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 TLR 7 и TLR 9 находятся на стадии клинических испытаний в лечении 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, освобождаемой некротическими (погибшими) клетками в процессе воспаления 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, доминантно-негативный аллель TLR3 был ассоциирован с повышенной восприимчивостью к вирусу герпеса формы Herpes Simplex encephalitis 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 проверочном заражении вирусом Коксаки (Richer et al., *PLoS One* 4:e4127, 2009). Было показано, тем не менее, что нарушенная регуляция сигнального пути TLR3 имеет отношение к заболеваемости и смертности при определенных вирусных инфекциях, включая вирус западнонильской лихорадки, флебовирус, вирус ваксиния и вирус 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).

Также было продемонстрировано, что TLR3 определяет механизм патогенеза при целом ряде воспалительных, иммунопосредованных и аутоиммунных заболеваний, включающих, например, септический шок (Cavassani et al., *J. Exp. Med.* 205:2609-2621, 2008), острое повреждение 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 кишечника, такие как 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 диабет 1 типа (Dogusan et al., *Diabetes* 57:1236-1245, 2008; Lien and Zipris, *Curr. Мол. Med.* 9:52-68, 2009). Более того, было показано, что орган-специфичное увеличение экспрессии TLR3 коррелирует со многими патологиями, которые возникают вследствие нарушения регуляции воспалительного ответа, такими как билиарный (холангиолитический) цирроз печени (Takii et al., *Lab Invest.* 85:908-920, 2005), ревматоидный артрит суставов (Ospelt et al., *Arthritis Rheum.* 58:3684-3692, 2008), и с состоянием слизистой оболочки носа у пациентов с аллергическим ринитом (Fransson et al., *Respir. Res.* 6:100, 2005).

При некрозе освобождение клеточного содержания, включающего эндогенные матричные РНК, индуцирует секрецию цитокинов, хемокинов и других факторов, которые иницируют процесс местного воспаления, облегчают уничтожение клеточных остатков и восстановительный процесс. Некроз часто приводит к непрекращающемуся воспалительному процессу, увеличивая возможность развития хронического или острого воспаления (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 замкнутой обратной связи за счет освобожденных лигандов TLR3. Таким образом, антагонизм к TLR3 может играть положительную роль во многих заболеваниях, сопровождающихся хроническим или острым воспалением и/или некрозом.

Уменьшение активации TLR3 может рассматриваться как новая стратегия в лечении онкологических заболеваний, таких как почечно-клеточный рак и плоскоклеточный (эпидермальный) рак шеи (Morikawa et al., *Clin. Cancer Res.* 13:5703-5709, 2007; Pries et al., *Int. J. Мол. Med.* 21: 209-215, 2008). Кроме того, аллель TLR3<sup>L423F</sup>, приводящий к производству белка с уменьшенной активностью, был ассо-

цирован с защитной функцией в случае "сухой", вызываемой возрастными изменениями, макулярной дегенерацией (Yang et al., N. Engl. J. Med. 359:1456-1463, 2008), указывая на то, что антагонисты TLR3 могут играть положительную роль 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 супрессии активности TLR3 для лечения связанных с функцией этого рецептора заболеваний.

#### **Краткое описание чертежей**

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

На фиг. 2A и 2B показан эффект (% ингибирования) или эффект mAb к huTLR3 в эксперименте с использованием гена BEAS-2B.

На фиг. 3A и 3B показан эффект mAb к huTLR3 в эксперименте с использованием гена NHBE.

На фиг. 4 показан эффект mAb к huTLR3 в эксперименте с использованием гена PBMC.

На фиг. 5A и 5B показан эффект mAb к huTLR3 в эксперименте с использованием гена HASM.

На фиг. 6A, 6B и 6C показано связывание mAb к huTLR3 с мутантами TLR3.

На фиг. 7A показаны эпитопы, распознаваемые mAb 15EVQ (черным цветом) и C1068 (серым цветом) (верхняя часть рисунка), и эпитопы, распознаваемые mAb 12QVQ/QSV (черным цветом, нижняя часть рисунка), наложенные на изображение структуры TLR3 ECD человека. На фиг. 7B показана пертурбационная карта избирательного замещения водорода дейтерием в случае, когда TLR3 ECD образует комплекс с mAb 15EVQ.

На фиг. 8A и 8B показан эффект суррогатных крысиных/мышинных mAb (mAb к мышиному TLR3, mAb 5429) в экспериментах с использованием А) гена-репортера NF-kB и Б) 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 часть рисунка: изотипный контроль; нижняя часть рисунка: mAb c1811.

На фиг. 11 показано влияние суррогатных mAb на уровень pепН в модели АHR.

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

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

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

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

На фиг. 16 показан эффект суррогатных mAb на клинические показатели при коллагениндуцированном артрите (CIA).

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

На фиг. 18 показан эффект суррогатных mAb на выживаемость мышей C57BL/6 после интраназального введения вируса гриппа типа А/PR/8/34.

На фиг. 19 показан эффект суррогатных mAb на клинические показатели после заражения вирусом гриппа типа А/PR/8/34.

На фиг. 20 показан эффект суррогатных mAb на вес тела в течение 14 дней после заражения вирусом гриппа типа А/PR/8/34.

На фиг. 21 показан эффект суррогатных mAb на уровень глюкозы в крови у животных (А) WT DIO и (В) TLR3KO DIO после пробного введения глюкозы.

На фиг. 22 показан эффект суррогатных mAb на уровень инсулина у животных WT DIO.

На фиг. 23 показан эффект 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) уровень sICAM-1 и (В) жизнеспособность клеток HUVEC.

### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его фрагменту, способному взаимодействовать с TLR3, содержащим переменные участки тяжелой и легкой цепи, при этом антитело содержит:

- а) переменный участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 42; или
- б) переменный участок легкой цепи SEQ ID NO: 41; или
- в) переменный участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 42 и переменный участок легкой цепи SEQ ID NO: 41; или
- г) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 82, 86 и 84; или
- д) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи SEQ ID NO: 79, 80 и 87; или
- е) аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 82, 86 и 84, и аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи SEQ ID NO: 79, 80 и 87; или
- ж) переменный участок тяжелой цепи, который по меньшей мере на 95% идентичен переменному участку с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 42; или
- з) переменный участок легкой цепи, который по меньшей мере на 95% идентичен переменному участку с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 41;
- и) тяжелую цепь SEQ ID NO: 102; или
- й) легкую цепь SEQ ID NO: 156; или
- к) тяжелую цепь SEQ ID NO: 102 и легкую цепь SEQ ID NO: 156.

### 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 взаимодействовать с TLR3", относится к антителам, способным прямо или косвенно физически взаимодействовать, уменьшать или ингибировать биологическую активность TLR3 или активацию рецептора TLR3. Например, антитело, способное взаимодействовать 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- $\kappa$ B.

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 специфично 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 варьировать. Каждая тяжелая и каждая легкая цепь также обладает регулярно расположенными внутренними дисульфидными мостиками. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен (VH), за которым следуют несколько константных доменов. Каждая легкая цепь имеет на одном конце переменный домен (VL), а на другом конце константный домен. Константный домен легкой цепи находится напротив первого константного домена тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи находится напротив переменного домена тяжелой цепи. Исходя из аминокислотной последовательности константных доменов легкая цепь антитела любого вида позвоночных может быть отнесена к одному из двух четко различающихся типов, а именно каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ).

Имуноглобулины могут быть разделены на пять больших классов, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотного состава константного 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 переменный участок интактного антитела. Например, к фрагментам антитела относятся фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и F<sub>v</sub>, диатела, одноцепочечные фрагменты антитела и мультиспецифичные антитела, сформированные из по меньшей мере двух интактных антител.

Переменные 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 переменность последовательности (Wu and Kabat, 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) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991);

(ii) согласно определению Котии и Леска, термин "гипервариабельный участок", "HVR", или "HV" относится к вариабельному домену антитела, который имеет гипервариабельную структуру (Chothia and Lesk, Mol. Biol. 196:901-917, 1987). Как правило, антигенсвязывающий участок содержит шесть гипервариабельных участков, три из которых находятся в VH (H1, H2, H3) и три - в VL (L1, L2, L3). Котия и Леск называют структурно консервативные HV "каноническими структурами";

(iii) 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](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) согласно Альмагро, антигенсвязывающий участок также может быть определен на основании определяющей специфичности используемости групп (SDRU) (Almagro, Mol. Recognit. 17:132-143, 2004), этот автор использует термин "определяющие специфичность аминокислотные остатки" (SDR) для обозначения аминокислотных остатков иммуноглобулинов, непосредственно вовлеченных в контакт с антигеном. Согласно Альмагро, основываясь на анализе кристаллической структуры комплексов антиген-антитело, SDRU являются точной мерой числа и распределения SDR, отвечающих за связывание с различными типами антигенов.

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

Название "каркасный участок" или "каркасные последовательности" относится к последовательностям вариабельных участков, которые не были определены как антигенсвязывающие. Поскольку для определения антигенсвязывающего участка могут использоваться разные термины, как указано выше, определение точной последовательности аминокислот каркасного участка зависит от определения антигенсвязывающего участка.

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

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 это описано выше. Для сравнения пептидных цепочек наилучшим образом подходят вариабельные участки тяжелой или легкой цепи.

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 "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 с 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.

Используемые в данном изобретении термины "биологическая активность TLR3" и "активация TLR3" относятся к любой активности, проявляющейся в результате связывания лиганда с TLR3. К лигандам TLR3 относятся двухцепочечные РНК, poly(I:C) и эндогенные матричные РНК, например эндо-

генные матричные РНК, высвобождаемые некротическими клетками. В отдельных случаях активация TLR3 приводит к активации NF- $\kappa$ B в ответ на присутствие лигандов TLR3. Экспериментальная оценка активации NF- $\kappa$ B может быть осуществлена с использованием гена-репортера после индукции рецептора лигандом poly(I:C) (Alexopoulou et al., Nature 413:732-738, 2001; Häcker 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 присутствие лигандов TLR3. Экспериментальная оценка опосредованной рецептором TLR3 активации IRF может быть сделана с помощью гена-репортера, контролируемого интерферон-стимулированными элементами (ISRE). В отдельных случаях активация TLR3 приводит к секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов, например ФНО- $\alpha$ , 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 экспериментальных тестовых систем, таких как ELISA.

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. Указанные антитела могут ингибировать некоторые пути активации TLR3, включая 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 полезны в качестве исследовательских и диагностических реагентов, а также терапевтических агентов.

Разнообразие антител достигается за счет использования многих генов клеток зародышевой линии, кодирующих вариабельные участки, и разнообразных соматических клеток. Соматические события, приводящие к образованию участка VH, включают рекомбинацию переменного (V) генного сегмента, сегмента разнообразия (D) и сегмента присоединения (J), а при образовании участка VL - рекомбинацию V и J сегментов. Маловероятно, чтобы антитела и композиции, имеющие последовательности CDR, идентичные или сходные с предложенными в настоящем изобретении последовательностями, были созданы независимо. В результате сборки и соматических мутаций последовательность генов, кодирующих антитела, является очень вариабельной, согласно существующим оценкам, эти вариабельные гены кодируют

1010 молекул различных антител (Immunoglobulin Genes, 2nd ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1995).

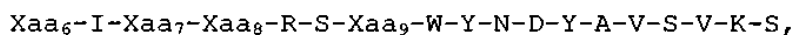
В настоящем изобретении предлагаются антигенсвязывающие участки, полученные из генных библиотек гена иммуноглобулина человека. Структура, несущая антигенсвязывающий участок, обычно является тяжелой или легкой цепью антитела, или частью указанных структур, где антигенсвязывающий участок располагается на своем естественном месте, согласно приведенному выше описанию.

В настоящем изобретении предлагаются выделенные антитела или их фрагменты, способные взаимодействовать 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
F17	61	192	60	55	56	191
F18	70	194	72	67	68	193
F19	82	196	84	79	80	195

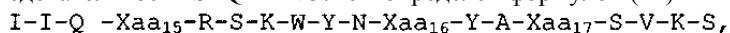
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются выделенные антитела или их фрагменты, способные взаимодействовать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, включая антитела, содержащие аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 192, где HCDR2 последовательности SEQ ID NO: 192 определен формулой (I)



(I)

где Xaa<sub>6</sub> может быть Arg или Lys;  
 Xaa<sub>7</sub> может быть Tyr, His или Ser;  
 Xaa<sub>8</sub> может быть Met, Arg или Tyr и  
 Xaa<sub>9</sub> может быть Lys или Arg.

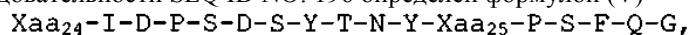
В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются выделенные антитела или их фрагменты, способные взаимодействовать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, включая антитела, содержащие аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 194, где HCDR2 последовательности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



(III)

где Xaa<sub>15</sub> может быть Lys, Thr или Ile;  
 Xaa<sub>16</sub> может быть Asn или Asp и  
 Xaa<sub>17</sub> может быть Val или Leu.

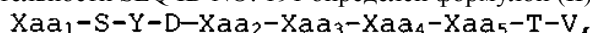
В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются выделенные антитела или их фрагменты, способные взаимодействовать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, включая антитела, содержащие аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 196, где HCDR2 последовательности SEQ ID NO: 196 определен формулой (V)



(V)

где Xaa<sub>24</sub> может быть Phe или Arg и  
 Xaa<sub>25</sub> может быть Ala или Ser.

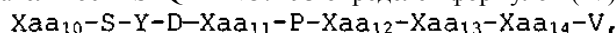
В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются выделенные антитела или их фрагменты, способные взаимодействовать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, включая антитела, содержащие аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 191, где LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 191 определен формулой (II)



(II)

где Xaa<sub>1</sub> может быть Ala, Gln, Gly или Ser;  
 Xaa<sub>2</sub> может быть Gly, Glu или Ser;  
 Xaa<sub>3</sub> может быть Asp или Asn;  
 Xaa<sub>4</sub> может быть Glu или Ser; и  
 Xaa<sub>5</sub> может быть Phe, Ala или Leu.

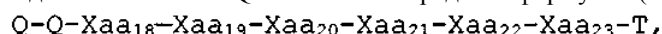
В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются выделенные антитела или их фрагменты, способные взаимодействовать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, включая антитела, содержащие аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 193, где LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 193 определен формулой (IV)



(IV)

где Xaa<sub>10</sub> может быть Gln или Ser;  
 Xaa<sub>11</sub> может быть Thr, Glu или Asp;  
 Xaa<sub>12</sub> может быть Val или Asn;  
 Xaa<sub>13</sub> может быть Tyr или Phe и  
 Xaa<sub>14</sub> может быть Ser, Asn или Gln.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются выделенные антитела или их фрагменты, способные взаимодействовать с TLR3, содержащие переменные участки тяжелой и легкой цепей, включая антитела, содержащие аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 195, где LCDR3 последовательности SEQ ID NO: 195 определен формулой (VI)



(VI)

где Xaa<sub>18</sub> может быть Tyr, Gly или Ala;  
 Xaa<sub>19</sub> может быть Gly, Glu или Asn;  
 Xaa<sub>20</sub> может быть Ser или Thr;  
 Xaa<sub>21</sub> может быть Val, Ile или Leu;  
 Xaa<sub>22</sub> может быть Ser или Leu и  
 Xaa<sub>23</sub> может быть Ile, Ser, Pro или Tyr.

В настоящем изобретении также предлагаются выделенные антитела и их фрагменты, способные



взаимодействовать с TLR3, 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. 1a.

Антитела, чьи аминокислотные последовательности антигенсвязывающих участков не отличаются существенно от последовательностей, представленных в табл. 1a (SEQ ID NOs: 49-121 или 191-196), рассматриваются как часть настоящего изобретения. Как правило, это относится к аминокислотным замещениям с аминокислотами, имеющими сходный заряд, гидрофобные или стереохимические характеристики. Также могут быть сделаны дополнительные замещения в каркасных участках, в отличие от антигенсвязывающих участков, в случае, если они не изменяют свойств антитела. Могут быть осуществлены и замещения, улучшающие свойства антитела, такие, например, как стабильность или аффинность. Одно, два, три, четыре, пять или шесть замещений могут быть сделаны в антигенсвязывающем участке.

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.

Таблица 1b

Начальный остаток	Примерные замены	Более консервативные замены
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, Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	He
Lys (K)	Arg, 1, 4 Ácido diamino-butírico, 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, Norleucine	Leu

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. 1b 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. В табл. 2a и 2b показаны остатки антигенсвязывающих участков некоторых антител, предложенных в настоящем изобретении, согласно Кабату, Котии и IMGT, а также их композитные последовательности.

Таблица 1c

Семейство	LCDR3											SEQ. ID N°:	
17													
mAb													
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		Y	D	G, E, S	D, N	E, S	F, A, L	T	V			191

Семейство	HCDR2																SEQ. ID N°:		
17																			
mAb																			
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																			



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		
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	HCDR2														SEQ. ID N°:			
19																		
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						
Общий типичный элемент	F, R	I	D	P	S	D	S	Y	T	N	Y	A, S	P	S	F	Q	G	196

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	Котия		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	Котия		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	Котия		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		NYWIG		FIDPDSYNTNYAPSFQ		ELYQGYMDTFDS
15-2	Котия		GYSFT		PSDSYT		LYQGYMDTFD
15-2	Общий типичный элемент	115	GYSFTNYWIG	112	FIDPDSYNTNYAPSFQ	84	ARELYQGYMDTFDS
15-3	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPDSYNTNY	84	ARELYQGYMDTFDS
15-3	Кабат		NYWIS	86	FIDPDSYNTNYAPSFQ	84	ELYQGYMDTFDS
15-3	Котия		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		FIDPDSYNTNYSFSQ		ELYQGYMDTFDS
15-4	Котия		GYSFT		PSDSYT		LYQGYMDTFD
15-4	Общий типичный элемент	111	GYSFTNYWVG	117	FIDPDSYNTNYSFSQ	84	ARELYQGYMDTFDS
15-5	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPDSYNTNY	84	ARELYQGYMDTFDS
15-5	Кабат		NYWIS		RIDPDSYNTNYSFSQ		ELYQGYMDTFDS
15-5	Котия		GYSFT		PSDSYT		LYQGYMDTFD
15-5	Общий типичный элемент	116	GYSFTNYWIS	118	RIDPDSYNTNYSFSQ	84	ARELYQGYMDTFDS

15-6	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPSPDSYNTNY		ARQLYQGYMDTFDS
15-6	Кабат		NYWIS		FIDPSPDSYNTNYAPSFQ		QLYQGYMDTFDS
15-6	Котия		GYSFT		PSPDSYT		LYQGYMDTFD
15-6	Общий типичный элемент	116	GYSFTNYWIS	112	FIDPSPDSYNTNYAPSFQ	119	ARQLYQGYMDTFDS
15-7	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPSPDSYNTNY	84	ARELYQGYMDTFDS
15-7	Кабат		NYWVG		FIDPSPDSYNTNYAPSFQ		ELYQGYMDTFDS
15-7	Котия		GYSFT		PSPDSYT		LYQGYMDTFD
15-7	Общий типичный элемент	111	GYSFTNYWVG	112	FIDPSPDSYNTNYAPSFQ	84	ARELYQGYMDTFDS
15-8	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPSPDSYNTNY	84	ARELYQGYMDTFDS
15-8	Кабат		NYWVG		FIDPSPDSYNTNYAPSFQ		ELYQGYMDTFDS
15-8	Котия		GYSFT		PSPDSYT		LYQGYMDTFD
15-8	Общий типичный элемент	111	GYSFTNYWVG	112	FIDPSPDSYNTNYAPSFQ	84	ARELYQGYMDTFDS
15-9	IMGT	82	GYSFTNYW	86	IDPSPDSYNTNY	119	ARQLYQGYMDTFDS
15-9	Кабат		NYWIS		RIDPSPDSYNTNYSPSFQG		QLYQGYMDTFDS
15-9	Котия		GYSFT		PSPDSYT		LYQGYMDTFD
15-9	Общий типичный элемент	116	GYSFTNYWIS	118	RIDPSPDSYNTNYSPSFQG	119	ARQLYQGYMDTFDS

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются выделенные 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 2b

mAb	Определение CDR	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность
14	IMGT	79	QSIGLY	80	AAS	85	QQAETVSPT
14	Кабат		RASQSIGLYLA		AASSLQS		QQAETVSPT
14	Котия		SQSIGLY		AAS		AETVSP
14	Общий типичный элемент	109	RASQSIGLYLA	110	AASSLQS	85	QQAETVSPT
15	IMGT	79	QSIGLY	80	AAS	87	QQGNTLSYT
15	Кабат		RASQSIGLYLA		AASSLQS		QQGNTLSYT
15	Котия		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	Котия		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	Котия		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	Котия		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	Котия		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	Котия		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	Котия		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	Котия		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	Котия		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	Котия		SQSIGLY		AAS		GNTLSY
15-9	Общий типичный элемент	109	RASQSIGLYLA	110	AASSLQS	113	QQGNTLSYT

Таблица 3а

mAb	SEQ ID NO:		mAb	SEQ ID NO:	
	VH	VL		VH	VL
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	F17	198	197
7	26	25	F18	200	199
8	28	27	F19	202	201
9	30	29	C1811	164	163
10	32	31	9QVQ/QSV	212	209
11	34	33	10QVQ/QSV	213	210
12	36	35	12QVQ/QSV	214	211
13	38	37	14EVQ	215	39
14	40	39	15EVQ	216	41
15	42	41			

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. Определенный ва-



риабельный участок может использоваться для поиска доменов, формирующих двудоменный специфичный антигенсвязывающий фрагмент, способный, например, связываться с TLR3. Поиск может быть осуществлен путем комбинаторных фаговых способов поиска с помощью, например, иерархического двойного комбинаторного метода, предложенного в публикации РСТ № WO 92/01047. Согласно указанному методу индивидуальная колония, содержащая клон Н 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 комбинаторными фаговыми способами.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются выделенные 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 выделенных антителах, имеющих определенную аминокислотную последовательность тяжелой и легкой цепей, как показано в табл. 3b.

Следующий аспект данного изобретения заключается в выделенных 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 рассматриваются как часть настоящего изобретения.

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. Было показано, что конъюгация терапевтических антител с PEG усиливает их фармакодинамику и при этом не изменяет функцию. См. 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; and Yang et al., *Protein Eng.* 16:761-770, 2003.

Таблица 3b

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
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 другими 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* энзимы, 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 биспецифичных антителах IgG два участка Fab молекулы антитела отличаются эпитопами, 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 в позиции 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 SEQ ID NOs: 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, вариация расположенных в каркасном сегменте аминокислотных остатков зоны Верньера может быть использована для модулирования аффинности антитела согласно патенту США № 6639055. Недавно Almagro et al. описали "определяющие аффинность аминокислотные остатки", ADR, которые расположены в CDR. Биоинженерное вмешательство в архитектуру этих участков может увеличить аффинность (Cobaugh et al., *J. Mol Biol.* 378: 622-633, 2008).

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) свертывание индивидуальных доменов, влияющее 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). Способные дестабилизировать структуру аминокислотные остатки могут быть идентифицированы на основании кристаллической структуры антитела или путем молекулярного моделирования, а эффект определенных аминокислотных оснований на стабильность антитела может быть проверен путем создания мутаций и оценки их влияния. Один из способов увеличить стабильность антитела заключается в том, чтобы увеличить срединную точку термперехода ( $T_m$ ), измеряемую путем дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). 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 деградация, которая также зависит от склонности белка к нарушению третичной структуры (Remmele et al., *BioPharm.*, 13:36-46, 2000). Многие исследования свидетельствуют о корреляции между степенью физической стабильности, измеренной как термостабильность путем DSC, и измерениями, проведенными с помощью других способов (Gupta et al., *AAPS PharmSci.* 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). Исследования различных формул лекарственных композиций позволяют предположить, что  $T_m$  фрагмента Fab имеет значение для долгосрочной физической стабильности

соответствующих mAb. Различия в аминокислотной последовательности либо в каркасном сегменте, либо в пределах сегментов CDR могут оказывать значительное влияние на термостабильность 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 Biacore или KinExA, набора реагентов ELISA 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, как показано в приложении.

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, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью 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 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 или 210.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения заключается в клетках-хозяевах, имеющих любой из предложенных в настоящем изобретении полинуклеотидов, кодирующих полипептид, содержащий 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 или 167. 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 взаимодействовать 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.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения заключается в выделенных антителах или их фрагментах, способных взаимодействовать с TLR3, причем данные антитела связываются по меньшей мере с одним принадлежащим TLR3 аминокислотным остатком из группы (a) аминокислотные остатки K467, R488 или R489 из последовательности SEQ ID NO: 2; (b) аминокислотный остаток K467 из последовательности SEQ ID NO: 2; (c) аминокислотный остаток R489 из последовательности SEQ ID NO: 2; (d) аминокислотные остатки K467 в R489 из последовательности SEQ ID NO: 2; (e) аминокислотные остатки K467, R488 и R489 в SEQ ID NO: 2. Выделенные антитела могут связываться с по меньшей мере одним аминокислотным остатком TLR3, выбранным из аминокислотных остатков Y465, Y468, N517, D536, Q538, H539, N541, E570 или K619 в SEQ ID NO:2.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения заключается в описании выделенных антител или их фрагментов, причем антитела связывают по меньшей мере один аминокислотный остаток рецептора TLR3, выбранный из группы остатков D116 или K145 в SEQ ID NO: 2.

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* прикрепления одного белка к другому с целью иден-

тификации 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 локализации 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.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенным антителам или их фрагментам, способным взаимодействовать 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 (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 выделенными антителами, содержащими переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216, и аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи SEQ ID NO: 41, а также антитела, содержащие аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой цепи SEQ ID NO: 214 и аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи 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 ELISA. 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 (см. описание в публ. РСТ № WO 06/060513A2), TLR3.7 (eBioSciences, cat no 14-9039) и Imgenex IMG-315A (Imgenex IMG-315A; созданный против аминокислот аминокислотной последовательности 55-70, VLNLTHNQLRRLPAAN, TLR3 человека) 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 выделенных антителах, способных взаимодействовать с TLR3, причем антитела имеют по меньшей мере одно из следующих свойств:

- a) уменьшают биологическую активность TLR3 при анализе *in vitro* с использованием гена-репортера poly(I:C) NF-kB >50% при концентрации <1 мкг/мл;
- b) ингибируют >60% продукцию IL-6, либо CXCL5/IP-10 в клетках BEAS-2B, стимулированных воздействием <100 нг/мл poly(I:C) при <10 мкг/мл;
- c) ингибируют >50% продукцию IL-6, либо CXCL5/IP-10 в клетках BEAS-2B, стимулированных воздействием <100 нг/мл poly(I:C) при <0,4 мкг/мл;
- d) ингибируют >50% продукцию IL-6 в клетках NHBE, стимулированных воздействием 62,5 нг/мл poly(I:C) при <5 мкг/мл;
- e) ингибируют >50% продукцию IL-6 в клетках NHBE, стимулированных воздействием 62,5 нг/мл poly(I:C) при <1 мкг/мл;
- f) ингибируют >20% poly(I:C)-индуцированную продукцию IFN-γ, IL-6 или IL-12 в клетках PBMC при <1 мкг/мл.
- g) ингибируют биологическую активность TLR3 яванского макака в тестовой системе *in vitro*, с использованием гена-репортера при IC50 <10 мкг/мл; или
- h) ингибируют биологическую активность TLR3 яванского макака в тестовой 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 быть полезны 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.

В целом воспалительные, инфекционные или иммуноопосредованные воспалительные заболевания, 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 заболеваний являются связанные с сепсисом заболевания, 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 заболеваниями являются цитокиновый шторм или гиперцитокинемия, синдром системного воспалительного ответа (SIRS), реакция "трансплантат против хозяина" (GVHD), синдром острой дыхательной недостаточности (ARDS), синдром острой тяжелой дыхательной недостаточности (SARS), катастрофический антифосфолипидный синдром, 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, супрессия воспалительного ответа 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 poly(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, ФНО- $\alpha$ , MIP-1, CXCL5/IP-10 и RANTES, а также провоспалительных цитокинов и хемокинов, участвующих в рекрутинге и активации иммунокомпетентных клеток, приводя к разрушению ткани в случае аутоиммунных и других воспалительных заболеваний. Эндогенные матричные РНК, являющиеся лигандами TLR3, освобождаются 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 рекрутинг 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.

Примером воспалительных заболеваний являются связанные с сепсисом заболевания, к которым относится синдром системного воспалительного ответа (SIRS), септический шок или синдром полиорганной недостаточности (MODS). Двухцепочечные РНК, освобождаемые при вирусных, бактериальных, грибковых или паразитарных инфекциях, а также некротическими клетками, могут способствовать возникновению сепсиса. Опуская теоретическое обоснование, утверждается, что лечение антагонистами TLR3 может дать положительный терапевтический эффект, увеличивая время жизни пациентов, страдающих от связанных с сепсисом воспалительных заболеваний, или предотвратит распространение местного воспалительного процесса (например, в легких) и превращения воспаления в системное заболевание 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 возможности проведения необходимого для выживания пациента дополнительного лечения (например, лечения основной инфекции или уменьшения уровня цитокинов). Сепсис может исследоваться на животных моделях, например, у мышей, введением D-галактозамина и poly(I:C). В данных моделях D-галактозамин является гепатотоксином, который функционирует как агент, увеличивающий вероятность возникновения сепсиса, тогда как poly(I:C) является индуцирующим сепсис соединением, которое имитирует двухцепочечную РНК, и активирует TLR3. Лечение антагонистами TLR3 может увеличить показатели выживаемости при сепсисе у мышей, и, следовательно, антагонисты TLR3 могут быть полезны в лечении 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 длинным 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. Типично к хроническим желудочно-кишечным воспалительным заболеваниям относятся воспалительное заболевание пищеварительного тракта (IBD), индуцированные внешними воздействиями колиты (например, желу-

дочно-кишечное воспаление (например, колиты), вызванное или сопутствующее (например, в качестве побочного эффекта) терапевтическим режимам, таким как химиотерапия, радиотерапия и т.п.), инфекционный колит, ишемический, коллагеновый или лимфоцитный 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 (IBD) включают группу хронических воспалительных заболеваний обычно неизвестной этиологии, например язвенный колит (UC) и болезнь Крона (CD). Клинические и экспериментальные наблюдения позволяют предположить, что патогенез IBD 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 широко используемыми являются 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). Другая модель использует декстран сульфата натрия (DSS), который индуцирует острый колит, сопровождающийся такими симптомами, как кровавая диарея, потеря веса, сокращение прямой кишки и вызываемое инфильтрацией нейтрофилов изъязвление слизистой оболочки. DSS-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<sup>high</sup> 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, *Surg. 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 IBD, например, лечение антителами против ФНО- $\alpha$  уже в течение десятилетия используется 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 выработка новых подходов для лечения указанных пациентов.

Другим примером воспалительного заболевания является воспаление 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 кистозный фиброз, заболевания, индуцированные физической травмой легких, например, нарушение легочной вентиляции. Указанные воспалительные заболевания также включают астму, эмфизему, бронхиты, хронические обструктивные заболевания легких (COPD), саркоидозы, гистиоцитозы, лимфоангиоматозы, острое повреждение легких, синдром острого нарушения дыхания, хроническое заболевание легких, бронхопульмональная дисплазия, внебольничная пневмония, госпитальная пневмония, вызванная искусственной вентиляцией легких пневмония, сепсис, вирусная пневмония, инфекции гриппа, парагриппозные инфекции, инфекции ротавируса, инфекции человеческого метапневмовируса, 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, кистозный фиброз, бронхит, обострения заболеваний дыхательных путей и синдром острого нарушения дыхания (ARDS). 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 (АHR), бронхостенозом, хрипами в легких, эозинофильным или нейтрофильным воспалением, гиперсекрецией слизи, субэпителиальным фиброзом и увеличением уровня иммуноглобулина IgE. Больные астмой пациенты испытывают "приступы", ухудшение симптомов, чаще всего вследствие инфекций респираторного тракта (например, риновирус, грипп, гемофильная палочка *Haemophilus influenzae*, и пр.). Астматические атаки 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 (COPD), бактериальная пневмония и кистозный фиброз (Linden et al., *Eur. Respir. J.* 15:973-977, 2000; Rahman et al., *Clin. Immunol.* 115:268-276, 2005), а такие заболевания, как COPD, аллергические риниты и кистозный фиброз 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 модель провокационного введения овальбумина, 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 эпителиальных бронхиальных клеток человека, 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, COPD и других подобных заболеваний.

Другие воспалительные заболевания и нейропатии, которые могут быть предупреждены или вылечены представленными в настоящем изобретении способами, являются болезнями, вызванными аутоиммунными заболеваниями. Эти заболевания и нейропатии включают рассеянный склероз, системную красную волчанку и нейродегенеративные заболевания и расстройства центральной нервной системы (CNS), например болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, биполярное аффективное расстройство и амиотрофический боковой склероз (ALS), болезни печени, например первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, неалкогольная жировая инфильтрация (жировой 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, псориаз, гигантоклеточный артериит, анкилозный спондилит, аутоиммунный гепатит, вирус иммунодефицита человека (HIV), 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.

Артрит, включая остеоартрит, ревматоидный артрит, возникший в результате повреждения артрит 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 встречаемых форм артрита. Поскольку ревматоидный артрит приводит к поражению тканей, лиганды TLR3, скорее всего, присутствуют в том месте, где происходит воспаление. 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 (CIA) у мыши развивается хронический воспалительный артрит, который сильно напоминает человеческий ревматоидный артрит. Введение представленных в настоящем изобретении антагонистов TLR3 модельной мыши CIA 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 увеличения 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 инсулинрезистентных индивидуумов секретруется аномально высокое количество инсулина, что имеет компенсаторный эффект. При наличии неадекватного количества инсулина для компенсации резистентности к инсулину и контроля уровня глюкозы развивается состояние нарушения толерантности к глюкозе. У значительного числа индивидуумов во время

болезни секреция инсулина уменьшается, и уровень 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 ФНО- $\alpha$  и IL-6, свободных жирных кислот и адипокинов, способных оказывать влияние на инсулиновый сигнальный путь и индуцировать развитие резистентности к инсулину. Активация рецепторов TLR3 на макрофагах может приводить к возникновению провоспалительного состояния жировой ткани. Существует несколько моделей для изучения резистентности к инсулину. Например, модельные животные, страдающие алиментарным ожирением (DIO), развивают гипергликемию и резистентность к инсулину, сопровождаемые потерей веса. Введение представленных в настоящем изобретении антагонистов TLR3 модельным животным DIO может быть использовано для оценки эффективности антагонистов в облегчении осложнений, связанных с диабетом типа 2, и изменении течения болезни.

К раковым заболеваниям относятся злокачественные изменения в клетке, ткани, органе, организме, будь то животное или человек, включая, помимо прочего, такие заболевания, как лейкемия, острая лейкемия, острый лимфобластный лейкоз (лимфолейкоз) (ALL), В-лимфобластный, либо Т-лимфобластный ALL, острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелоидный лейкоз (CML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточный лейкоз, миелодиспластический синдром (MDS), 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.

Примеры сердечно-сосудистых заболеваний включают сердечно-сосудистые заболевания 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, тромбангиит (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.

Примеры неврологических заболеваний включают неврологические заболевания 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-Тома, 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, детская 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.

Примеры фиброзных заболеваний 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 ретроорбитальным 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, язвенный 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 тестовые 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 животных модельных тестовых системах *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 агента, предназначенного для терапевтического использования, может быть использован любой приемлемый путь введения, который обеспечивает попадание агента к пациенту.

Фармацевтические композиции данных агентов являются особенно полезными при парентеральном введении, например, внутривенном, внутримышечном, внутривагинальном, интраназальном или 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, минеральное, кунжутное и другие подобные масла. Например, могут быть использованы 0,4% раствор по-

варенной 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 по меньшей мере 1%) до 15-20% от веса и определяется, в первую очередь, на основании необходимой дозы, объеме, 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 парэнтерально вводимых композиций хорошо известны и их детальное описание может быть найдено, 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 антител человека MorphoSys и библиотека фаговых антител (HuCAL®) Gold (Morphosys AG, Мартинсрид, Германия) были использованы для поиска фрагментов антител человека и их сравнения с очищенным TLR3 антигеном, созданным в результате экспрессии аминокислот 1-703 TLR3 человека (huTLR3) (SEQ ID NO: 4), содержащим меченый полигистидином C-конец; очистка антигена была осуществлена с помощью иммобилизованной металл-аффинной хроматографии. Аминокислоты 1-703 соответствуют предсказанному внеклеточному домену (ECD) рецептора человека huTLR3. Фрагменты Fab, специфически связывающиеся с huTRL3 ECD, были отобраны на основе различных форм белка TLR3 так, что различные фрагменты антител могли быть выбраны, секвенированы и объявлены уникальными. Используя различные стратегии, было отобрано 62 белка-кандидата (с различными последовательностями V-сегмента), способные связываться исключительно с huTLR3 ECD.

Эти 62 белка, идентифицированные как способные связываться исключительно с huTLR3 ECD, были проверены на способность нейтрализовать активность с помощью целого ряда работающих на клеточном уровне тестовых 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. Перечисление переменных участков легкой и тяжелой цепей каждого из 19 кандидатов показано в табл. 3. Указанные кандидаты будут далее называться mAb 1-19 или Fabs 1-19, в зависимости от того, являются ли они фрагментами антител Fab, или представляют собой полную клонированную последовательность антитела (пример 3). Вследствие особенности дизайна экспрессионного вектора крайними сегментами переменных 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 лямбды подгруппы 3, и существуют свидетельства гетерогенности S или Y в отношении конечного остатка. Таким образом, было решено, что консенсус-последовательности терминального участка QSV подгруппы лямбда 1 лучше всего подходят для замещения DIE в VL семействах 17 и 18. Данные изменения были введены в последовательности-кандидаты 9, 10 и 12 из семейства 18, а также в кандидаты 14 и 15 из семейства 19. В процессе этого бы-

ли оптимизированы кодоны в участках VH и VL данных антител. Варианты N-конца аминокислотных последовательностей варибельного 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 варибельного 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 NF- $\kappa$ B и сигнальный каскад ISRE.

Клетки 293T культивировали в средах DMEM и GlutaMax (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния), содержащих инактивированный с помощью термического воздействия FBS, затем клетки были трансфицированы введением 30 нг pNF- $\kappa$ B или плазмидой-репортером ISRE, содержащей ген люциферазы светлячка, 13,5 нг вектора pCDNA3.1, 5 нг вектора pHRL-TK и 1,5 нг вектора pCDNA, кодирующего FL TLR3 (SEQ ID NO: 2). Плазида pHRL-TK содержит ген люциферазы Renilla (люцифераза коралла, Renilla reniformis), регулируемый HSV-1 промотором тимидинкиназы (Promega, Мадисон, Висконсин). Антитела TLR3 инкубировали в течение 30-60 мин перед добавлением poly(I:C) (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси). 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) люциферазы светлячка на RLU коралловой люциферазы (Renilla). После стимуляции агентом poly(I:C), являющимся агонистом TLR3 (1 мкг/мл), добились специфического ингибирования каскада передачи сигнала с участием NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B показаны на фиг. 1, как выраженное в процентах относительное ингибирование люцифераз Firefly/Renilla, рассматривая 5465 в качестве положительного контроля (нейтрализация mAb против TLR3 человека) и mAb против тканевого фактора человека (859) в качестве контроля для изотипа человека 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 клетки бронхиального эпителия человека) высевали на чашки, покрытые коллагеном типа 1, и перед добавлением poly(I:C) инкубировали с антителами против TLR3 человека или без них. 24 ч спустя после обработки супернатанты были собраны и проанализированы на уровень содержания цитокинов или хемокинов с помощью адаптированной мультиплекс-тестовой системы, использующей микрочастицы и направленной на детекцию IL-6, IL-8, CCL-2/MCP-1, CCL5/RANTES и CXCL10/IP-10. Результаты приведены на фиг. 2 как выраженное в процентном соотношении ингибирование индивидуальных цитокинов/хемокинов, полученное в результате обработки mAb при 0,4, 2,0 и 10 мкг/мл. 5465 - положительный контроль; 859 - изотипный контроль.

Производство цитокинов клетками NHBE.

Производство цитокинов может быть также изучено в нормальных клетках эпителия человека (NHBE) (Lonza, Уолкерсвилл, Мэриленд). Клетки NHBE были размножены, а затем перенесены на покрытые коллагеном чашки и инкубировались в течение 48 ч, после чего удалили использованную среду и добавили 0,2 мл свежей среды. Клетки инкубировались с mAb против TLR3 человека или без них в течение 60 мин перед добавлением poly(I:C). Спустя 24 ч супернатанты собрали и затем либо сохраняли при -20°C, либо анализировали на уровень содержания IL-6. Результаты приведены в графиках, представленных на фиг. 3, как выраженное в процентном соотношении ингибирование секреции IL-6 в результате обработки mAb дозами в диапазоне от 0,001 до 50 мкг/мл. 5465 положительный контроль, 859 - изотипный контроль. Большинство mAb ингибировали по меньшей мере 50% производства IL-6 при <1 мкг/мл и достигали 75% ингибирования при <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. Пробирки центрифугировались и клетки PBMC, формирующие белый слой непосредственно над слоем Ficoll, были собраны и высеяны на планшеты. После чего, клетки PBMC культивировали с mAb против TLR3 человека или без них перед добавлением 25 мкг/мл poly(I:C). Супернатанты были собраны спустя 24 ч, и уровень цитокинов был определен с помощью технологии Luminex. Результаты представлены в графике на фиг. 4, где показано выраженное в процентном соотношении суммарное ингибирование IFN- $\lambda$ , 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.

Коротко говоря, клетки гладкой мускулатуры дыхательных путей человека (HASM) инкубировались с mAb против TLR3 человека или без них, после чего к клеткам была добавлена комбинация 500 нг/мл poly(I:C) и 10 нг/мл ФНО- $\alpha$ . Спустя 24 ч супернатанты собрали и определили уровень цитокинов с помощью технологии Luminex. Результаты показаны в графиках на фиг. 5 в виде уровней хемокина CCL5/RANTES при трех дозах mAb (0,4, 2 и 10 мкг/мл). 5465 использован в качестве положительного контроля; huIgG4 использован в качестве контроля 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 имеющих полную длину антител.

Четыре исходных фрагмента Fab (кандидаты № 16-19) и 15 дочерних Fabs (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, 7, 6	98
8	99
9	100
10, 12, 11	101
13, 15, 14	102
9EVQ	218
10EVQ, 12EVQ	219
14EVQ, 15EVQ	220

Для экспрессии данные последовательности тяжелых цепей могут содержать на N-конце лидерную последовательность, такую как MAWVWTLFLMAAAQSIQA (SEQ ID NO: 103). Нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь кандидатов 14EVQ и 15EVQ с лидерной последовательностью, а также зрелая форма (без лидерной последовательности) показаны в SEQ ID NO: 104 и 105 соответственно. Аналогичным образом, последовательности легких цепей предложенных в настоящем изобретении антител могут включать на N-конце лидерную последовательность, такую как MGVPTQVLGLLLLWLTDARC (SEQ ID NO: 106). Отдельные легкие цепи кандидата 15 с оптимизированными кодонами, имеющие лидерную последовательность, и зрелая форма (без лидерной последовательности) показаны в SEQ ID NO: 107 и 108 соответственно.

Пример 4.

Характеристика связывания mAb против TLR3.

Значения EC50 при связывании mAb с внеклеточным доменом (ECD) TLR3 человека определяли способом ELISA. Белок ECD TLR3 человека разводили до 2 мкг/мл в ФБР, и аликвоты по 100 мкл вноси-

ли в каждую лунку 96-луночного планшета (Corning Inc., Эктон, Массачусетс). После инкубации в течение ночи при 4°C планшету трижды промывали отмывочным буфером, содержащим 0,05% Твин-20 (Sigma-Aldrich) в ФБР. Лунки блокировали 200 мкл блокирующего раствора, содержащего 2% I-Block (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния) и 0,05% Твин-20 в ФБР. После блокирования в течение 2 ч при комнатной температуре планшету промывали 3 раза, затем добавляли серийные разведения кандидатов mAb против TLR3 в отношении 1 к 19 в блокирующем буферном растворе. mAb против TLR3 инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч и трижды промывали. Затем добавляли конъюгированные с пероксидазой овечьи антитела против IgG человека (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси), 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., Конкорд, Массачусетс). Реакцию остановили 25 мкл 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и измерили поглощение при 450 нм (вычитая поглощение при 650 нм) с помощью спектрофотометра SPECTRA Max (Molecular Devices Corp., Саннивейл, Калифорния). Значения EC50 определяли способом нелинейной регрессии с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего, Калифорния).

Значения EC50 определяли в реакции связывания, инкубируя huTLR3 (табл. 4) со 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 IgG4K.

Таблица 4

Кандидат №	EC50 (нг/мл)
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

Аффинность связывания для huTLR3 ECD определяли также с помощью Вiascore-анализа. Полученные данные (не показаны) продемонстрировали, что Kd mAb 1-19 при связывании с huTLR3 ECD составляет менее 10<sup>-8</sup> М.

Пример 5.

Конкурентное связывание с эпитопами.

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

При конкурентном ELISA 5 мкл очищенного белка TLR3 ECD человека (20 мкг/мл), синтезированного в соответствии с описанием в примере 1, наносили в лунки планшета MSD HighBind (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд) и выдерживали 2 ч при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли 150 мкл 5% блокирующего буфера А MSD и инкубировали в течение 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 добавляли в обозначенные лунки в объеме 25 мкл. После 2 ч инкубации с осторожным встряхиванием при комнатной температуре планшеты трижды промывали буфером 0,1 М HEPES (pH 7,4). Буферный

раствор MSD Read Buffer T разбавляли дистиллированной водой (4-кратно), разливали по 150 мкл/лунку и анализировали с помощью SECTOR Imager 6000. Антитела метили MSD Sulfo-Tag™ NHS-эфиром в соответствии с инструкциями производителя.

Оценивали следующие антитела против TLR3: mAb 1-19, полученные из комбинаторной библиотеки антител человека Morphosys (показаны в табл. 3а); c1068 (описанные в WO 06/060513A2), c1811 (красные 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 TLR3 человека аминокислот 55-70 (VLNLTNQLRRLPAAN) 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-315A; 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 различных 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-белкового докинга (The Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology, Volume 6, Glen E. Morris ed., 1996).

Замена сегментов TLR3. Для определения местоположения антителосвязывающих доменов на TLR3 использовали химерные белки TLR3 мышь/человек. Внеклеточный домен белка TLR3 человека делили на три сегмента (aa 1-209, aa 210-436, aa 437-708 в соответствии с нумерацией аминокислот в TLR3 человека, GenBank Acc. No. NP\_003256). Химерный белок MT5420 был создан путем замены аминокислот TLR3 человека 210-436 и 437-708 на соответствующие мышиные аминокислоты (мышинный TLR3, GenBank Acc. No. NP\_569054, аминокислоты 211-437 и 438-709). Химера MT6251 была создана путем замены аминокислот человека в положениях 437-708 на аминокислоты мышиного TLR3 (мышинный TLR3, GenBank Acc. No. NP\_569054, аминокислоты 438-709). Все конструкторы были созданы на основе вектора pCEP4 (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) с помощью стандартных процедур 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 TLR3 ECD человека, однако не связывается надлежащим образом с мышиным TLR3. c1068 утратило способность связываться как с MT5420, так и с MT6251, из чего можно сделать вывод, что сайт связывания располагался в пределах последовательности аминокислот 437-708 WT белка TLR3 человека.

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

Компьютерное моделирование белок-белкового докинга. Кристаллическая структура mAb 15EVQ (см. ниже) и опубликованная структура TLR3 человека (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. Белковый докинг проводился с ZDOCKpro 1.0 (Accelrys, Сан-Диего, Калифорния), эквивалентным ZDOCK 2.1 (Chen и Weng, Proteins 51: 397-408, 2003) с угловым гридом 6 градусов. Известный сайт N-гликозилирования по остатку Asn в TLR3 человека (Asn 52, 70, 196, 252, 265, 275, 291, 398, 413, 507 и 636) (Sun et al., J. Biol. Chem. 281:11144-11151, 2006) блокировали так, чтобы он не участвовал в формировании интерфейса комплекса антитело-антиген (по энергии) по алгоритму ZDOCK. Были просчитаны и сгруппированы 2000 начальных положений, положения с докингом были уточнены и заново просчитаны в 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 mAb 15EVQ проводилась способом диффузии пара при 20°C (Benvenuti и Mangani, Nature Protocols 2:1633-51, 2007). Начальный скрининг проводили с помощью робота 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 Трибуфера, pH 7,4, содержащий 50 мМ NaCl, концентрировали до 14,3 мг/мл с помощью ячеек Amicon Ultra-5 kDa. Скрининг проводили с помощью Wizard I & II (Emerald BioSystems, Бейнбридж Айленд, Вашингтон) и производственных экранов для кристаллизации.

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, Вуд-

лендс, 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 REFMAC, используя все данные в диапазоне разрешения 15-2,2 Å для mAb 15 и в диапазоне 50-1,9 Å для mAb 12. Молекулы воды добавляли при (F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>) максимальной электронной плотности с порогом 3σ. Все кристаллографические расчеты проводили с помощью пакета программ CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4. 1994. Пакет CCP4: 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-белкового докинга 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 TLR3 ECD 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 TLR3 (ECD) человека, (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.

Таблица 5а

Олигонуклеотиды, используемые для сайт-направленного мутагенеза. Показаны последовательности смысловых олигонуклеотидов. При реакции мутагенеза использовали антисмысловые олигонуклеотиды с комплементарными последовательностями.

Вариант	Олиго	Seq ID N°:
R64E	5' CCTTACCCATAATCAACTCGAGAGATTACCAGCCGCCAAC 3'	136
K182E	5' CAAGAGCTTCTATTATCAAACAATGAGATTCAAGCGCTAAAAAGTGAAGS'	137

K416E	5' CCTTACACATACTCAACCTAACCGAGAATAAAATCTCAAAAATAG 3'	138
K467E/Y468A	5' GAAATCTATCTTTTCTTACAACGAGGCCCTGCAGCTGACTAGGAACTC 3'	139
R488/R489/K493E	5' GCCTTCAACGACTGATGCTCGAGGAGGTGGCCCTTGAGAATGTGGATAGCTCTCCTTC 3'	140
T472S/R473T/N474S	5' GTACCTGCAGCTGTCTACGAGCTCCTTTGCCTTGGTCCC 3'	141
N196A	5' GAAGAACTGGATATCTTTGCGCTTCATCTTTAAAAAATTAGAGTTG 3'	169
Q167A	5' GTCATCTACAAAATTAGGAACTGCGGTTTCAGCTGGAAAATCTCC 3'	170
K163E	5' CTCATAATGGCTTGTCTATCTACAGAATTAGGAACTCAGGTTTCAGC 3'	171
K147E	5' GAAAATTAATAAATCCCTTTGTCAAGCAGGAGAATTTA A TCA CATTGA TCTGTC 3'	172
K145E	5' GAAAATTAATAAATCCCTTTGTGCGAGCAGAAGAATTTA A TCA CATTGA G 3'	173
V144A	5' CAGAAAATTAATAAATCCCTTTGCA A AGCAGA AGA ATTTA ATCACA TTA G 3'	174
N140A	5' CCAACTCAATCCAGAAAATTAAGCTAATCCCTTTGTCAAGCAGAAG 3'	175
D116R	5' CA ATGAGCTATCTCA A CTTTCTCGTAAAACCTTTGCCTTCTGCAC 3'	176
D536K	5' GTCTTGAGAACTAGAAATTTCTCAAGTTGCAGCATAACAACCTTAGCAC 3'	177
D536A	5' CTTGAGAACTAGAAATTTCTCGCATTGCAGCATAACAACCTTAGCAC 3'	178
K619E	5' CTAAGTCATTGAACCTTCAGGAGAATCTCATAACATCCGTTG 3'	179
K619A	5' CTCTAAAGTCATTGAACCTTCAGGCGAATCTCATAACATCCGTTGAG 3'	180
E570R	5' CCACATCCTTAACTTGAGGTCCAACGGCTTTGACGAG 3'	181
N541A	5' GAAATCTCGATTTGCAGCATAACGCCCTTAGCACGGCTCTGGAAAC 3'	182
Q538A	5' GAGAACTAGAAATTTCTCGATTTGGCGCATAACAACCTTAGCACGGC 3'	183
H539E	5' CTAGAAATTTCTCGATTTGCAGGAAAACAACCTTAGCACGGCTCTG 3'	184
H539A	5' CTAGAAATTTCTCGATTTGCAGGCTAACAACCTTAGCACGGCTCTG 3'	185
N517A	5' CATTCTGGATCTAAGCAACAACGCCATAGCCAACATAAATGATGAC 3'	186
Y465A	5' GAAAATATTTTCGAA A TCTA TCTTTCCGCCA A CA A GTA CCTGCA GCTGA C 3'	187
R488E	5' GCCTTCAACGACTGATGCTCGAAAGGTGGCCCTTAAAAATG 3'	188
R489E	5' CTTCAACGACTGATGCTCCGAGAGGTGGCCCTTAAAAATGTGG 3'	189
K467E	5' CGAAATCTATCTTTTCTTACAACGAGTACCTGCAGCTGACTAG 3'	190

Количественная оценка связывания. Активность связывания mAb 12QVQ/QSV и mAb 15EVQ с TLR3 человека и его искусственными вариантами оценивали с помощью ELISA. Для ускорения процесса мутантов в предсказанном сайте связывания mAb 15EVQ коэкспрессировали в клетках НЕК, 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 мутантного TLR3 с mAb 12. Данный способ годится потому, что сайты 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 использовали при оценке связывания с помощью ELISA. В лунки планшеты MSD HighBind (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд) наносили по 5 мкл раствора TLR3 ECD дикого типа или мутантных белков в ФБР (20 мкг/мл). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин и блокировали, оставляя планшеты на ночь в блокирующем буфере А MSD (Meso Scale Discovery, Гейтерсбург, Мэриленд) при 4°C. На следующий день планшеты промывали и добавляли на 1,5 ч меченые MSD Sulfo-tag mAb 15EVQ в концентрациях от 500 до 1 нМ. После промывания меченые антитела выявляли с помощью буферного раствора MSD Read Buffer T, и анализировали планшеты с помощью SECTOR Imager 6000. Для оценки активности связывания mAb 12QVQ/QSV с TLR3 человека и его вариантами осуществляли совместную экспрессию с mAb 15EVQ, оценивали связывание с помощью ELISA, как было описано для mAb 15EVQ



(только детектирующие антитела помечали mAb 12QVQ/QSV).

mAb 12QVQ/QSV. Как было определено в исследованиях с заменой сегмента, сайт связывания с mAb 12QVQ/QSV располагался в пределах аминокислотной последовательности 1-209 TLR3 человека. 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. 6A). 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. 7A).

Два критических остатка mAb 12QVQ/QSV, связывающиеся с эпитопом, располагались вблизи поверхности сайта связывания dsRNA на N-конце эктодомена TLR3 (Pirher, et al., *Nature Struct. & Mol. Biol.*, 15:761-763, 2008). Эпитоп содержит и другие остатки, относящиеся к соседним участкам, не выявленные мутационным анализом. Без связи с какой-либо теорией считается, что связывание mAb 12QVQ/QSV с соответствующим эпитопом на TLR3 может прямо или косвенно препятствовать связыванию dsRNA с эктодоменом TLR3, из-за чего нарушается димеризация рецептора и активация сигналов с нижележащих сигнальных путей.

mAb 15EVQ. Анализу подверглись 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. 6B и табл. 5B). Антитело не связывается с мутантами TLR3 K467E, R489E, K467E/Y468A и R488E/R489E/K493E (фиг. 6B и 6C). 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. 7A). 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 подкреплён исследованиями по замене H/D в mAb 15EVQ. На фиг. 7A показаны эпитопы сайтов связывания mAb 12QVQ/QSV и 15EVQ (чёрный) и C1068 mAb (серый), наложенные на структуру TLR3 человека. Эпитоп для mAb 15EVQ формируется остатками Y465, K467, Y468, R488, R489, N517, D536, Q538, H539, N541, E570 и K619.

Исследования с заменой H/D. При замене H/D процедуры, используемые для анализа возмущения 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, заменяющий атомы водорода. Дейтерированный TLR3 ECD захватывали 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. Области, связанными с антителом, считались те, в которых замена дейтерия на водород происходила в минимальной степени, и, таким образом, в них содержалось больше дейтерия, чем в эталонном образце TLR3 ECD. Приблизительно 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, подвергшегося 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 <sup>465</sup>YNKYLQL<sup>471</sup>, <sup>514</sup>SNNNIANINDDML<sup>526</sup> и <sup>529</sup>LEKL<sup>532</sup> 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, обширное совпадение результатов исследований с заменой H/D и мутациями, позволяет удостовериться, что поверхность, показанная на фиг. 7A, служит сайтом связывания с mAb 15. Этот сайт связывания находится в том же участке последовательности аминокислот, что и сайт, описанный выше для mAb c1068 (публ. PCT № WO 06/060513A2), но который был обнаружен на перекрывающейся поверхности (фиг. 7A), что согласуется с данными об отсутствии перекрестной конкуренции между этими антителами.

Эпитоп, с которым связывается mAb 15EVQ, располагается проксимальнее сайта связывания dsRNA 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 несоответствие с молекулой лиганда dsRNA и/или с димером-партнером, т.е. 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/N474	+++		
S			

#### 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 генам человека 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. По кристаллической структуре антител (см. пример 6) определили потенциально дестабилизирующие структуру остатки. (1) В ядре VH около V34 была идентифицирована маленькая замкнутая полость. Эта полость была достаточно большой, чтобы вместить чуть большую боковую цепь, такую как Ile. (2) VH CDR3 (E99) была погружена в VH/VL интерфейс без водородных связей. Отрицательно заряженная карбоксилатная группа E99 в практически гидрофобном окружении была связана с соседними остатками преимущественно вандерваальсовыми (vdw) 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. Были просчитаны и визуальны проверены в Pymol ([www://\\_pymol\\_org](http://www://_pymol_org)) водородные связи и vdw связи для Fv. Погруженные полости в VH и VL доменах были просчитаны с помощью Caver (Petrek et al., BMC Bioinformatics, 7:316, 2006). Вся молекулярная графика создавалась в Pymol. Мутации в векторах экспрессии,

кодирующих фрагменты Fab или IgG4 полностью антител человека, 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 проверки, полученные варианты инженерных антител назвали mAb с 15-1 по 15-9. Список номеров SEQ для CDR, вариабельных участков легких и тяжелых цепей и полных тяжелых и легких цепей для mAb 15EVQ и его инженерных вариантов приведены в табл. 6. В табл. 7 указаны праймеры, используемые при создании каждого из вариантов.

Таблица 6

Кандидат №:	SEQ. ID N°:									Тяжелая цепь IgG4	Легкая цепь
	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3	LV	HV			
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	

Связывание mAb 15-1 - 15-9 с TLR3 количественно оценивали с помощью иммуноанализа ELISA. TLR3 ECD человека (100 мкл TLR3-ECD в 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, планшету инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Связывание обнаруживали с помощью люминесцентного субстрата POD (Roche Applied Science, Маннгейм, Германия, кат. № 11582950001) и козьих античеловеческих Fc:HRP (Jackson ImmunoResearch, Вест Гроув, Пенсильвания, кат. № 109-035-098), планшету помещали в ридер для планшетов SpectraMax (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния) и проводили анализ.

Таблица 7

Кандидат №:	Мутанты	Праймеры	SEQ. ID №:	Полученная плазмида №	Плазмида-матрица для мутагена №
15-1	HC: F50R	GCCTGGAGTGGATGGGCGGATCGACCCAGCG	142	5042	p4595
		CGCTGGGGTCGATCCGGCCATCCACTCCAGGC	143		
15-2	HC: V34I	AGAGGTAAC TCCCGTTGCCG	144	5046	p4584
		GCATCTGGCGCACCCAGCCGATCCAGTAGTTGGTGAAG	145		
15-3	HC: V34I/G35S	AGAGGTAAC TCCCGTTGCCG	146	5045	p4584
		GCATCTGGCGCACCCAGCCGATCCAGTAGTTGGTGAAG	147		
15-4	HC: A61S/Q67H	AGAGGTAAC TCCCGTTGCCG	144	5048	p4584
		CGCTGATGGTCACGTGGCCCTGGAAGCTAGGGCTGTAGTTGGTGTAG	148		
15-5	HC: F50R/V34I/G35S/A61S/Q67H	CTTCACCAACTACTGGATCAGCTGGGTGCGCCAGATGC	149	5069	p5042
		CGCTGATGGTCACGTGGCCCTGGAAGCTAGGGCTGTAGTTGGTGTAG	148		
15-6	HC: V34I/G35S/E99Q	CGCCATGTACTACTGCGCCCGCCAGCTGTACCAGGGCTAC	150	5070	p5045
		GTAGCCCTGGTACAGCTGGCGGGCGCAGTAGTACATGGCG	151		
15-7	LC: G30S/L31S	GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGGCCTGGTACCAGC	152	5043	p4595
		GCTGGTACCAGGCCAGGTAGCTGTGATGCTCTGGCTGGC	153		
15-8	LC: A34N	AGAGGTAAC TCCCGTTGCCG	144	5047	p4588
		CGGGCTTCTGCTGTACCAGTTCAGGTAGCTGCTGATGCTCTG	154		
15-9	HC: F50R/V34I/G35S/A61S/Q67H/E99Q	CGCCATGTACTACTGCGCCCGCCAGCTGTACCAGGGCTAC	150	5097	p5069*
		GTAGCCCTGGTACAGCTGGCGGGCGCAGTAGTACATGGCG	151		

\* p5069 как единичный ген тяжелой цепи. Варибельный участок p5069 заменяется на остов p5070.

DSC эксперименты проводили на MicroCal's Auto VP-капиллярной системе DSC (MicroCal, LLC, Нортгемптон, Массачусетс), в которой температурные различия между эталонными и опытными лунками непрерывно измерялись и калибровались по блокам питания. Образцы нагревали с 10 до 95°C со скоростью нагревания 60°C/ч. Время до сканирования составляло 15 мин, период фильтрования - 10 с. Концентрация при DSC-экспериментах составляла приблизительно 0,5 мг/мл. Анализ полученных термограмм проводили с помощью программного обеспечения MicroCal Origin 7 (MicroCal, LLC).

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

Краткий обзор температур плавления ( $T_M$ ) вариантов и обоснование для их изготовления

Кандидат №:	Мутации		Обоснование	$T_M$ (°C)	$\Delta T_M$ (°C)
15EVQ		WT		64,7	0
15-1	HV	F50R	взаимодействие VH/VL	69,3	4,6
15-2	HV	V34I	упаковка ядра VH	66,9	2,2
15-3	HV	V34I/G35S	водородная связь, упаковка ядра VH	71,2	6,5
15-4	HV	A61S/Q67H	упаковка VH/VL, распределение заряда по поверхности VH	65,4	0,7
15-5	HV	F50R/V34I/G35S/A61S/Q67H	взаимодействие VH/VL, водородная связь, упаковка ядра VH, упаковка VH/VL, распределение заряда по поверхности VH	76,2	11,5
15-6	HV	V34I/G34S/E99Q	водородная связь, упаковка ядра VH, нейтрализация наведенного заряда	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	HV	F50R/V34I/G35S/A61S/Q67H/E99Q	взаимодействие VH/VL, водородная связь, упаковка ядра VH, упаковка VH/VL, распределение заряда по поверхности VH, нейтрализация наведенного заряда	76	11,3

Пример 8.

Создание суррогатного антитела против TLR3.

Химерное (крыса/мышь) антагонистическое антитело против мышинового TLR3, называемое здесь mAb 5429, было создано для оценки эффектов ингибирования сигналов TLR3 в разных моделях *in vivo*, поскольку гуманизированные антитела, создание которых описано в примере 1, не обладают достаточной специфичностью или антагонистической активностью по отношению к мышинному TLR3. Суррогат химерного mAb 5429, а также родительского крысиного антитела против мышинового TLR3 c1811 ингибировал сигналы мышинового TLR3 *in vitro* и *in vivo*, и облегчал патогенез при моделировании некоторых заболеваний 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, демонстрировавших 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, секретлируемого гибридомой, секвенировали. Затем клонированные гены варибельных участков тяжелой и лег-

кой цепи вставляли в плазмидные векторы экспрессии, что позволило получить кодирующие последовательности для создания химерного Rat/Balb C mAb, созданного, как и mAb 5429, с помощью рутинных способов. Антитела экспрессировали в соответствии с описанием в примере 3. Аминокислотные последовательности варьируемых 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 способом ПЦР из кДНК мышины селезенки (BD Biosciences, Bedford, MA), и клонировали в векторе pCER4 (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) стандартными способами. 200 мкл клеток HEK293T помещали в 96-луночные планшеты с белым прозрачным дном в концентрации  $4 \times 10^4$  клеток/лунку в полной DMEM, и использовали на следующий день для трансфекции с помощью Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp., Карлсбад, Калифорния) с использованием 30 нг pNF- $\kappa$ B люциферазы светлячка (Stratagene, Сандиего, Калифорния) или 30 нг pISRE люциферазы светлячка (BD Biosciences, Бедфорд, Массачусетс), 5 нг pRL-ТК контрольной люциферазы Renilla (Promega Corp., Мэдисон, Висконсин) репортерных плазмид, 1,5 нг pCER4, кодирующего полный мышинный TLR3, и 13,5 нг пустого pcDNA3.1 вектора (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) для внесения суммарного количества ДНК, равного 50 нг/лунку. Через 24 ч после трансфекции к клеткам добавляли антитела против мышинового TLR3 в свежей бессывороточной DMEM и инкубировали в течение 30-60 мин при 37°C, затем добавляли 0,1 или 1 мкг/мл poly(I:C). Через 24 ч считывали данные с планшет 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 со светлячковыми люциферазами (RLU) на RLU Renilla. mAb 5429, а также его родительские mAb c1811 и mAb 15 (табл. 3а), уменьшали индуцированную poly(I:C) активацию NF- $\kappa$ B и ISRE 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 5249, mAb 15 и mAb c1811.

Анализ с использованием мышинных эмбриональных фибробластов (MEF).

Клетки C57BL/6 MEF получили из Artis Optimus (Opti-MEF™ C57BL/6-0001). Клетки помещали в лунки 96-луночной плоскодонной планшеты (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). Все инкубации проводили при 37°C/5%CO<sub>2</sub>. Через 24 ч в лунки планшет добавляли mAb 5429 или mAb c1811. Планшеты инкубировали с mAb в течение 1 ч, после чего в каждую лунку добавляли poly(I:C) в концентрации 1 мкг/мл. Супернатанты собирали после 24 ч инкубации. Уровни 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 poly(I:C) уровни CXCL10/IP-10 в зависимости от дозы. Это показывает, что такие антитела могут быть антагонистами эндогенных TLR3 и могут ингибировать сигналы TLR3 (фиг. 9).

Проточная цитометрия - поверхностное окрашивание.

Мыши с нокаутом C57BL/6 и TLR3 (TLR3KO) (C57BL/6 фон; самки, 8-12 недель, Ace Animals, Inc.), по 10 животных в группе, получали внутрибрюшинно дозу в 1 мл 3% тиогликолевой среды (Sigma), через 96 ч мышей подвергали эвтаназии и брюшину каждой мыши промывали 10 мл стерильного ФБР. Извлеченные тиогликолевой средой брюшинные макрофаги ресуспендировали в ФБР, затем оценивали жизнеспособность клеток с помощью окрашивания Трипановым синим. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 250 мкл буфера FACS (ФБР -Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>, 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/10<sup>6</sup> клеток в течение 10 мин. Клетки в концентрации 10<sup>6</sup> клеток вносили аликвотами по 100 мкл/лунку для поверхностного окрашивания. Конъюгированные с Alexa-Fluor 647 (Molecular Probes) mAb c1811 и mAb 1679 (крысиные антитела против мышинового TLR3, не специфичные по отношению к TLR3, используются в качестве изотипического контроля) добавляли в концентрации 0,25 мкг/10<sup>6</sup> 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, Бедфорд, Массачусетс) 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 poly(I:C) системную цитокин/хемокиновую модель. В этой модели poly(I:C) (PIC), введенный внутрибрюшинно, индуцировал системные цитокиновый и хемокиновый ответы, которые были частично опосредованы TLR3.

Самки мыши C57BL/6 (8-10 недельные) или самки мыши TLR3KO (C57BL/6 фон; 8-10 недельные, Ace Animals, Inc.) получали подкожно: mAb 5429 в концентрации 10, 20 или 50 мг/кг в 0,5 мл ФБР, mAb c1811 - в концентрации 2, 10 или 20 мг/кг в 0,5 мл ФБР или 0,5 мл ФБР (контроль с помощью среды). Через 24 ч после введения дозы антител мышам вводили внутрибрюшинно по 50 мкг poly(I:C) (Amersham кат. № 26-4732 партия № H0156) в 0,1 мл ФБР. Кровь из глазной орбиты собирали через 1 и 4 ч после инъекции poly(I:C). Сыворотку получали из цельной крови и определяли в ней концентрации цитокина и хемокина с помощью Luminex.

Результаты.

Poly(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 poly(I:C) медиаторами были IL-6, KC, CCL2/MCP-1 и ФНО- $\alpha$  через 1 ч после инъекции poly(I:C) и IL-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES и ФНО- $\alpha$  через 4 ч после инъекции poly(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/группа  $\pm$ SEM. Полученные данные наводят на мысль, что антагонисты TLR3 могут быть полезными при снижении избыточных опосредованных TLR3 уровней цитокинов и хемокинов при таких состояниях, как цитокиновый шторм или смертельный шок.

Таблица 9А

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

\* p<0,001: однофакторный ANOVA для C57BL/6 ФБР

\*\* p<0,001: однофакторный ANOVA для C57BL/6 PIC

Таблица 9В

C57BL/6						
PIC	+	+	+	+	+	+
mAb 5429 (мг/кг)	50	20	10	-	-	-
mAb c1811 (мг/кг)	-	-	-	20	10	2
1 ч. обработка PIC						
ФНО $\alpha$	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***
КС	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 PIC						
IL-1 $\alpha$	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**
ФНО $\alpha$	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 ANOVA сравнивали с группой C57BL/6+PIC						

Пример 10.

Антитела-антагонисты TLR3 снижают гиперчувствительность дыхательных путей.

Модель.

Гиперчувствительность дыхательных путей индуцировали poly(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) poly (I:C) в 50 мкл стерильного ФБР. Мыши получали poly(I:C) (или ФБР) трижды с 24-часовыми интервалами. Через 24 ч после последнего введения poly(I:C)(или ФБР) с помощью плетизмографии всего тела (системы ВУХСО) измеряли параметры функции легких и гиперчувствительность дыхательных путей к метахолину. 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 распыляемого 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 ВУХСО). После измерений легочной функции мышь подвергали эвтаназии и канюлировали легкие. Делали инъекцию 1 мл ФБР в легкие, вытягивали жидкость обратно и получали таким образом смыв с бронхов и легких (BAL). Ткани легких вынимали и замораживали. BAL центрифугировали (1200 об/мин, 10 мин), собирали бесклеточные супернатанты и хранили при -80°C до момента анализа. Осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл ФБР 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 poly(I:C) индуцировало опосредованное TLR3 ухудшение функции легких у мышей при одновременном повышении улучшенного показателя паузы (PenH) в ходе плетизмографии всего тела (Вухсо) в сравнении с исходным показателем, и повышение гиперчувствительности к распыляемому метахолину (индикатору гиперчувствительности дыхательных путей) (публ. РСТ № 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 poly(I:C) ухуд-



шении функции легких путем подкожного введения каждого из антител в дозе 50 мг/кг перед введением poly(I:C).

Опосредованное TLR3 ухудшение функции легких значительно уменьшалось при введении животным антител-антагонистов TLR3 перед введением poly(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, опосредованный 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 (BALF). Исследования повторяли по меньшей мере три раза с похожими результатами. Данные, приведенные на фиг. 11, 12 и 13, получены в одном репрезентативном исследовании. Каждый символ представляет собой один результат по одной мышши, 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 (COPD) и муковисцидоза.

Пример 11.

Антитела-антагонисты TLR3 защищают от воспалительных заболеваний пищеварительного тракта.

Модель.

В качестве модели воспалительного заболевания пищеварительного тракта использовали модель DSS колита.

Самок мышей C57BL/6 (<8-недельные) или самок мышей TLR3KO (C57BL/6 фон; <8-недельные весом от 16,5 до 18 г, Ace Animals, Inc.) кормили радиоактивной пищей, начиная с -1 дня. DSS (сульфат декстрана) (MP Biomedicals, Аврора, Огайо, кат. № 160110; 35-50 кДа; 18-20% серы, партия № 8247J) разбавляли в автоклавированной подкисленной питьевой воде до конечной концентрации 5%. Воду с DSS давали в течение 5 дней, после чего заменили ее на простую воду. Воду мышам на протяжении всего исследования давали без ограничений. Каждый день все бутылки с водой взвешивали для учета потребления воды. В 0,2 и 4 день мышам вводили внутривентриально 5 мг/кг (0,1 мг в 0,1 мл ФБР) mAb 5429, мышинных антител против ФНО- $\alpha$  или ФБР в качестве контроля. На протяжении всего исследования за мышами ежедневно наблюдали и взвешивали их с 0 по 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 DSS внутрь (публ. PCT № 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, стимулирующая эндогенными лигандами TLR3 кишечника может усиливать и закреплять воспаление в модели DSS колита.

Тяжесть заболевания была меньше у получивших DSS 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 DSS, при введении антител против TLR3 ( $p < 0,05$ ) в сравнении с животными дикого типа, не получившими антител. TLR3KO животные, получившие DSS, были защищены от индуцированных DSS заболеваний. Получившие DSS животные, которым вводили mAb против мышинового ФНО- $\alpha$ , демонстрировали отсутствие улучшения гистопатологических параметров при моделировании DSS. Следовательно, модель DSS может быть полезна при оценке изучаемых терапевтических средств, предназначенных для людей, не отвечающих на анти-ФНО- $\alpha$  терапию, а нейтрализующие антитела против TLR3 могут быть полезны пациентам с воспалительными заболеваниями пищеварительного тракта, которые не отвечают на анти-ФНО- $\alpha$  терапию.

#### Модель.

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

Для индукции хронического колита наивные Т-клетки (CD4+CD45RB<sup>высокие</sup> Т-клетки) инъецировали внутрибрюшинно в реципиентов SCID. Мышам вводили либо ФБР (500 мкл/мышь внутрибрюшинно; контроль со средой), mAb 5429 (0,1 мг/мышь внутрибрюшинно), либо антитела против ФНО- $\alpha$  (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 вырезали у них 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, перенесших перенос Т-клеток, при лечении антителами против TLR3 тяжесть заболевания уменьшалась, о чем говорит значительное снижение у них величины сводной гистопатологической оценки в сравнении с контрольными животными ( $p < 0,05$ ) (фиг. 15А). Для получения сводной оценки оценивали абсцессы крипт, язвы, нейтрофильный инфлюкс, потерю бокаловидных клеток, количество ненормальных крипт, воспаление lamina propria и трансмуральное вовлечение. Наблюдалось значительное уменьшение абсцессов крипт, числа язвенных очагов и нейтрофильных инфлюксов (для всех  $p < 0,05$ ) (фиг. 15В). Антитела против ФНО- $\alpha$  в дозах, достоверно обеспечивающих оптимальное улучшение, использовали как положительный контроль.

Исследования с помощью хорошо изученных моделей воспалительных заболеваний пищеварительного тракта (DSS 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 быть полезны при лечении воспалительных заболеваний пищеварительного тракта, в том числе в случае устойчивости против ФНО- $\alpha$ , и в других случаях опосредованных иммунными механизмами патологий пищеварительного тракта.

#### Пример 12

Антитела-антагонисты TLR3 защищают от коллаген-индуцированного артрита.

#### Модель.

Коллаген-индуцированный артрит (CIA) 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). Животных в группах артрита подвергали анестезии изофлураном и делали им инъекции коллагена II типа (Elastin Products) и полного адьюванта Фрейнда с *M. tuberculosis* (Difco) на 0 и 15 дни. На 12 день мышей с развивающимся из-за коллагена II типа артритом рандомизировали в зависимости от веса тела на группы терапии и вводили им подкожно (SC) на 12, 17 и 22 (d12, d17, 2d2) дни mAb 5429 (25 мг/кг), в качестве отрицательного контроля - антитело CVAM (рекомбинантное mAb, неспецифичное в отношении мышей) (5 мг/кг) или антитела против ФНО- $\alpha$  (5 мг/кг, положительный контроль). Кроме того, контрольную группу мышей обрабатывали средой (ФБР) или дексаметазоном (0,5 мг/кг, Dex, эталонным компонентом) подкожно (SC) ежедневно (QD) на 12-25 дни. Животных оценивали ежедневно с 12 по 26 дни. Передние и задние лапы оценивали по клинической шкале (показана 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 для кистей передних и задних конечностей:

0 - норма;

1 - затронуты суставы задних или передних кистей, или минимальные диффузная эритема и припухлость;

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

3 - затронуты суставы задних или передних кистей, или умеренные диффузная эритема и припухлость;

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

5 - тяжелая диффузная эритема и тяжелая опухоль всей кисти, неспособность сгибать пальцы.

Способы гистопатологической оценки суставов мышей при артрите, спровоцированным коллагеном II типа.

При оценке кистей 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 кисти или голеностопных (лучезапястных) суставов без поражения метакарпальных/метатарзальных/пальцевых или тарзальных/тибиотарзальных суставов, произвольно оценивали максимальную тяжесть по 1, 2 или 3 параметрам из перечисленных ниже в зависимости от тяжести изменений. Если поражены более 2 суставов, критерии, перечисленные ниже, применяются к наиболее тяжело пораженному/большинству суставов.

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

Оценка:

0 - норма;

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

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

3 - умеренная инфильтрация с умеренным отеком, в случае кистей, 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 весь кортекс дефекты, часто с искаженным профилем остальной кортикальной поверхности, с заметной потерей медуллярной кости, многочисленными остеокластами, поражено большинство суставов;

5 - тяжелые распространяющиеся на весь кортекс дефекты и разрушение архитектуры всех суста-

вов.

#### Результаты.

Дексаметазон (Dex) и антитела против мышинного ФНО- $\alpha$  использовали как положительный контроль, ФБР использовали как контроль среды, а CVAM использовали как отрицательный контроль антител. Все виды терапии начинались на 12 день исследования при развитии заболевания суставов. Заболеваемость у контрольных животных, обработанных средой, составила 100% на 22 день исследования. Группа, используемая в качестве отрицательного контроля, получавшая среду или CVAM антитела, имела наиболее высокие клинические показатели. Значительно ниже клинические показатели были в группах, получавших Dex ( $p < 0,05$  в d18-d26), 5 мг/кг антител против ФНО- $\alpha$  ( $p < 0,05$  в d18-26) или 25 мг/кг mAb 5429 ( $p < 0,05$  в d18-d23 и d25-d26) (фиг. 16). Клинические показатели артрита, выражаемые как площадь под кривой (AUC), были значительно ниже при введении 25 мг/кг mAb 5429 (снижение на 43%), 5 мг/кг антител против ФНО- $\alpha$  (52%) или Dex (69%) в сравнении с контролем при введении среды. 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 ФНО- $\alpha$ , значительно уменьшалось воспаление кистей (33%), повреждение хрящей (38%) и снижалась сводная оценка кистей (37%). Введение Dex значительно уменьшило все гистопатологические параметры кистей (73%-ное снижение сводных оценок).

Эти данные демонстрируют, что антитела-антагонисты TLR3 облегчают симптомы клинических и гистопатологических заболеваний в модели CIA, 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.

Моделирование заражения 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 ФБР. 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  $10^{5,55}$  CEID<sub>50</sub>). 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 (DIO) 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 нормальную 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. При введении mAb 5429 улучшилась переносимость глюкозы у животных WT DIO, но не у животных TLR3KO DIO. Значительно более низкие в сравнении с контролем (только ФБР) уровни глюкозы в крови наблюдались у животных, получавших mAb 5429, после введения глюкозы через 60, 90, 120 и 180 мин (фиг. 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 уровни инсулина натощак (фиг. 22). У животных TLR3KO DIO улучшений в уровне 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. Уровни НОМА-IR составляли 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, т.е. 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 *Haemophilus influenzae* (NTHi) штаммы 35, выделенные из организма пациентов с COPD с бактериальными осложнениями, были получены от д-ра T.F. Murphy (Медицинский центр Buffalo VA, Баффало, Нью-Йорк). Человеческий риновирус 16 получили из Американской коллекции типовых культур (ATCC) с  $\text{TCID}_{50} = 2,8 \times 10^7 / \text{мл}$ .

#### Анализ стимуляции NTHi.

Клетки NHBE (Lonza, Уокерсвилл, Мэриленд) сеяли на 96-луночные планшеты для культивирования тканей Microtest (BD Biosciences, Бедфорд, Массачусетс) в количестве  $1 \times 10^5 / \text{лунку}$ . 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 в концентрации  $\sim 2 \times 10^7 / \text{лунку}$  на 96-луночные планшеты, содержащие NHBE. Через 3 ч супернатанты отбрасывали 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 $\beta$ , 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, ФНО- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , 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  $1 \times 10^5$  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 Lumipex анализов 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, IgG4 человека (Sigma, Сент-Луис, Миссури), было выявлено отсутствие ингибирования стимуляции NTHi (фиг. 23А). mAb 15EVQ также ингибировали индуцированный риновирусом синтез CXCL10/IP-10 и CCL5/RANTES (фиг. 23В).

Пример 17.

Антитела-антагонисты TLR3 подавляют воспалительные реакции в астроцитах.

Способы.

Нормальные астроциты человека от 2 доноров (Lonza, Уолкерсвилл, Мэриленд) поместили на 24-луночную планшету в количестве 75000 клеток/лунку и позволили прикрепиться к подложке в течение ночи. На следующий день к астроцитам добавили 200 нг/мл poly(I:C) и/или 10 мкг/мл mAb 18 на 24 ч. Концентрацию цитокинов измеряли с помощью Lumipex.

Результаты.

Индукцированный poly(I:C) синтез IL-6, IL-8, IL-12, IFN-D, 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± 36,8	539,7± 32,6	16,6± 0,5	28,8±1,5	12,3±0,3
mAb 18	1011,9± 57,4	1401,9± 49,7	17,1±0,5	31,6±0,7	10,4±0,2
Poly(I:C)	ol*	ol	30,3±1,5	47,1±3,1	35,9±1,0
Poly(I:C)+ mAb 18	2225,0± 108,1	6104,4± 259,9	16,8±0,9	30,5±1,6	11,7±0,6
Донор 2					
Без обработки	729,1±7,1	248,2±4,7	14±0,5	19,5±1,8	10,5±0,5
mAb 18	779,0±9,8	1132,6± 30,6	14,3±0,6	20,8±1,9	10,5±0,1
Poly(I:C)	ol	ol	25,5±0,4	36,3±1,9	30,8±0,9
Poly(I:C)+ mAb 18	3393,3± 107,5	8660,4± 354,3	16,2±0,3	24,7±1,2	12,6±0,3

Донор 1	CXCL9/MIG	CCL3/MIP-1a	CCL4	CCL5/RANTES	CXCL10/IP-10
Без обработки	12,6±0,7	21±0,9	14,8±0,7	bl"	bl
mAb 18	14,8±1,7	19,5±1,5	14,8±1,1	bl	bl
Poly(I:C)	78,3±4,8	1569,3±36,9	159,7±12,7	788,2±94,9	461,4±10,3
Poly(I:C)+ mAb 18	18,5±1,6	31,2±1,9	13,2±0,9	bl	6,9±0,5
Донор 2					
Без обработки	9,9±1,6	12,3±1,7	11,3±0,3	bl	bl
mAb 18	8,9±0,7	13,2±1,5	11,1±0,7	bl	bl
Poly(I:C)	62±3,8	1552,9±41,1	140,7±4,8	546,8±21,7	533,2±15
Poly(I:C)+ mAb 18	18,3±2,7	66,6±3,8	12,1±0,8	bl	29,1±6,2
*ol: выше предела обнаружения					
**bl: 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  $3 \times 10^5$  клеток/мл, и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. Poly(I:C) (GE Healthcare, Piscataway, NJ) добавляли в увеличивающихся концентрациях (1,5-100 мкг/мл) и инкубировали в течение еще 24 ч при 37°C. Для анализа ингибирования цитокинов mAb 15EVQ добавляли к клеткам в различных концентрациях (0-50 мкг/мл) и инкубировали в течение 30 мин, после чего добавляли 20 мкг/мл poly(I:C) на 24 ч. Собирали клеточные супернатанты, измеряли в них уровни цитокинов с помощью набора цитокинов человека 30-plex и технологии Luminex MAP (Invitrogen Corp., Карлсбад, Калифорния). Для определения уровня экспрессии sICAM-1 к клеткам HUVEC добавляли 20 мкг/мл poly(I:C) и различные концентрации mAb 15EVQ (0,8-50 мкг/мл). Уровни экспрессии sICAM-1 в клеточных супернатантах определяли с помощью ELISA (R&D systems). Жизнеспособность клеток измеряли с помощью набора реагентов CellTiterGlo (Promega, Мэдисон, Висконсин).

Результаты.

Клетки HUVEC в ответ на poly(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, ФНО-α, IFN-α, IFN-γ, GM-CSF, CCL3/MIP-1α, CCL4/MIP-1β, CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, VEGF, G-CSF, FGF-basic и HGF (табл. 11). mAb 15EVQ в зависимости от дозы снижали уровни всех цитокинов, индуцированных poly(I:C) (табл. 12). Способность mAb 15EVQ снижать индуцированный poly(I:C) синтез ФНО-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 ФНО-α и IFN-γ при рекрутинге 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 рекрутинге 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).

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

poly(I:C) клетках эндотелия повышается экспрессия sICAM-1, которая снижается при добавлении mAb 15EVQ (фиг. 24A).

Таблица 11

Poly(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
без poly(I:C)	0,00	1286,6+300,8	1360,1+245,4

Poly(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
без poly(I:C)	0,0	0,0	0,0

Poly(I:C) мкг/мл	IFN $\alpha$	CXCL10/IP-10	CCL4/MIP-1 $\beta$ 3
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
без poly(I:C)	0,0	0,0	0,0

Poly(I:C) мкг/мл	RANTES	ФНО $\alpha$	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
без poly(I:C)	4,9+4,5	1,9+0,4	32,1+8,8

концентрация в пг/мл

Таблица 12

mAb 15 (мкг/мл)	50,00	10,00	2,00	0,40	0,08	0,016	0,003	0
PIC	+	+	+	+	+	+	+	-
IL-6	177,8 $\pm$ 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 $\pm$ 185,9	1765,9+971	6460,3+ 3684,4	57349,5+ 6293,4	72422,8+ 88279,2	470475+ 52393,1	76066,5+ 11354,1	964780+ 122298,4
CCL2/MCP-1	11877 $\pm$ 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 $\pm$ 35,3*	0,0+0,0*	312,3+1376*	521,5+5,5	664,7+9,8	661,2+14,8	698,4+57,6	654,2+14,8
IL-15	0,0 $\pm$ 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 $\pm$ 1,8*	11,8+16,8	11,8+16,8	279+6,0	474+10,4	54,3+20,2	40,0+0,0	51,2+5,1
IFN $\alpha$	0,9 $\pm$ 1,3*	0,9+1,3*	19,0+77*	36,1+0,0	44,9+1,7	41,2+3,5	473+1,7	40,0+1,8
CXCL10/IP-10	0,0 $\pm$ 0,0*	58,1+2,6*	633,0+ 471,6*	1441,4+971	3023,8+ 166,1	21075+372,6	2346,4+ 226,1	21574+282,7
CCL4/ MIP-1 $\beta$	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0+0,0*	2,9+4,1*	62,1+7,2*	176,6+21,3*	2275+19,9	2483+19,4	281,7+375
RANTES	3,0 $\pm$ 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
ФНО $\alpha$	1,9 $\pm$ 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 $\pm$ 8,7*	28,6+8,7*	883+52,1*	156,1+6,4*	479,6+14,1	544,6+8,3	533,5+70,2	6073+29,9
*Показывает значимые p-уровни (менее 0,05) в сравнении концентраций mAb15 только с poly(I:C)								
Средние значения (пг/мл)								

Это наводит на мысль о том, что антитела-антагонисты TLR3 могут ингибировать движение лейкоцитов и, следовательно, повреждение тканей, спровоцированное инфлюксом воспалительных клеток.

Для анализа жизнеспособности клетки HUVEC культивировали, сеяли на планшеты и стимулировали poly(I:C), как описывалось выше. mAb 15EVQ в зависимости от дозы восстанавливали индуцированное poly(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 KS (Livingood et al., Cell Immunol. 249:55-62, 2007). Антагонисты TLR3 могут быть полезны при снижении ан-

гиогенного риска, связанного с KS и другими опухолями, при профилактике потери жизнеспособности клетками, при сохранении целостности защитного эндотелиального барьера, который предотвращает транссудацию, 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), филовирусов (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 19.

Перекрестные реакции антител-антагонистов с TLR3 яванских макак и мышей.

Эффективность действия антагонистов на TLR3 яванских макак и мышей оценивали путем количественного определения гена-репортера ISRE, в соответствии с описанием в примере 2. кДНК TLR3 макаки (SEQ ID NO: 217) и мыши (SEQ ID NO: 161) амплифицировали из цельной крови, клонировали в векторе pCER4 (Clontech) и экспрессировали, как описано выше. У макак при анализах NF- $\kappa$ B и ISRE IC50 mAb 15EVQ составляли соответственно 4,18 и 1,74 мкг/мл, тогда как для TLR3 человека при NF- $\kappa$ B и ISRE IC50 составляли 0,44 и 0,65 мкг/мл соответственно. Контрольные изотипные антитела не влияли на TLR3 по результатам этих анализов.

## Список последовательностей

&lt;110&gt; SENTOCOR ORTHO BIOTECH INC.

&lt;120&gt; АНТАГОНИСТЫ ТОЛЛ-ПОДОВНОГО РЕЦЕПТОРА 3

&lt;130&gt; SEN5242PCT

&lt;140&gt; PCT/US09/62813

&lt;141&gt; 2009-10-30

&lt;150&gt; 61/109974

&lt;151&gt; 2008-10-31

&lt;150&gt; 61/161860

&lt;151&gt; 2009-03-20

&lt;150&gt; 61/165100

&lt;151&gt; 2009-03-31

&lt;150&gt; 61/173686

&lt;151&gt; 2009-04-29

&lt;160&gt; 220

&lt;170&gt; FastSEQ для Windows версии 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2712

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

```

atgagacaga ctttgccctg tatctacttt tggggggggcc ttttgccctt tgggatgctg 60
tgtgcatcct ccaccacca gtgcactggt agccatgaag ttgctgactg cagccacctg 120
aagttgactc aggtaccocga tgatctacc cacaacataa cagtgttgaa ccttaccat 180
aatcaactca gaagattacc agccgccaac ttcacaaggt atagccagct aactagcttg 240
gatgtaggat ttaacaccat ctcaaaactg gagccagaat tgtgccagaa acttcccatg 300
ttaaaagtgt tgaacctcca gcacaatgag ctatctcaac tttctgataa aacctttgcc 360
ttctgcacga atttgactga actccatctc atgtccaact caatccagaa aattaaaaat 420
aatccctttg tcaagcagaa gaatttaatc acattagatc tgtctcataa tggcttgtea 480
tctacaaaat taggaactca ggttcagctg gaaaatctcc aagagcttct attatcaaac 540
aataaaatc aagcgctaaa aagtgaagaa ctggatatct ttgccaatc atcttataaa 600
aaattagagt tgtcatcgaa tcaaatataa gagttttctc caggggtgtt tcacgcaatt 660
ggaagattat ttggcctctt tctgaacaat gtccagctgg gtcccagcct tacagagaag 720
ctatgtttgg aattagcaaa cacaagcatt cggaatctgt ctctgagtaa cagccagctg 780
tccaccacca gcaatacaac tttcttggga ctaaagtgga caaatctcac tatgctcgat 840
ctttcctaca acaacttaaa tgtggttggt aacgattcct ttgcttggct tccacaacta 900
gaatatttct tcctagagta taataatata cagcatttgt tttctcactc tttgcacggg 960
cttttcaatg tgaggtacct gaatttgaaa cggcttttta ctaaacaag tatttccctt 1020
gctcactcc ccaagattga tgatttttct tttcagtggc taaaatgttt ggagcacctt 1080
aacatggaag ataatgatat tccaggcata aaaagcaata tgttcacagg attgataaac 1140
ctgaaatact taagtctatc caactccttt acaagtttgc gaactttgac aaatgaaaca 1200
tttgatcac ttgctcattc tcccttacac aactcaacc taaccaagaa taaaatctca 1260
aaaatagaga gtgatgcttt ctcttggttg gccacctag aagtacttga cctgggcctt 1320
aatgaaattg ggcaagaact cacaggccag gaatggagag gtctagaaaa tattttcgaa 1380
atctatcttt cctacaacaa gtacctgcag ctgactagga actcctttgc cttggtccca 1440
agccttcaac gactgatgct ccgaagggtg gcccttaaaa atgtggatag ctctccttca 1500
ccattccagc ctcttcgtaa cttgaccatt ctggatctaa gcaacaacaa catagccaac 1560
ataaatgatg acatgttggg gggctctgag aaactagaaa tctctgattt gcagcataac 1620
aaccttagcac ggtcttgga acacgcaaac cctgggtggtc ccatttattt cctaaagggg 1680
ctgtctcacc tccacatcct taacttgag tccaacggct ttgacgagat cccagttgag 1740
gtcttcaagg atttatttga actaaagatc atcgatttag gattgaataa tttaaacaca 1800

```

```

cttcagcat ctgtctttaa taatcaggtg tctctaaagt cattgaacct tcagaagaat 1860
ctcataacat ccgttgagaa gaaggttttc gggccagctt tcaggaacct gactgagtta 1920
gatatgctt ttaatccctt tgattgcacg tgtgaaagta ttgcctggtt tgtaattgg 1980
attaacgaga cccataccaa catccctgag ctgtcaagcc actaccttg caacactcca 2040
cctcactatc atgggttccc agtgagactt tttgatacat catcttgcaa agacagtgcc 2100
ccctttgaac tcttttccat gatcaatacc agtactctgt tgatttttat ctttattgta 2160
cttctcatcc accttgaggg ctggaggata tctttttatt ggaatgtttc agtacatcga 2220
gttcttggtt tcaaagaaat agacagacag acagaacagt ttgaatatgc agcatatata 2280
attcatgcct ataaagataa ggattgggtc tggaacatt tctcttcaat ggaaaaggaa 2340
gaccaatctc tcaaattttg tctggaagaa agggactttg aggcgggtgt ttttgaacta 2400
gaagcaattg ttaacagcat caaagaagc agaaaaatta tttttgttat aacacaccat 2460
ctattaaag acccattatg caaaagattc aaggtaacatc atgcagtcca acaagctatt 2520
gaacaaaatc tggattccat tatattggtt ttccttgagg agattccaga ttataaactg 2580
aaccatgcac tctgtttgcg aagaggaatg tttaaatctc actgcatctt gaactggcca 2640
gttcagaaag aacggatagg tgcctttcgt cataaattgc aagtagcact tggatccaaa 2700
aactctgtac at 2712

```

<210> 2

<211> 904

<212> БЕЛОК

<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         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	Leu
	690					695					700				
Phe	Phe	Met	Ile	Asn	Thr	Ser	Ile	Leu	Leu	Ile	Phe	Ile	Phe	Ile	Val
	705				710					715					720
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



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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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			
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	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
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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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 Thr Lys Leu Thr Val Leu
      100              105

```

<210> 8  
 <211> 122  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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 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 Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 10  
 <211> 122  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <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 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 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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

## 022832

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 14  
 <211> 119  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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	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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК

<213> Искусственная 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 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> БЕЛОК

<213> Искусственная 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> БЕЛОК

<213> Искусственная 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 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 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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 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  
 85 90 95  
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105



<210> 26  
 <211> 122  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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 Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 28  
 <211> 122  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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  
 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 11 VL

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кандидат 11 VH

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кандидат 12 VL

&lt;400&gt; 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  
 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



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кандидат 13 VH

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кандидат 14 VL

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кандидат 14 VH

&lt;400&gt; 40

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> 41  
 <211> 107  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 15 VL

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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 15 VH

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> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 1 LCDR1

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

<210> 44  
<211> 3  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 1 LCDR2

<400> 44  
Asp Ala Ser  
1

<210> 45  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 1 LCDR3

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

<210> 46  
<211> 8  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 1 HCDR1

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

<210> 47  
<211> 8  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 1 HCDR2

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



<210> 48  
 <211> 12  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 2 LCDR1

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

<210> 50  
 <211> 3  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 2 LCDR2

<400> 50  
 Gly Ala Ser  
 1

<210> 51  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 2 LCDR3

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

<210> 52  
 <211> 8  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 2 HCDR1

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

<210> 53  
<211> 8  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 2 HCDR2

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

<210> 54  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 2 HCDR3

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

<210> 55  
<211> 6  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

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

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

<210> 56  
<211> 3  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 56  
Asp Asp Asp  
1

<210> 57  
<211> 10  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидаты 3,4 LCDR3

<400> 57  
Ala Ser Tyr Asp Gly Asp Glu Phe Thr Val  
1 5 10

<210> 58  
<211> 10  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 3 HCDR1

<400> 58  
Gly Asp Ser Val Ser Thr Arg Ser Ala Ala  
1 5 10

<210> 59  
<211> 10  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 3 HCDR2

<400> 59  
Ile His Arg Arg Ser Lys Tyr Trp Asn Asp  
1 5 10

<210> 60  
<211> 12  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидаты 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> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидаты 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> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 4 HCDR2

<400> 62  
Ile Ser Tyr Arg Ser Arg Trp Tyr Asn Asp  
1 5 10

<210> 63  
<211> 10  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 5 LCDR3

<400> 63  
Gln Ser Tyr Asp Glu Asp Ser Ala Thr Val  
1 5 10

<210> 64  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидаты 5,6,7 HCDR2

<400> 64  
Ile Tyr Met Arg Ser Lys Trp Tyr Asn  
1 5

<210> 65  
<211> 10  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 6 LCDR3

<400> 65  
Gly Ser Tyr Asp Ser Asn Ser Leu Thr Val  
1 5 10

<210> 66  
<211> 10  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 7 LCDR3

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

<210> 67  
<211> 6  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

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

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

<210> 68  
<211> 3  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

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

<400> 68  
Glu Asp Ser  
1

<210> 69  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 8,9 LCDR3

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

<210> 70  
<211> 10  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 8 HCDR2

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

<210> 72  
 <211> 12  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 9 HCDR2

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

<210> 74  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 10 LCDR3

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

<210> 75  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 10 HCDR2

<400> 75

Ile Gln Lys Arg Ser Lys Tyr Trp Asn  
1 5

<210> 76  
<211> 10  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 11 LCDR3

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

<210> 77  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 11,12 HCDR2

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

<210> 78  
<211> 10  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кандидат 12 LCDR3

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

<210> 79  
<211> 6  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

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

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

<210> 80  
<211> 3  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кандидат 13, 14, 15 Lcdr2

<400> 80

Ala Ala Ser

1

<210> 81

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кандидат 13 Lcdr3

<400> 81

Gln Gln Gly Glu Ser Ile Leu Ser Thr

1

5

<210> 82

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кандидат 13, 14, 15 Hcdr1

<400> 82

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp

1

5

<210> 83

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кандидат 13 Hcdr2

<400> 83

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr

1

5

<210> 84

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кандидаты 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 14 LCDR3

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

<210> 86  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 14, 15 HCDR2

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

<210> 87  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 15 LCDR3

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

<210> 88  
 <211> 8  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 16 HCDR3

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

<210> 89  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кандидат 10 LCDR3

&lt;400&gt; 89

Gln Gln Tyr Gly Ser Val Ser Ile Thr  
 1 5

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 443

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Вся длина тяжелой цепи кандидата 16

&lt;400&gt; 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 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 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 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> 91  
 <211> 449  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся длина тяжелой цепи кандидата 17

<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 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 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



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 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> 93

<211> 448

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вся длина тяжелой цепи кандидата 19

<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 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся длина тяжелой цепи кандидата 1

<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  
 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 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся длина тяжелой цепи кандидата 2

<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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся длина тяжелой цепи кандидата 3

<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  
 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  
 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  
 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся длина тяжелой цепи кандидата 4

<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  
 145 150 155 160  
 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> 98  
 <211> 449  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся длина тяжелой цепи кандидатов 5,6,7

<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 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 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 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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Вся длина тяжелой цепи кандидата 8

&lt;400&gt; 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 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  
 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 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся длина тяжелой цепи кандидата 9

<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 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  
 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> 101  
 <211> 449  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся длина тяжелой цепи кандидатов 10, 11, 12

<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 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  
 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> 102  
 <211> 448  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся длина тяжелой цепи кандидатов 13,14,15,15-7,15-8

<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 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

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

<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> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Все тяжелые цепи IgG4 кандидата 15EVQ  
 с лидерной последовательностью

<400> 104  
 atggcttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtat ccaagcagag 60  
 gtgcagctgg tgcagagcgg cgcogaggtg aagaagcccc gcgagagcct gaagatcagc 120  
 tgcaagggca gcggctacag cttcaccac tactgggtgg gctgggtgcg ccagatgccc 180  
 ggcaagggcc tggagtggat gggcttcac gaccccagcg acagctacac caactacgcg 240  
 cctagcttcc agggccaggt gaccatcagc gccgacaaga gcatcagcac cgcctacctg 300  
 cagtggagca gcctgaaggc cagcgacacc gccatgtact actgcgcccg cgagctgtac 360  
 cagggtaca tggacacggt cgacagctgg ggcagggca ccctggtgac cgtgagcagc 420  
 gcttccacca agggccatc cgtcttccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 480  
 agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 540  
 tggaaactcag gcgcctcagc cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 600  
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgcctcca gcagcttggg cacgaaaacc 660  
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 720  
 aaatatggtc ccccatgccc accatgcca gcacctgagg ccgcccgggg accatcagtc 780  
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgagggtcag 840  
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 900  
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcccggagg agcagttcaa cagcacgtac 960  
 cgtgtggtca gcgtctcac cgtctctcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 1020  
 tgcaaggtct ccaacaaggg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080  
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 1140  
 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgcctggag 1200  
 tggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260  
 gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1320



aatgttctct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1380  
ctctccctgt ctctgggtaa a 1401

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

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

<400> 105  
gaggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgagag cctgaagatc 60  
agctgcaagg gcagcggcta cagcttcacc aactactggg tgggctgggt gcgccagatg 120  
cccggcaagg gcctggagtg gatgggcttc atcgacccca gcgacagcta caccaactac 180  
gcgcttagct tccagggcca ggtgaccatc agcgccgaca agagcatcag caccgcctac 240  
ctgcagtgga gcagcctgaa ggccagcgc accgccatgt actactgcgc ccgcgagctg 300  
taccagggct acatggacac gttcgacagc tggggccagg gcaccctggt gaccgtgagc 360  
agcgttcca ccaagggccc atccgtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 420  
gagagcacag ccgccttggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480  
tcgtggaact caggcgcct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540  
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaaa 600  
acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggaaa gagagttgag 660  
tccaaatagt gtcccccatg cccaccatgc ccagcactg aggccgccgg gggaccatca 720  
gtcttctctg tcccccaaaa acccaaggac actctcatga tctcccggac ccttgaggtc 780  
acgtgcgtgg tgggtgacgt gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 840  
gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagcccgagg aggagcagtt caacagcacg 900  
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960  
aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccc tctccatcg agaaaacct ctccaaagcc 1020  
aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 1080  
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaagccttct accccagcga catcgccgtg 1140  
gagtgaggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200  
tccgacggct ccttcttct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1260  
gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacacagaag 1320  
agcctctccc tgtctctggg taaa 1344

<210> 106  
<211> 20  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная 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 Leu Trp Leu Thr  
1 5 10 15  
Asp Ala Arg Cys  
20

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

<220>  
<223> Все легкие цепи кандидата 15 с  
лидерной последовательностью

<400> 107  
 atgggtgtgc caactcaggt attaggatta ctgctgctgt ggcttacaga tgcaagatgt 60  
 gacatccaga tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc 120  
 atcacctgcc gcgccagcca gagcatcggc ctgtacctgg cctggtagca gcagaagccc 180  
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcaagagcg cgtgcccagc 240  
 cgcttcagcg gcaagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 300  
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggcaacaccc tgagctaac cttcggccag 360  
 ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gctgcacccat ctgtcttcat cttcccagca 420  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600  
 ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 702

<210> 108

<211> 642

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Легкая цепь кандидата 15 без лидерной последовательности (начинает DIQ)

<400> 108  
 gacatccaga tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc 60  
 atcacctgcc gcgccagcca gagcatcggc ctgtacctgg cctggtagca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcaagagcg cgtgcccagc 180  
 cgcttcagcg gcaagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240  
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggcaacaccc tgagctaac cttcggccag 300  
 ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gctgcacccat ctgtcttcat cttcccagca 360  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540  
 ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 109

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Композитная 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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кандидаты LCDR2 15, 15-1 □ 15-9

<400> 110

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
 1 5

<210> 111  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Композитная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Композитная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Композитная 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидаты HCDR2 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кандидаты HCDR1 15-2

&lt;400&gt; 115

Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Asn	Tyr	Trp	Ile	Gly
1				5					10

&lt;210&gt; 116

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кандидаты HCDR1 15-3, 15-5, 15-6, 15-9

&lt;400&gt; 116

Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Asn	Tyr	Trp	Ile	Ser
1				5					10

&lt;210&gt; 117

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кандидаты HCDR2 15-4

&lt;400&gt; 117

Phe	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

&lt;210&gt; 118

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кандидаты HCDR2 15-5, 15-9

&lt;400&gt; 118

Arg	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

&lt;210&gt; 119

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кандидаты HCDR3 15-6, 15-9

&lt;400&gt; 119

Ala	Arg	Gln	Leu	Tyr	Gln	Gly	Tyr	Met	Asp	Thr	Phe	Asp	Ser
1				5					10				

<210> 120  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидаты LCDR1 15-7

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

<210> 121  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидаты LCDR1 15-8

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

<210> 122  
 <211> 107  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидаты 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидаты 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидаты 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 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  
                           100                          105                          110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                           115                          120

<210> 126  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кандидат 15-5 VH

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 129

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кандидат 15-6 VH

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 130

&lt;211&gt; 448

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Вся тяжелая цепь кандидата 15-1

&lt;400&gt; 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 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> 131  
 <211> 448  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся тяжелая цепь кандидата 15-2

<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  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440 445

<210> 132  
 <211> 448  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>

&lt;223&gt; Вся тяжелая цепь кандидата 15-3

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 133

&lt;211&gt; 448

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Вся тяжелая цепь кандидата 15-4

&lt;400&gt; 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

<210> 134  
 <211> 448  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся тяжелая цепь кандидата 15-5

<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
						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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся тяжелая цепь кандидата 15-6

<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> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер

<400> 136  
 ccttaccscat aatcaactcg agagattacc agccgccaac 40

<210> 137  
 <211> 49  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер

<400> 137  
 saagagcttc tattatcaaa caatgagatt caagcgctaa aaagtgaag 49

<210> 138  
 <211> 45  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер

<400> 138  
 ccttacacat actcaacctt accgagaata aaatctcaaa aatag 45

<210> 139  
 <211> 47  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер

<400> 139  
 gaaatctatc tttcctacaа cgaggccctg cagctgacta ggaactc 47

<210> 140  
 <211> 58  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер

<400> 140  
 gccttcaacg actgatgctc gaggagggtg cccttgagaa tgtggatagc tctccttc 58

<210> 141  
 <211> 39  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер

<400> 141  
 gtacctgcag ctgtctacga gtcctttgc cttggtccc 39

<210> 142  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер

<400> 142  
 gcctggagtg gatgggccc atcgacccca gcg 33

<210> 143  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер

<400> 143  
 cgtggggtc gatccggccc atccactcca gcc 33

<210> 144  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер

<400> 144  
 agaggtaac cccgttgccg 20

<210> 145  
 <211> 38  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер

<400> 145  
 gcactgccc caccagccc atccagtagt tgggtgaag 38

<210> 146  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер



<400> 146  
 agaggtaact cccgttgccg 20

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

<220>  
 <223> Праймер

<400> 147  
 gcatctggcg caccagctg atccagtagt tggatgaag 38

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

<220>  
 <223> Праймер

<400> 148  
 cgctgatggt cacgtggccc tggaagctag gctgtagtt ggtgtag 47

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

<220>  
 <223> Праймер

<400> 149  
 cttcассаас tactggatca gctgggtgcg cсagatgc 38

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

<220>  
 <223> Праймер

<400> 150  
 cggcatgtac tactgcgccc gccagctgta cсagggctac 40

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

<220>  
 <223> Праймер

<400> 151  
 gtagccctgg tacagctggc gggcgсagta gtacatggcg 40

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

<400> 152

gscagccaga gcatcagcag ctacctggcc tggtagccagc 40

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

<220>  
 <223> Праймер

<400> 153  
 gctggtagca ggcaggtag ctgctgatgc tctggctggc 40

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

<220>  
 <223> Праймер

<400> 154  
 cgggcttctg ctggtaccag ttcaggtagc tgctgatgct ctg 43

<210> 155  
 <211> 214  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся длина легкой цепи кандидата 14

<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 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 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> 156  
 <211> 214  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся длина легкой цепи кандидатов 15, 15-1, 15-2, 15-3, 15-4, 15-5,  
 15-6, 15-9

<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 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 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся длина легкой цепи кандидата 15-7

<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 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся длина легкой цепи кандидата 15-8

```

<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 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Кандидат 15-9 VH

&lt;400&gt; 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 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

&lt;210&gt; 160

&lt;211&gt; 448

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Вся тяжелая цепь кандидата 15-9

&lt;400&gt; 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 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

```

atgaaagggt gttcctctta tctaattgtac tcctttgggg gacttttgtc cctatggatt 60
cttctgggtgt cttccacaaa ccaatgcact gtgagataca acgtagctga ctgcagccat 120
ttgaagctaa cacacatacc tgatgatctt coctctaaca taacagtgtt gaatcttact 180
cacaaccaac tcagaagatt accacctacc aactttacaa gatacagcca acttgctatc 240
ttggatgcag gatttaactc catttcaaaa ctggagccag aactgtgcca aatactcct 300
ttgtgaaag tattgaacct gcaacataat gagctctctc agatttctga tcaaaccttt 360
gtctcttgca cgaacctgac agaactcgat ctaatgtcta actcaatata caaaattaaa 420
agcaaccctt tcaaaaacca gaagaatcta atcaaattag atttgtctca taatggttta 480
tcattctaaa agttgggaac ggggggtcaa ctggagaacc tccaagaact gctcttagca 540
aaaaataaaa tccttgcggt gcgaagtga gaacttgagt ttottggcaa ttctcttta 600
cgaaagtgg acttgcctc aaatccactt aaagagttct ccccggggtg tttccagaca 660
attggcaagt tattgcacct cctcttgaac aacgcccac tgaaccccca cctcacagag 720
aagctttgct gggaaacttc aaacacaagc atccagaatc tctctctggc taacaaccag 780
ctgctggcca ccagcgagag cactttctct gggtgaagt ggacaaatct caccagctc 840
gatctttcct acaacaacct ccatgatgtc ggcaacggtt ccttctccta tctccaagc 900
ctgaggatc tgtctctgga gtacaacaat atacagcgtc tgtcccctcg ctctttttat 960
ggactctcca acctgaggta cctgagtttg aagcgagcat ttactaagca aagtgtttca 1020
cttgcttcac atcccaacat tgacgatctt tcctttcaat ggttaaaata tttggaatat 1080
ctcaacatgg atgacaataa tattccaagt accaaaagca ataccttcac gggattgggtg 1140
agtctgaagt acctaaagt ttcocaaact ttcacaagtt tgcaaacctt aacaaatgaa 1200
acatttgtgt cacttgctca ttctcccttg ctactctca acttaacgaa aaatcacatc 1260
tcaaaaatag caaatggtag ttctctctgg ttaggccaac tcaggatact tgatctcggc 1320
cttaatgaaa ttgaacaaaa actcagcggc caggaatgga gaggtctgag aaatatat 1380
gagatctacc tatcctataa caaatacctc caactgtcta ccagttcctt tgcattgggtc 1440
cccagccttc aaagactgat gctcaggagg gtggccctta aaaatgtgga tatctcccct 1500
tcacctttcc gccctcttgc taacttgacc attctggact taagcaaca caacatagcc 1560
aacataaatg aggacttgct ggagggtctt gagaatctag aaatcctgga ttttcagcac 1620
aataacttag ccaggctctg gaaacgcgca aaccccggtg gtcccgttaa tttcctgaag 1680
gggctgtctc acctccacat cttgaattta gactccaacg gcttagatga aatcccagtc 1740
ggggttttca agaacttatt cgaactaaag agcatcaatc taggactgaa taacttaaac 1800
aaacttgaac cattcatttt tgatgaccag acatctctaa ggtcactgaa cctccagaag 1860
aacctcaata catctggtga gaaggatggt ttcgggccgc cttttcaaaa cctgaacagt 1920
ttagatatgc gcttcaatcc gttcagactgc acgtgtgaaa gtatttctct gtttgttaac 1980
tggatcaacc agaccacac taatatctct gagctgtcca ctactacct ctgtaacact 2040

```

```

ccacatcatt attatggett cccoctgaag cttttcgata catcatcctg taaagacagc 2100
gccccctttg aactcctctt cataatcagc accagtatgc tcttggtttt tatacttgtg 2160
gtactgtctca ttcacatcga gggotggagg atctcttttt actggaatgt ttcagtgcac 2220
cggattcttg gtttcaagga aatagacaca caggctgagc agtttgaata tacagcctac 2280
ataattcatg ccataaaga cagagactgg gtctgggaac atttctcccc aatggaagaa 2340
caagaccaat ctctcaaatt ttgctagaa gaaagggact ttgaagcagg cgctccttga 2400
cttgaagcaa ttgttaatag catcaaaaaga agccgaaaaa tcattttcgt taccacacac 2460
catttattaa aagaccctct gtgcagaaga ttcaaggtac atcacgcagt tcagcaagct 2520
attgagcaaa atctggattc aattatactg atttttctcc agaatattcc agattataaa 2580
ctaaacctatg cactctgttt gcgaagagga atgtttaaata ctcattgcat cttgaactgg 2640
ccagttcaga aagaacggat aatgccttt catcataaat tgcaagtagc acttggatct 2700
cggaattcag cacattaa 2718

```

<210> 162

<211> 905

<212> BEJOK

<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 Pro 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 Glu 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
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
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> БЕЛОК  
 <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> БЕЛОК  
 <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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Гибрид переменного участка крысы и константного участка мыши

<400> 165  
 Met Gly Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu 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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Гибрид переменного участка крысы и константного участка мыши

<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

```



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> BEJOK  
 <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  
 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				
			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> Искусственная последовательность

<220>

<223> Олигонуклеотид для мутагенеза TLR3

<400> 169

gaagaactgg atactctttgc cgcttcatct ttaaaaaaat tagagttg

48

<210> 170

<211> 44

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 170

gtcatctaca aaattaggaa ctgctgttca gctggaaaat ctcc

44

<210> 171

<211> 45

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 171

ctcataatgg cttgtcatct acagaattag gaactcaggt tcagc

45

<210> 172

<211> 57

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 172

gaaaattaаа аатаатссст ttgtcaagca ggagaattta atcacattag atctgtc

57

<210> 173

<211> 50

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 173  
 gaaaattaaa aataatccct ttgtcgagca gaagaattta atcacattag 50

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

<220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 174  
 saggaaatta aaaataatcc ctttgcaaag sagaagaatt taatcacatt ag 52

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

<220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 175  
 ccaactcaat ccaagaaatt aaagctaatc cttttgtcaa gcagaag 47

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

<220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 176  
 saatgagcta tctcaacttt ctcgtaaaac ctttgccttc tgcac 45

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

<220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 177  
 gtcttgagaa actagaaatt ctcaagttgc agcataaaca cttagcac 48

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

<220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3

<400> 178  
 cttgagaaac tagaaattct cgcattgcag cataaacaact tagcac 46

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

<220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3  
  
 <400> 179  
 ctaaaagtcac tgaacsttca ggagaatctc ataacatccg ttg 43  
  
 <210> 180  
 <211> 47  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3  
  
 <400> 180  
 ctctaagtc attgaacstt caggcgaatc tcataacatc cgttgag 47  
  
 <210> 181  
 <211> 37  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3  
  
 <400> 181  
 ccacatcctt aacttgaggt ccaacggctt tgacgag 37  
  
 <210> 182  
 <211> 46  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3  
  
 <400> 182  
 gaaattctcg atttgagca taacgcotta gcacggctct ggaaac 46  
  
 <210> 183  
 <211> 46  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3  
  
 <400> 183  
 gagaactag aaattctcga ttggcgcat acaacttag cacggc 46  
  
 <210> 184  
 <211> 44  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3  
  
 <400> 184  
 ctagaattc tcgatttgca ggaacaacaac ttagcacggc tctg 44  
  
 <210> 185  
 <211> 44  
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3  
 <400> 185  
 ctagaatc tcgatttgca ggctaacaac ttagcacggc tctg 44  
 <210> 186  
 <211> 46  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3  
 <400> 186  
 cattctggat ctaagcaaca acgscatagc caacataaat gatgac 46  
 <210> 187  
 <211> 50  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3  
 <400> 187  
 gaaaatattt tcgaaatcta tctttccgcc aacaagtacc tgcagctgac 50  
 <210> 188  
 <211> 41  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3  
 <400> 188  
 gccttcaacg actgatgctg aaaggggtggc ccttaaaaat g 41  
 <210> 189  
 <211> 43  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3  
 <400> 189  
 cttcaacgac tgatgctccg agaggtggcc cttaaaaatg tgg 43  
 <210> 190  
 <211> 42  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для мутагенеза варианта TLR3  
 <400> 190  
 cgaatctat ctttctaca acgagtaact gcagctgact ag 42  
 <210> 191



<211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

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

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)  
 <223> где Xaa может быть Ala, Gln, Gly или Ser

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5)  
 <223> где Xaa может быть Gly, Glu или Ser

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)  
 <223> где Xaa может быть Asp или Asn

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)  
 <223> где Xaa может быть Glu или Ser

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)  
 <223> где Xaa может быть Phe, Ala или Leu

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

<210> 192  
 <211> 18  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

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

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)  
 <223> где Xaa может быть Arg или Lys

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3)  
 <223> где Xaa может быть Tyr, His или Ser

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)  
 <223> где Xaa может быть Met, Arg или Tyr

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)  
 <223> где Xaa может быть Lys или Arg

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

<210> 193  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Консенсусная последовательность для семейства 18В LСDR3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)  
 <223> где Xaa может быть Gln или Ser

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5)  
 <223> где Xaa может быть Thr, Glu или Asp

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)  
 <223> где Xaa может быть Val или Asn

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)  
 <223> где Xaa может быть Tyr или Phe

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9)  
 <223> где Xaa может быть Ser, Asn или Gln

<400> 193  
 Xaa Ser Tyr Asp Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Val  
 1 5 10

<210> 194  
 <211> 18  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Консенсусная последовательность для семейства 18В HСDR3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)  
 <223> где Xaa может быть Lys, Thr или Ile

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)  
 <223> где Xaa может быть Asn или Asp



<223> Консенсусная последовательность для семейства 19 HCDR2

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)

<223> где Хаа может быть Phe или Arg

<220>

<221> misc\_feature

<222> (12)

<223> где Хаа может быть Ala или Ser

<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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность для семейства 17

<220>

<221> misc\_feature

<222> (88)

<223> где Хаа может быть Ala, Gln, Gly или Ser

<220>

<221> misc\_feature

<222> (92)

<223> где Хаа может быть Gly, Glu или Ser

<220>

<221> misc\_feature

<222> (93)

<223> где Хаа может быть Asp или Asn

<220>

<221> misc\_feature

<222> (94)

<223> где Хаа может быть Glu или Ser

<220>

<221> misc\_feature

<222> (95)

<223> где Хаа может быть Phe, Ala или Leu

<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 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

## 022832

```

      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 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
      100              105

```

<210> 198  
 <211> 122  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Консенсусная последовательность для семейства 17

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (52)  
 <223> где Xaa может быть Arg или Lys

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (54)  
 <223> где Xaa может быть Tyr, His или Ser

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (55)  
 <223> где Xaa может быть Met, Arg или Tyr

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (58)  
 <223> где Xaa может быть Lys или Arg

```

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

```

<210> 199  
 <211> 107  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Консенсусная переменная легкая цепь семейства 18B

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (88)
<223> где Хаа может быть Gln или Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (92)
<223> где Хаа может быть Thr, Glu или Asp

<220>
<221> misc_feature
<222> (94)
<223> где Хаа может быть Val или Asn

<220>
<221> misc_feature
<222> (95)
<223> где Хаа может быть Tyr или Phe

<220>
<221> misc_feature
<222> (96)
<223> где Хаа может быть Ser, Asn или Gln

<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 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
100      105

<210> 200
<211> 122
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Консенсусная переменная тяжелая цепь семейства 18A и 18B
<220>
<221> misc_feature
<222> (55)
<223> где Хаа может быть Lys, Thr или Ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (62)
<223> где Хаа может быть Asn или Asp

<220>
<221> misc_feature

```

<222> (65)

<223> где Хаа может быть Val или Leu

<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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная переменная легкая цепь семейства 19

<220>

<221> misc\_feature

<222> (91)

<223> где Хаа может быть Tyr, Gly или Ala

<220>

<221> misc\_feature

<222> (92)

<223> где Хаа может быть Gly, Glu или Asp

<220>

<221> misc\_feature

<222> (93)

<223> где Хаа может быть Ser или Thr

<220>

<221> misc\_feature

<222> (94)

<223> где Хаа может быть Val, Ile или Leu

<220>

<221> misc\_feature

<222> (95)

<223> где Хаа может быть Ser или Leu

<220>

<221> misc\_feature

<222> (96)

<223> где Хаа может быть Ile, Ser, Pro или Tyr

<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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Консенсусная переменная тяжелая цепь семейства 19

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (50)  
 <223> где Xaa может быть Phe или Arg

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (61)  
 <223> где Xaa может быть Ala или Ser

```

<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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся консенсусная тяжелая цепь, семейство 17

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (88)



<223> где Хаа может быть Ala, Gln, Gly или Ser

<220>

<221> misc\_feature

<222> (92)

<223> где Хаа может быть Gly, Glu или Ser

<220>

<221> misc\_feature

<222> (93)

<223> где Хаа может быть Asp или Asn

<220>

<221> misc\_feature

<222> (94)

<223> где Хаа может быть Glu или Ser

<220>

<221> misc\_feature

<222> (95)

<223> где Хаа может быть Phe, Ala или Leu

<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 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 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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вся консенсусная тяжелая цепь, семейство 17

<220>

<221> misc\_feature

<222> (52)  
 <223> где Xaa может быть Arg или Lys

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (54)  
 <223> где Xaa может быть Tyr, His или Ser

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (55)  
 <223> где Xaa может быть Met, Arg или Tyr

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (58)  
 <223> где Xaa может быть Lys или Arg

<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 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> 205

<211> 214

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вся консенсусная легкая цепь, семейство 18B

<220>

<221> misc\_feature

<222> (88)

<223> где Xaa может быть Gln или Ser

<220>

<221> misc\_feature

<222> (92)

<223> где Xaa может быть Thr, Glu или Asp

<220>

<221> misc\_feature

<222> (94)

<223> где Xaa может быть Val или Asn

<220>

<221> misc\_feature

<222> (95)

<223> где Xaa может быть Tyr или Phe

<220>

<221> misc\_feature

<222> (96)

<223> где Xaa может быть Ser, Asn или Gln

<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> БЕЛЮК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вся консенсусная тяжелая цепь, семейство 18A и 18B

<220>

<221> misc\_feature

<222> (55)

<223> где Xaa может быть Lys, Thr или Ile

<220>

<221> misc\_feature

<222> (62)

<223> где Xaa может быть Asn или Asp

<220>

<221> misc\_feature

<222> (65)

<223> где Xaa может быть Val или Leu

<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



<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (94)  
 <223> где Хаа может быть Val, Ile или Leu

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (95)  
 <223> где Хаа может быть Ser или Leu

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (96)  
 <223> где Хаа может быть Ile, Ser, Pro или Tyr

<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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вся консенсусная тяжелая цепь, семейство 19

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (50)  
 <223> где Хаа может быть Phe или Arg

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (61)  
 <223>

<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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант QSV вариабельной легкой цепи 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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант QSV вариабельной легкой цепи 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	Thr	Pro	Val	Tyr	Ser
				85					90					95	
Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu					
			100					105							

<210> 211

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант QSV вариабельной легкой цепи 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  
 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вариант QSQ варибельной тяжелой цепи 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вариант QVQ варибельной тяжелой цепи 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

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Вариант QVQ вариабельной тяжелой цепи кандидата 12

&lt;400&gt; 214

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

&lt;210&gt; 215

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Вариант EVQ кандидата 14

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 216

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Вариант EVQ кандидата 15

&lt;400&gt; 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



aaccatgcac tctgtttgcg aagaggaatg tttaaatctc actgcatctt gaactggcca 2640  
gttcagaaag aacggatagg tgcctttcat cataaactgc aagtagcact tggatccaaa 2700  
aactcagtac at 2712

<210> 218

<211> 449

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вся тяжелая цепь кандидата 9EVQ с S229P,  
F235A/L236A

<400> 218

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	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
						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	Gln	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



```

          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

```

&lt;210&gt; 220

&lt;211&gt; 448

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Вся тяжелая цепь S229P, F235A/L236A варианта EVQ mAb14 и mAb15

&lt;400&gt; 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
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
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

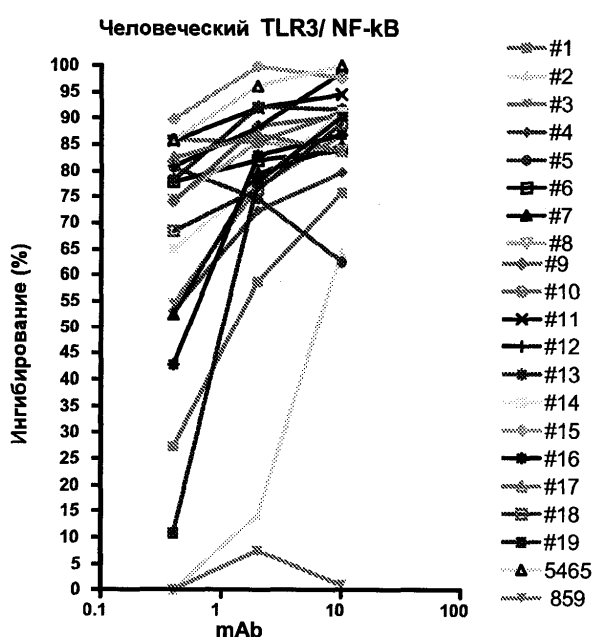
```

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

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Выделенное антитело или его фрагмент, способное взаимодействовать с TLR3, содержащее вариabельные участки тяжелой и легкой цепей, при этом антитело содержит:

- вариабельный участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 42; или
- вариабельный участок легкой цепи SEQ ID NO: 41; или
- вариабельный участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 42 и вариабельный участок легкой цепи SEQ ID NO: 41; или
- аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 82, 86 и 84; или
- аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи SEQ ID NO: 79, 80 и 87; или
- аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 82, 86 и 84 и аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи SEQ ID NO: 79, 80 и 87; или
- вариабельный участок тяжелой цепи, который по меньшей мере на 95% идентичен вариабельному участку с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 42; или
- вариабельный участок легкой цепи, который по меньшей мере на 95% идентичен вариабельному участку с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 41;
- тяжелую цепь SEQ ID NO: 102; или
- легкую цепь SEQ ID NO: 156; или
- тяжелую цепь SEQ ID NO: 102 и легкую цепь SEQ ID NO: 156.



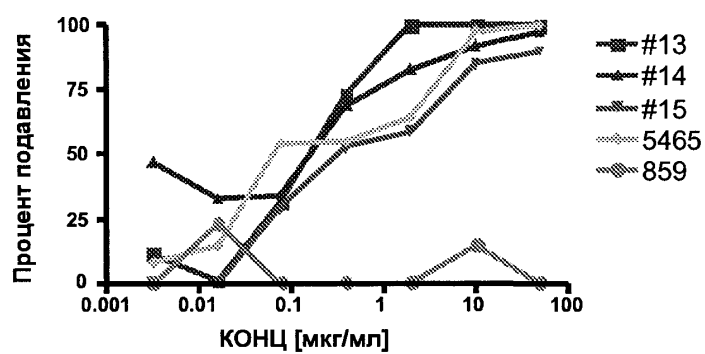
#	тАб (мкм)	ЛБ	IP-10	КАНТЕС	МСП-1	ЛБ
#1	10	36	66	11	23	34
	2	30	65	28	19	35
	0.4	10	34	9	14	20
#2	10	35	52	13	11	35
	2	41	76	22	26	33
	0.4	21	57	19	13	13
#3	10	47	65	23	37	44
	2	49	82	26	35	50
	0.4	26	25	8	19	32
#4	10	98	100	100	83	87
	2	46	81	31	29	50
	0.4	42	54	17	28	45
#5	10	69	87	47	55	63
	2	60	82	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	50	60	67
	2	67	85	42	50	63
	0.4	49	72	27	44	50
#8	10	61	78	29	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	60	60	65
	2	62	82	37	48	58
	0.4	53	73	30	48	51

Фиг. 2А

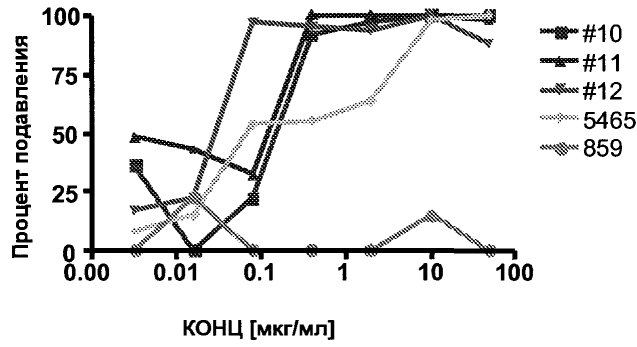


п/п	Ab (мкг/мл)	IL-6	IP-10	RANTES	MCP-1	IL-8
#11	10	83	96	74	71	55
	2	62	83	32	55	60
	0.4	61	77	29	46	54
#12	10	74	91	52	57	27
	2	69	88	39	53	53
	0.4	55	79	28	43	51
#13	10	87	97	81	72	80
	2	71	88	50	51	68
	0.4	66	80	24	49	60
#14	10	84	90	59	70	80
	2	72	85	40	57	66
	0.4	61	80	35	46	57
#15	10	84	93	65	70	79
	2	69	84	31	55	69
	0.4	59	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	39
	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	57	77	25	33	47
859	10	16	57	3	10	17
	2	29	55	10	10	10
	0.4	1	36	-4	2	-3

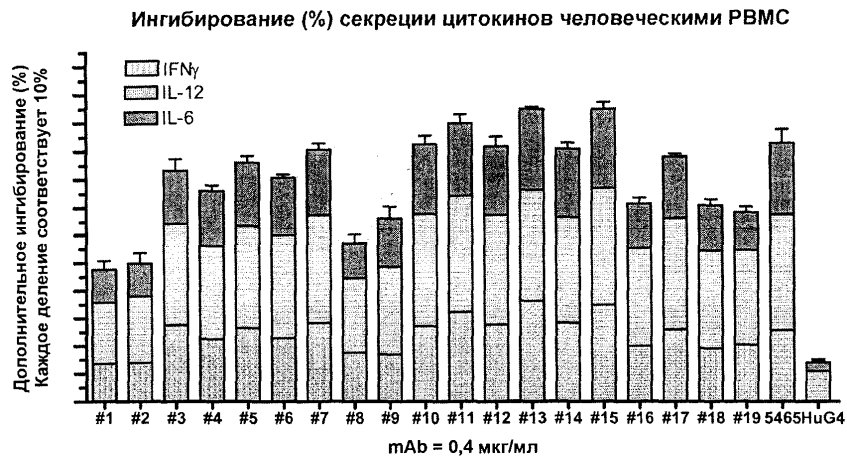
Фиг. 2В



Фиг. 3А

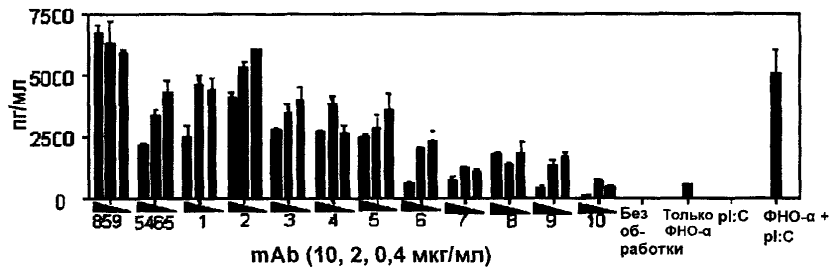


Фиг. 3В



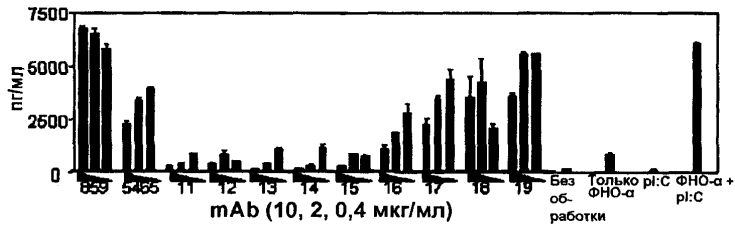
Фиг. 4

Концентрации CCL5/RANTES после стимуляции poly:I:C + ФНО- $\alpha$



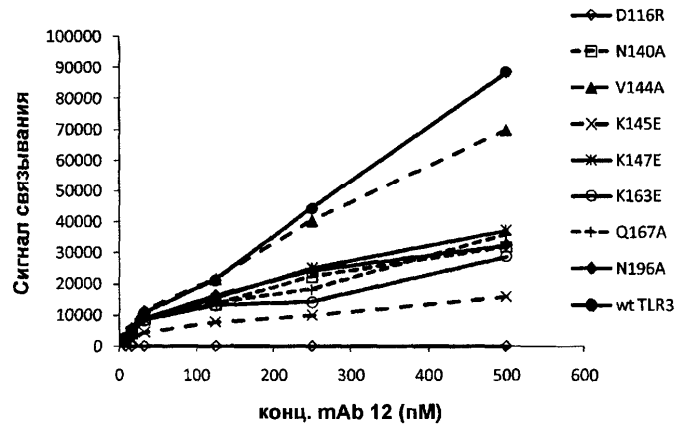
Фиг. 5А

Концентрации CCL5/RANTES после стимуляции poly:I:C + ФНО- $\alpha$

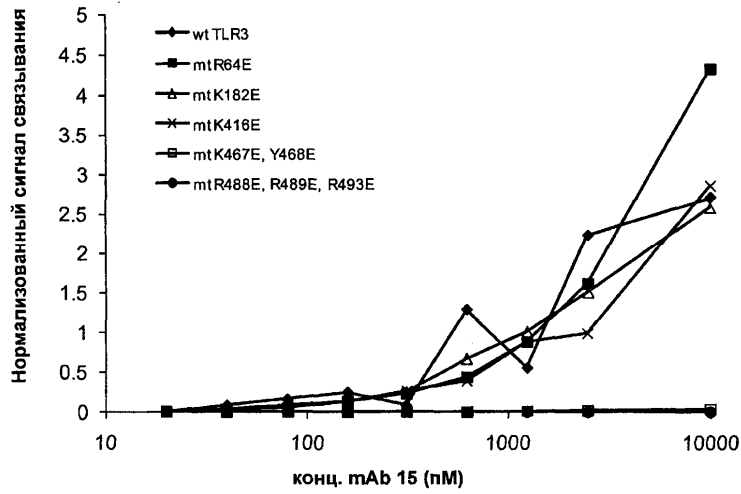


Фиг. 5В

**mAb 12 связывается с комплексами  
вариант ECD TLR3/ mAb 15**

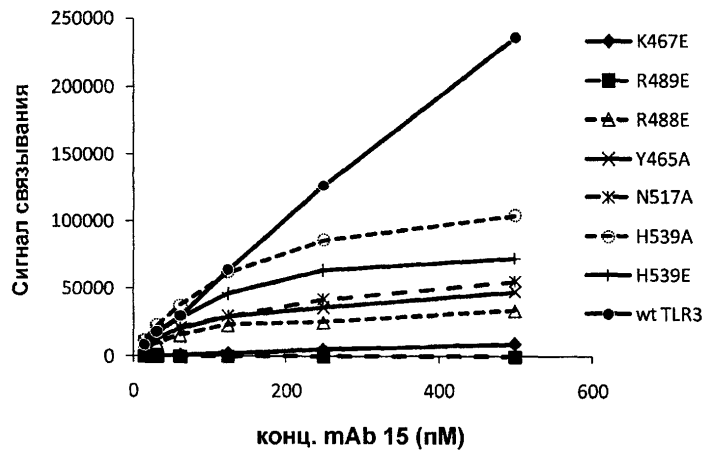


Фиг. 6А

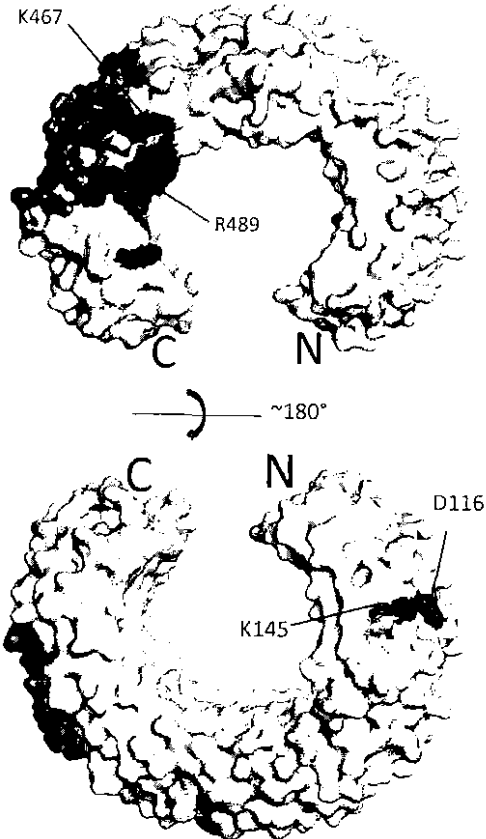


Фиг. 6В

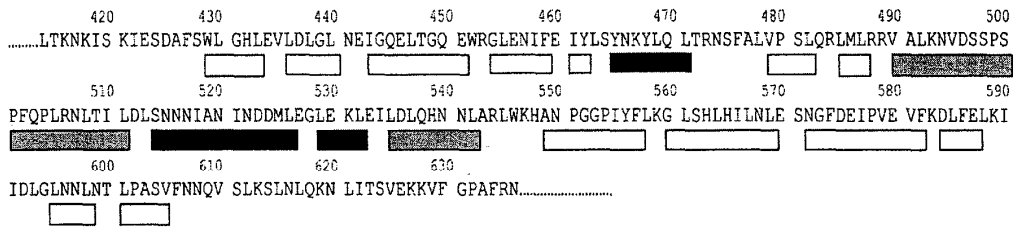
**mAb 15 связывается с комплексами  
вариант ECD TLR3/ mAb 12**



Фиг. 6С

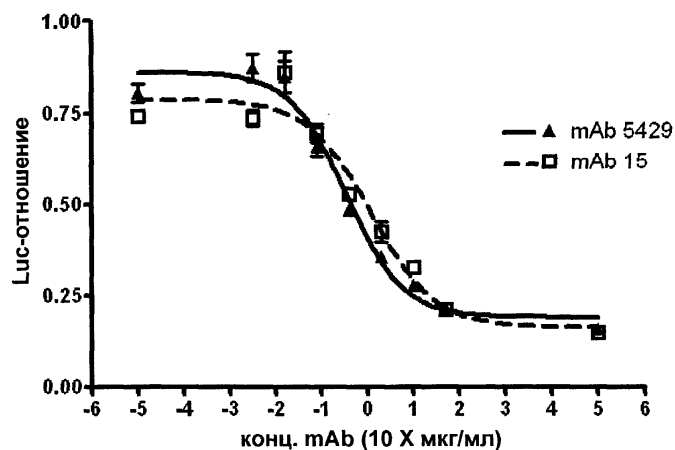


Фиг. 7А



- Много замен водорода на дейтерий при защите антителом
- ▨ Мало замен водорода на дейтерий при защите антителом
- без защиты

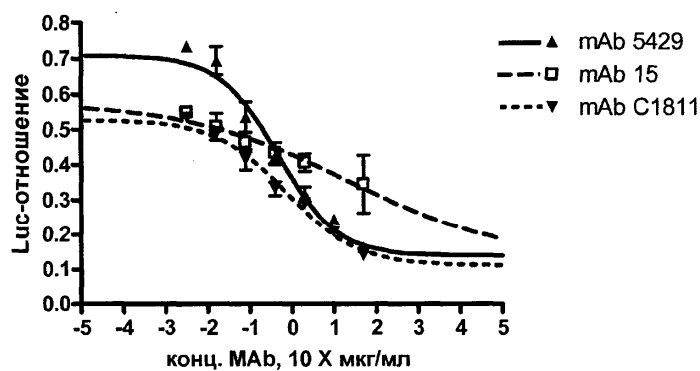
Фиг. 7В

293T-MuTLR3/ NF- $\kappa$ B

IC50 (мкг/мл)	5429	mAb 15
	0.3437	1.176

Фиг. 8А

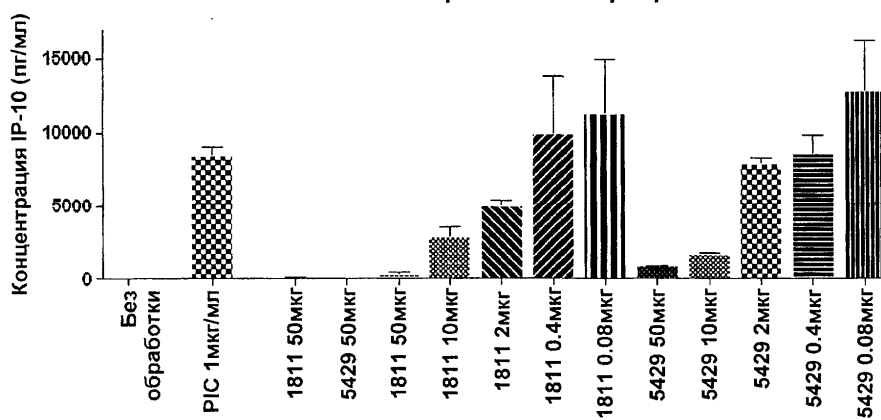
## 293T-Mu TLR3/ ISRE



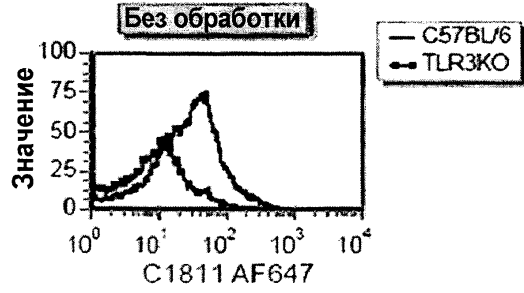
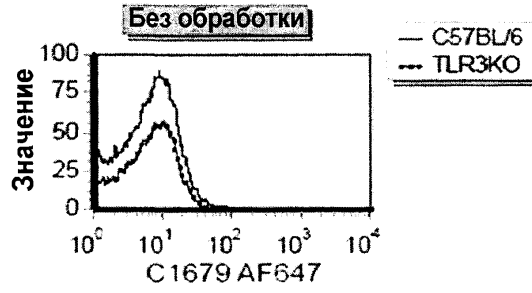
	mAb 5429	mAb 15	mAb C1811
EC50	0.4856	22.13	0.7481
мкг/мл			

Фиг. 8В

## Анализ мышечных эмбриональных фибробластов

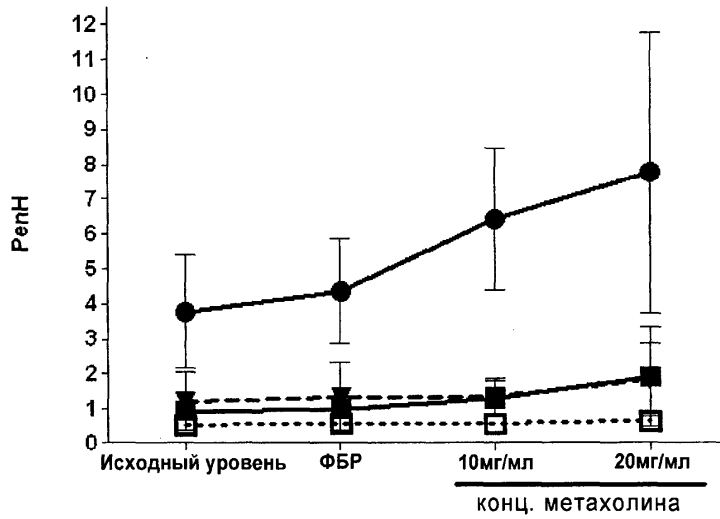


Фиг. 9



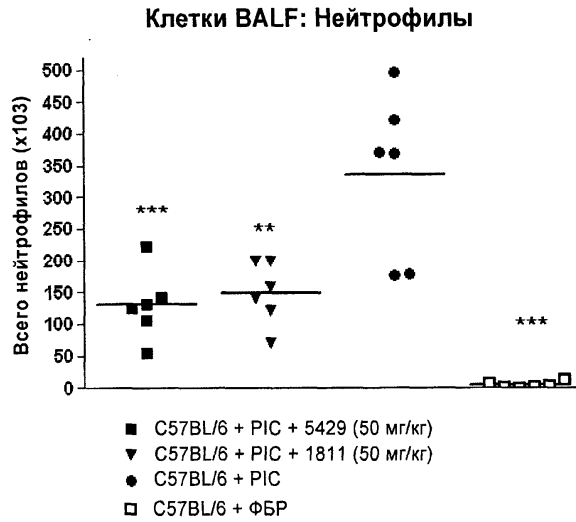
Фиг. 10

**AHR (BUXCO)**

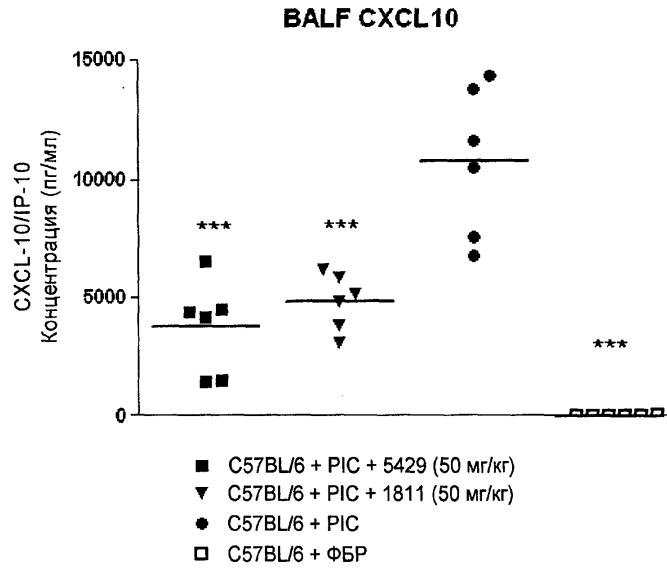


- C57BL/6 + PIC + 5429 (50 мг/кг)
- ▼ C57BL/6 + PIC + 1811 (50 мг/кг)
- C57BL/6 + PIC
- C57BL/6 + ФБР

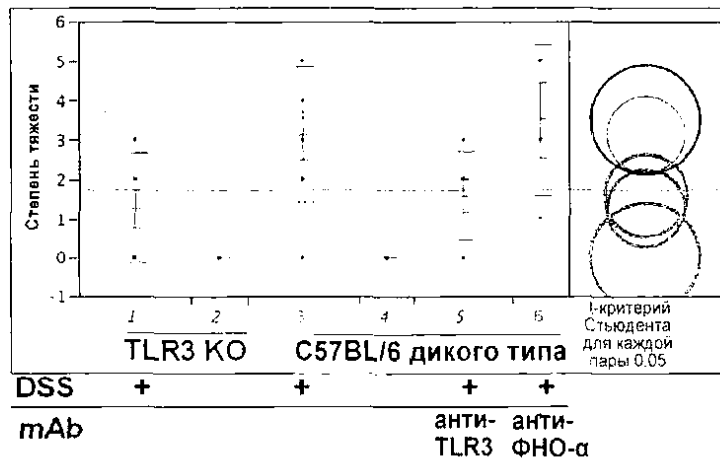
Фиг. 11



Фиг. 12

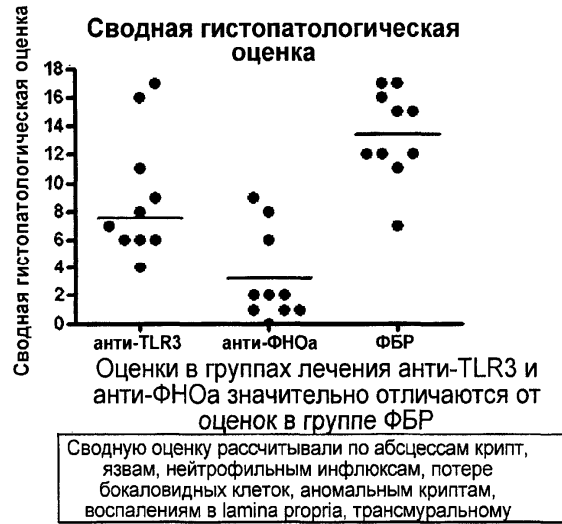


Фиг. 13

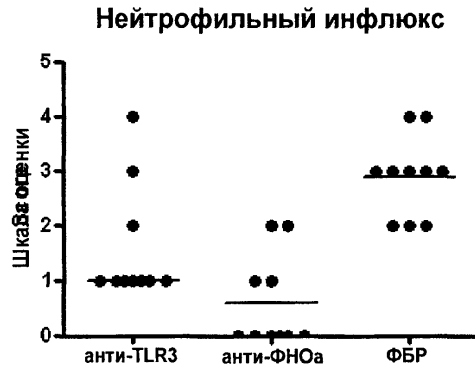


BLINDED подсчитывают с учетом: Некроза отдельных клеток. Изъязвлений эпителия. Шалущения эпителия. Абсцессов крипт. Пролиферации клеток крипт. LP Грануляций в подслизистой основе. Нейтрофилов в подслизистой. Отечности подслизистой оболочки

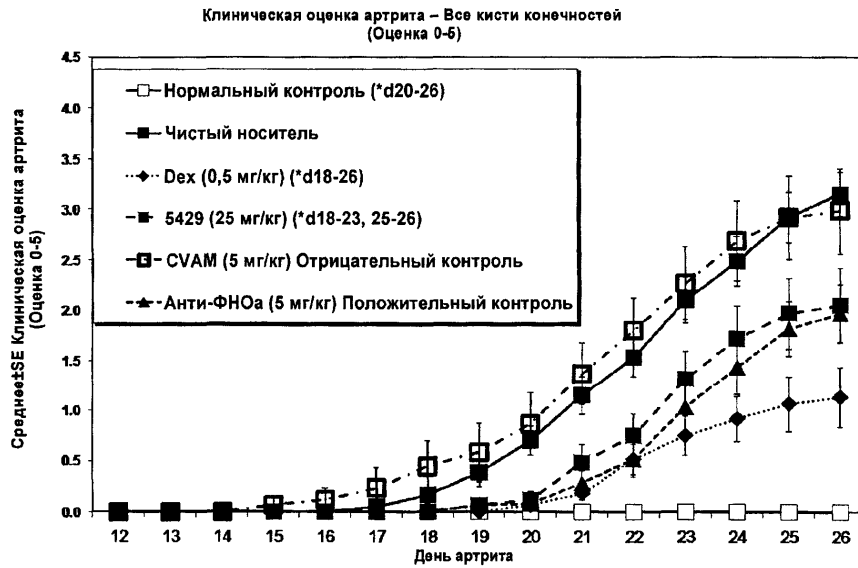
Фиг. 14



Фиг. 15А

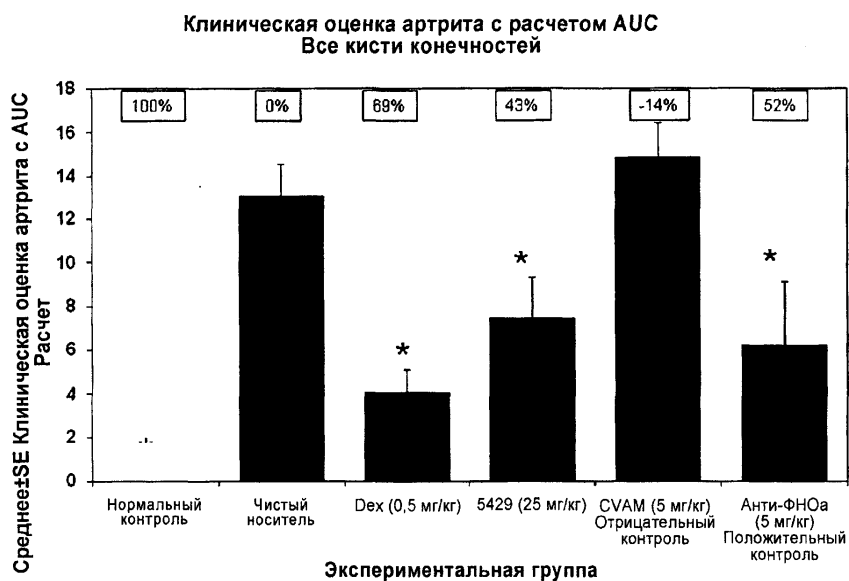


Фиг. 15В

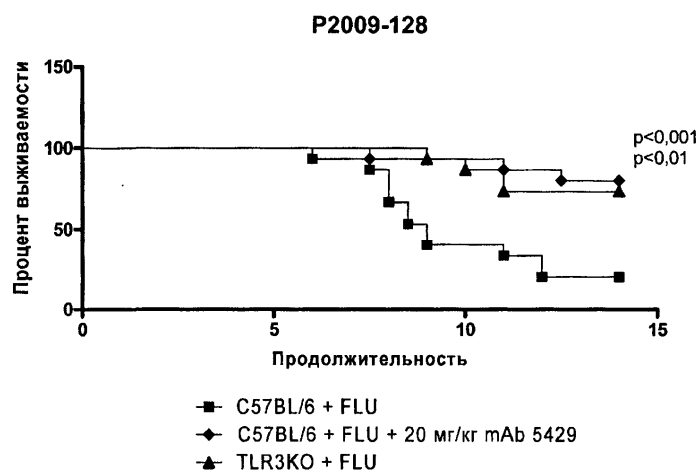


Фиг. 16



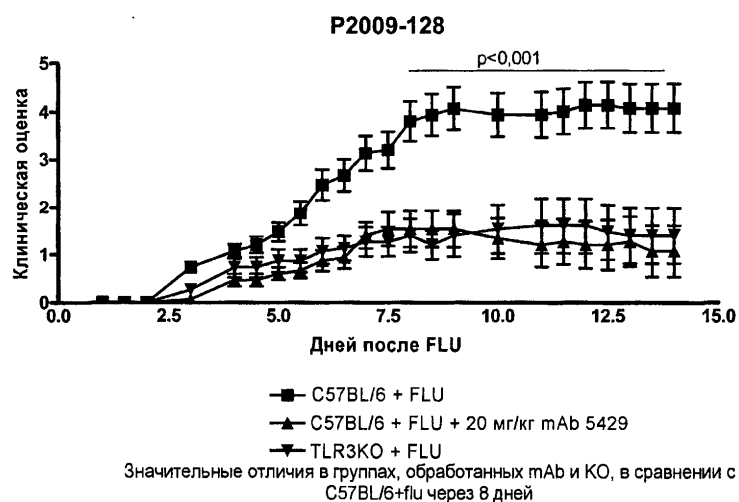


Фиг. 17

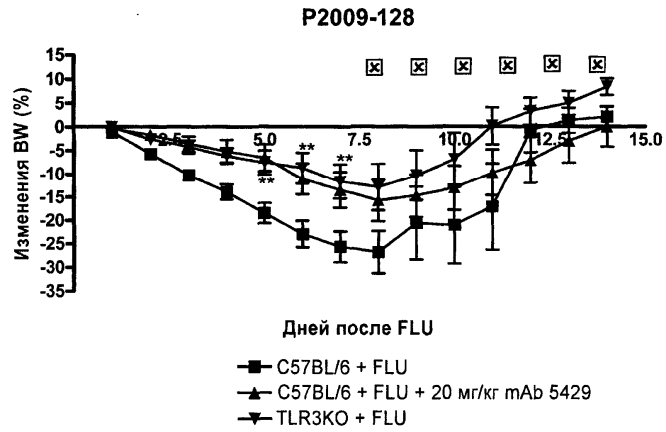


Фиг. 18

Клиническая оценка после введения вируса гриппа A/PR/8/34.3

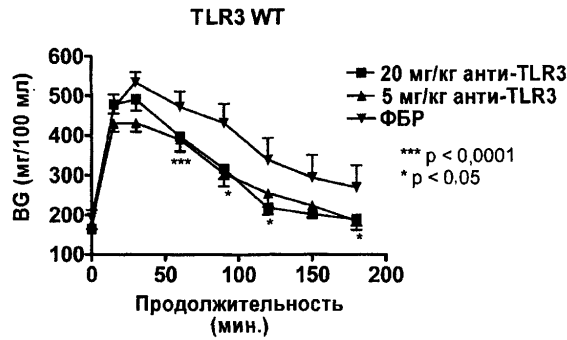


Фиг. 19

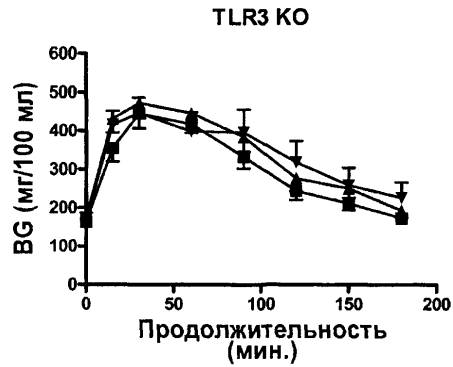


☒ Гибель животных  
Значительные отличия в группах, обработанных mAb и KO, в сравнении с C57BL/6+flu,  $p > 0,01$  в дни 5, 6 и 7

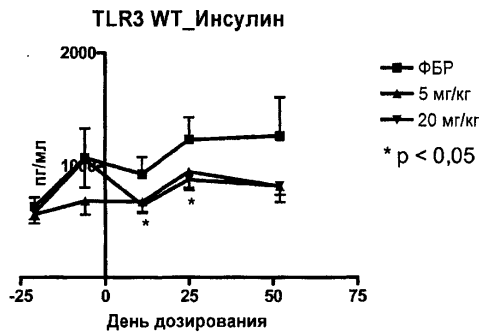
Фиг. 20



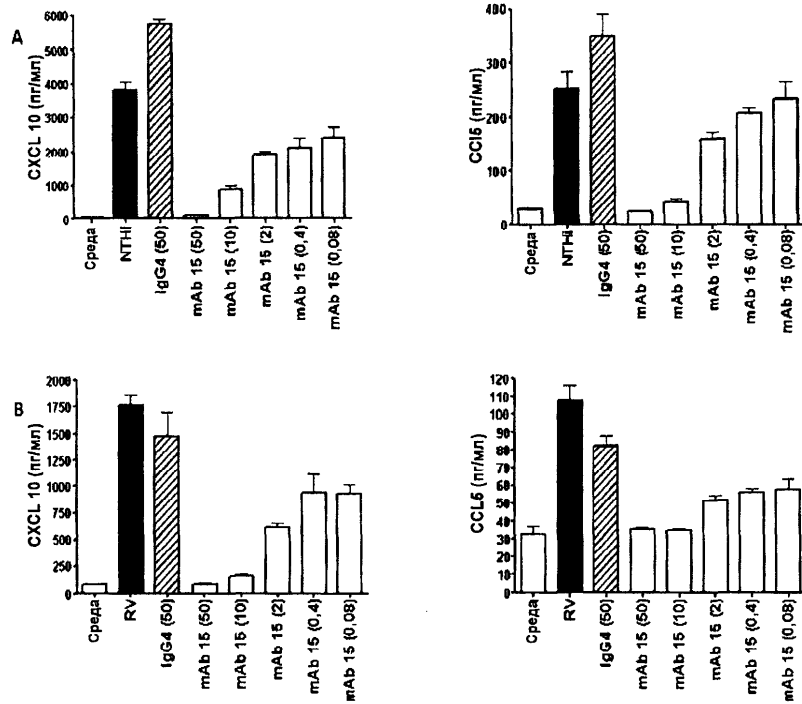
Фиг. 21А



Фиг. 21В

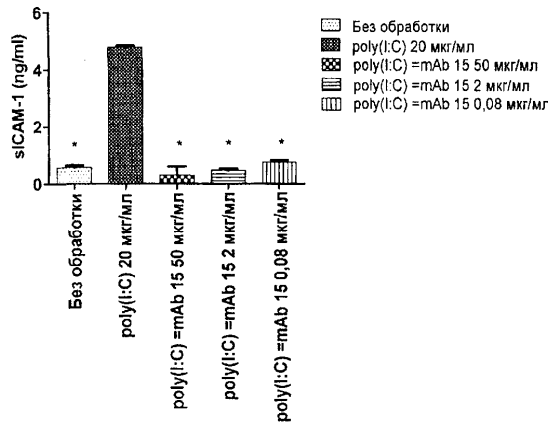


Фиг. 22



Фиг. 23

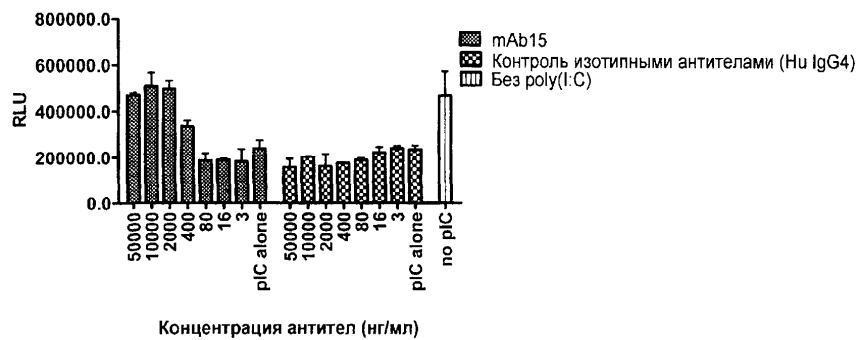
mAb15 ингибирует sICAM-1 в HUVEC, стимулированных poly(I:C)



Стимуляция клеток эндотелия

Фиг. 24А

Выживаемость клеток восстанавливается mAb15



Фиг. 24В