

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201201273 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2013.02.28

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2011.03.10

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К С-MET

(31) PA 2010 00191; 61/312,622; PA 2010
00862

(32) 2010.03.10; 2010.03.10; 2010.09.24

(33) DK; US; DK

(86) PCT/EP2011/053646

(87) WO 2011/110642 2011.09.15

(88) 2012.07.05

(71) Заявитель:
ГЕНМАБ А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Нейссен Йост Й., Де Гуэй Барт, Ван
Ден Бринк Эдвард, Лабрейн Аран
Франк, Хут Рене М.А., Схююрман
Янине, Паррен Паул, Ван Де Винкел
Ян (NL)

(74) Представитель:
Воробьева Е.В. (RU)

(57) Раскрыты выделенные моноклональные анти-
тела, которые связывают человеческий с-Met, ре-
цептор фактора роста гепатоцитов, связанные с
ними композиции и молекулы на основе антител.
Также раскрыты фармацевтические композиции,
включающие антитела, а также терапевтические и
диагностические способы применения антител.

201201273
A1

201201273

A1

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К С-MET

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам против человеческого с-Met, рецептора фактора роста гепатоцитов, и к применениям таких антител, конкретно к их применению в лечении злокачественных новообразований.

Предшествующий уровень техники

Белок с-Met является мембраноассоциированным рецептором-тирозинкиназой. Преимущественно одноцепочечный предшественник посттрансляционно расщепляется с получением зрелой формы гетеродимера с-Met, который состоит из внеклеточной α -цепи (50 кДа) и более длинной трансмембранной β -цепи (145 кДа), которые связаны дисульфидной связью (Birchmeier et al. 2003. Nat Rev Mol Cell Biol 4:915). Внеклеточная часть с-Met состоит из трех типов доменов. N-концевой домен SEMA образуется из цельной α -субъединицы и части β -субъединицы и имеет гомологию с белками семафоринов. За доменом SEMA следует цистеин-богатый домен, а далее 4 иммуноглобулино-(Ig)-подобных домена. Цитоплазматическая часть содержит околосмембранный киназный домен и C-концевой хвост, который существует для передачи сигнала в клетку. Единственный известный высоко-аффинный лиганд для с-Met, фактор роста гепатоцитов (HGF), экспрессируется, главным образом, фибробластами в нормальных условиях (Li and Tseng 1995. J Cell Physiol 163:61) и опухолевыми клетками (Ferracini et al. 1995. Oncogene 10:739). HGF (также называемый рассеивающим фактором: SF) синтезируется в виде предшественника, который протеолитически превращается в активный α/β гетеродимер. На основании кристаллической структуры фрагмента, связывающего рецептор, считается, что HGF связывается с с-Met в виде димера (Chirgadze et al. 1999. Nat Struct Biol 6:72). α -Цепь HGF связывается с с-Met с высокой аффинностью с Ig-подобным доменом, тогда как β -цепь HGF связывается с с-Met с низкой аффинностью с доменом SEMA (Basilico et al. 2008. J Biol Chem 283:21267). Последнее взаимодействие ответственно за димеризацию с-Met и активацию рецепторной тирозинкиназы при связывании с активным гетеродимером HGF. Автофосфорилирование рецептора приводит в результате к получению уникального стыковочного сайта для привлечения эффекторов, из которых связывание Gab1 (1-й связующий агент, ассоциированный с 2-м белком, связанным с рецептором фактора роста [Grb2]) существенно для последующих этапов основных сигнальных путей с-Met (Comoglio et al. 2008. Nat Rev Drug Discov 7:504):

- Путь Ras-ERK1/2: пролиферация.
- Путь Ras-Rac: инвазия, подвижность, эпителиально-мезенхимальный переход.
- Путь PI3K-Akt: жизнеспособность.

c-Met экспрессируется на поверхности эпителиальных и эндотелиальных клеток многих органов в процессе эмбриогенеза и во взрослом состоянии, включая печень, поджелудочную железу, предстательную железу, почки, мышцы и костный мозг. Активация c-Met играет существенную роль в так называемой программе «инвазивного роста», которая состоит из ряда процессов, включающих пролиферацию, подвижность, ангиогенез и защиту от апоптоза (Boscaccio and Comoglio 2006. *Nat Rev Cancer* 6:637). Эти регулируемые c-Met процессы идут при нормальных физиологических условиях в процессе эмбрионального развития, при репарации поражений печени и сердца, и в патологических случаях в ходе онкогенеза (Eder et al. 2009. *Clin Cancer Res* 15:2207).

Неуместная передача сигналов от c-Met происходит фактически во всех типах твердых опухолей, таких как рак мочевого пузыря, рак груди, рак шейки матки, колоректальный рак, рак желудка, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак почек и рак щитовидной железы, а также в различных саркомах, гемопоэтических злокачественных новообразованиях и в меланом (Birchmeier et al. 2003. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:915; Comoglio et al. 2008. *Nat Rev Drug Discov* 7:504; Peruzzi and Bottaro 2006. *Clin Cancer Res* 12:3657). Основополагающие механизмы онкогенности c-Met, как правило, осуществляются тремя различными путями:

- аутокринные петли HGF/c-Met,
- сверхэкспрессия c-Met или HGF,
- мутации в кодирующей последовательности рецептора c-Met, активирующие киназы.

Наиболее значимо то, что активирующие c-Met мутации были идентифицированы у пациентов с наследственным папиллярным раком почек (Schmidt et al. 1997. *Nat Genet* 16:68). Конститутивная активация c-Met способствует одному из или комбинации пролиферативного, инвазивного, жизнеобеспечивающего или ангиогенного фенотипов злокачественных новообразований. Было показано, что сайленсинг эндогенно экспрессирующегося гена c-Met в опухолевых клетках в результате приводит к прекращению пролиферации и опухолевого роста и к регрессии начавшегося метастазирования, а также к уменьшению образования новых метастаз (Corso et al. 2008. *Oncogene* 27:684).

Так как c-Met способствует многим состояниям развития злокачественного

новообразования, от исходного до прогрессии к метастазированию, с-Met и его лиганд HGF стали лидирующими кандидатами для направленной противоопухолевой терапии (Comoglio et al. 2008. *Nat Rev Drug Discov* 7:504; Knudsen and Vande Woude 2008. *Curr Opin Genet Dev* 18:87). Для достижения данной цели изучаются несколько стратегий:

- Ложные рецепторы: субобласти HGF или с-Met или молекулярные аналоги могут действовать антагонистически в качестве стехиометрических конкурентов путем блокирования связывания лиганда или димеризации рецептора. Одним примером такой антагонистической субобласти HGF является NK4 (Kringle Pharma).
- Низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ (TKI): Три с-Met-специфичными TKI в различных стадиях клинической оценки являются ARQ197 (ArQule), JNJ 38877605 (Johnson & Johnson) и PF-04217903 (Pfizer).
- Моноклональные антитела, связывающие HGF, такие как AMG102, рилотумумаб (англ. rilotumumab) (Amgen), HuL2G7 (Takeda), и AV-299 (Schering).
- Моноклональные антитела, связывающие с-Met, описаны в WO2005016382, WO2006015371, WO2007090807, WO2007126799 WO2009007427, WO2009142738 и в работе van der Horst et al. (van der Horst et al. 2009. *Neoplasia* 11:355). MetMAb (Genentech) представляют собой гуманизированные моновалентные (одно-плечевые) ОА-5D5 антитела, которое связывают внеклеточный домен с-Met, предотвращая таким образом связывание HGF и последующую активацию рецептора (Jin et al. 2008. *Cancer Res* 68:4360). В мышинных моделях ксенотрансплантатов было обнаружено, что обработка MetMAb ингибирует опухолевый рост HGF-управляемой ортотопической глиобластомы и подкожных панкреатических опухолей (Jin et al. 2008. *Cancer Res* 68:4360; Martens et al. 2006. *Clin Cancer Res* 12:6144). Антитело h224G11 (Pierre Fabre) (Corvaia and Boute 2009. Abstract 835 AACR 100th Annual Meeting) представляет собой гуманизированное двухвалентное IgG1-антитело против с-Met. Противоопухолевый эффект данного антитела наблюдали у мышей (Goetsch et al. 2009. Abstract 2792 AACR 100th Annual Meeting). Антитело CE-355621 (Pfizer) представляет собой человеческий IgG2, который блокирует связывание лиганда путем связывания с внеклеточным доменом с-Met и ингибирует HGF-зависимый рост в моделях опухолевых ксенотрансплантатов (Tseng et al. 2008. *J Nucl Med* 49:129).

В заключении следует отметить, что некоторые продукты против с-Met уже изучались, но до сих пор не существует ни одного продукта против с-Met, одобренного для терапевтического применения. Существует потребность в получении эффективных и безопасных продуктов для лечения тяжелых, ассоциированных с с-Met заболеваний, таких как злокачественные новообразования.

Сущность изобретения

Целью настоящего изобретения является предложение новых высокоспецифичных и эффективных моноклональных антител против с-Met для медицинского применения. Антитела по изобретению демонстрируют характеристики связывания с с-Met, которые отличаются от характеристик антител, описанных в данной области. В предпочтительных воплощениях, антитела по изобретению обладают высокой аффинностью по отношению к человеческому с-Met, являются антагонистическими и обладают предпочтительным профилем фармакокинетики для применения у пациентов-людей.

Краткое описание чертежей

Фигура 1. Сравнение последовательностей переменных участков тяжелых цепей антител NuMab. На основании этих последовательностей могут быть определены консенсусные последовательности CDR. Эти консенсусные последовательности представлены в таблице 4.

Фигура 2. Сравнение последовательностей переменных участков легких цепей антител NuMab. На основании этих последовательностей могут быть определены консенсусные последовательности CDR. Эти консенсусные последовательности представлены в таблице 4.

Фигура 3. Кривые связывания одновалентных и двухвалентных форм антител против с-Met с клетками A431, которые экспрессируют с-Met. Представленные данные это MFI одного репрезентативного эксперимента. Так как IgG1-024 и Uni-068 не демонстрируют насыщенного связывания с клетками A431, то не представляется возможным рассчитать точное значение EC_{50} .

Фигура 4. Связывание антител с с-Met, который экспрессируется на эпителиальных клетках макаки-резус. Представленные данные - это MFI одного эксперимента.

Фигура 5. Ингибирование связывания HGF с внеклеточным доменом рецептора с-Met, индуцированное антителом против с-Met. Представленные данные - это один репрезентативный эксперимент.

Фигура 6. Кривые ингибирования различными антителами против с-Met связывания HGF с cMetSEMA_567His8, полученные с помощью TR-FRET. Представленные данные - это среднее $MFI \pm$ стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

Фигура 7. Процентное ингибирование жизнеспособных клеток KP4 после обработки антителом против с-Met по сравнению с необработанными клетками (0%). Представленные данные - это процентное ингибирование жизнеспособных клеток двух

независимых экспериментов $\pm$ стандартное отклонение. IgG1-1016-022 является единственным положительным результатом в одном эксперименте.

Фигура 8. Эффективность антител против c-Met при ингибирования опухолевого роста в модели ксенотрансплантата KP4 в мышах SCID. Мышей обрабатывали с помощью 400 μ д антитела на 9 день после недельного поддержания дозы 200 μ д. Представлены средние размеры опухоли на группу обработки.

Фигура 9. Эффективность антител, связывающих c-Met, для ингибирования опухолевого роста в модели ксенотрансплантата KP4 в мышах SCID. Мышей обрабатывали 400 мкг антитела на 9 день, с последующей поддерживающей дозой 200 мкг раз в неделю. Эффект обработки, оказываемый на частоту опухолей, от времени. Представлен процент мышей без опухоли (размеры опухолей $<500 \text{ мм}^3$). Образование опухолей замедлялось у мышей, обработанных антагонистическими антителами, по сравнению с мышами, обработанными контрольными антителами.

Фигура 10. Эффективность антител против c-Met при ингибировании опухолевого роста в модели ксенотрансплантата MKN45 в мышах SCID. Мышей обрабатывали 40 мг/кг антитела на 7 день и 20 мг/кг антитела в дни 14, 21 и 28. Представлены средние размеры опухолей до достижения 50% мышей предельного значения, составляющего 700 мм^3 на группу обработки.

Фигура 11. Эффективность антител против c-Met, при ингибировании опухолевого роста в модели ксенотрансплантата MKN45 в мышах SCID. Мышей обрабатывали 40 мг/кг антитела на 7 день и 20 мг/кг антитела в дни 14, 21 и 28. Процент мышей с размером опухоли менее чем 700 мм^3 представлен на диаграмме Каплана-Мейера. Образование опухолей замедлялось у мышей, обработанных анти c-Met антителами, по сравнению с мышами, обработанными изотипическим контрольным антителом.

Фигура 12. Анализ жизнеспособности KP4 для определения влияния гибкости антитела (antibody flexibility) на его агонистическую активность. Формат IgA2m(I) не индуцирует пролиферацию в отличие от форматов IgA1 и IgG1 того же антитела. В данном эксперименте использовали варианты антитела против c-Met 5D5 (см. US6468529 и пример 2).

Фигура 13. Анализ гибких мутантов в невозстанавливающем ДСН-ПААГ (069). Не наблюдали aberrantных мультимеров или продуктов деградации, тогда как спаривание легкой цепи было видно как полосу 50 кДа ((LC)₂) в C220S, Δ C220 в мутантах IgG1-шарнир IgG3.

Фигура 14. Антигенсвязывающий тИФА для измерения связывания с c-Met антител против c-Met с мутациями в шарнире. С помощью тИФА было показано, что все мутанты

связывают с-Met со сравнимой аффинностью.

Фигура 15. Фосфорилирование с-Met как регистрируемая величина агонистической активности антител против с-Met. На фигуре 15 представлены результаты вестерн-блоттинга лизатов клеток A549; мембраны окрашены антителами против фосфорилированного с-met, общего с-Met или β -актина.

Фигура 16. Анализ пролиферации с использованием клеток NCI-H441. Клеточную массу определяли через 7 дней инкубации в присутствии антитела или контролей, и выражали в виде процента относительно необработанных образцов (для которых устанавливали 100%).

Фигура 17. Анализ жизнеспособности КР4. Тестировали эффект, оказываемый антителами против с-Met, на общую жизнеспособность клеток КР4. Способность IgG1-1016-069 снижать жизнеспособность КР4 сохранялась и/или улучшалась путем введения мутаций, которые снижали гибкость антител.

Фигура 18. Отрицательная модуляция, измеренная с помощью тИФА в виде уровня суммарного с-Met в лизатах A549. Все варианты антитела (069) сохраняли способность отрицательной модуляции.

Фигура 19. Анализ ADCC для сравнения антител IgG1-1016-069 с высоким и с низким содержанием фукозы.

Фигура 20. Отсутствие связывания антител с-Met с клетками в цельной крови в анализе связывания FACS. Результаты представлены для В-клеток, моноцитов и гранулоцитов.

Подробное описание изобретения

Определения

Термин «с-Met», при использовании в данном документе, обозначает рецептор фактора роста гепатоцитов (регистрационный номер Genbank NM 000245) и включает любые варианты, изоформы и межвидовые гомологи человеческого с-Met, которые естественным образом экспрессируются клетками или экспрессируются на клетках, трансфицированных геном с-Met.

Термин «иммуноглобулин» обозначает класс структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, все четыре связаны между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована. См., например, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь, как правило, содержит переменную область

тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как V_H или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит, как правило, три домена, C_{H1} , C_{H2} , и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит, как правило, переменную область легкой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как V_L или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит, как правило, один домен, C_L . Области V_H и V_L , которые могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определяемых петель), также их называют областями, отвечающими за комплементарность связывания (CDR), перемежаются участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L , как правило, содержит три CDR и четыре FR, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см., также Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Как правило, нумерация аминокислотных остатков в данной области осуществляется с помощью метода, описанного у Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (фразы, такие как нумерация остатка переменного домена как у Kabat или согласно Kabat обозначают в данном документе систему нумерации для переменных доменов тяжелой цепи или переменных доменов легкой цепи). С использованием данной системы нумерации, фактическая линейная аминокислотная последовательность пептида может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, что соответствует укорачиванию или вставке в FR или CDR переменного домена. Например, переменный домен тяжелой цепи может включать единичную аминокислотную вставку (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 V_H CDR2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b, и 82c, и т.д. согласно Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Kabat может определяться для данного антитела с помощью сравнения областей гомологии последовательности антитела с последовательностью со «стандартной» нумерацией по Kabat.

В контексте настоящего изобретения термин «антитело» (АТ) обозначает молекулу иммуноглобулина, фрагмент молекулы иммуноглобулина или их производное, которые обладают способностью специфично связываться с антигеном при обычных физиологических условиях, с периодом полужизни, составляющим существенные периоды времени, например, по меньшей мере, около 30 минут, по меньшей мере, около 45 минут, по меньшей мере, около одного часа, по меньшей мере, около двух часов, по

меньшей мере, около четырех часов, по меньшей мере, около 8 часов, по меньшей мере, около 12 часов, около 24 часов или более, около 48 часов или более, около 3, 4, 5, 6, 7 дней или более и т.д., или любой другой соразмерный функционально определенный период (такой как период времени, достаточный для индукции, стимулирования, усиления и/или модуляции физиологического ответа, ассоциированного с антителом, связывающимся с антигеном, и/или период времени, достаточный для антитела для вызова эффекторной активности). Вариабельные области тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител (АТ) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как, эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент классического пути активации системы комплемента. Антитело, связывающее с-Met, также может быть биспецифичным антителом, диателом или подобной им молекулой (описание диател см., например, в PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993)). Действительно, биспецифичные антитела, диатела и им подобные, представленные настоящим изобретением, могут связываться с подходящей мишенью дополнительно к участку с-Met. Как указано выше, термин антитело в данном документе, если не указано иное или пока нет очевидного противоречия по контексту, включает фрагменты антитела, которое сохраняет способность специфично связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена с помощью фрагментов полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охваченных термином «антитело», включают (i) фрагмент Fab' или фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} , или моновалентное антитело, описанное в WO2007059782 (Genmab); (ii) фрагменты $F(ab')_2$, двухвалентные фрагменты, включающие два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, по существу состоящий из доменов V_H и C_{H1} ; (iv) фрагмент Fv, по существу состоящий из доменов V_L и V_H одиночного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который по существу состоит из домена V_H и называется также доменным антителом (Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90); (vi) верблужьи антитела или нанотела (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24) и (vii) выделенный гипервариабельный участок (CDR). Более того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, они могут быть объединены, с помощью рекомбинантных методов, посредством синтетического линкера, который позволяет им создать отдельную белковую цепь, в которой области V_L и V_H сливаются с образованием моновалентных молекул (известных

как одноцепочечные антитела или одноцепочечный фрагмент Fv (scFv), см. например, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) и Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охвачены термином антитело, если не упомянуто иное или очевидно не указано в контексте. Хотя такие фрагменты, как правило, включены в обозначение антитела, они все вместе или по отдельности представляют собой уникальные признаки настоящего изобретения, демонстрирующие различные биологические свойства и применимость. Эти и другие применяемые антительные фрагменты в контексте настоящего изобретения обсуждаются далее в данном документе. Также следует понимать, что термин антитело, если не указано иное, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (мАТ), антитело-подобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела, и антительные фрагменты, сохраняющие способность специфического связывания с антигеном (антигенсвязывающие фрагменты), полученные с помощью известных методов, таких как ферментативное расщепление, пептидный синтез и рекомбинантные методы. При продуцировании антитело может обладать любым изотипом.

При использовании в данном документе термин «изотип» относится к любому классу иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, или IgM), которые кодируются генами константных областей тяжелых цепей.

В контексте настоящего изобретения, термин «моновалентное антитело» обозначает, что молекула антитела способна к связыванию с одной молекулой антигена, и, таким образом, не способна к перекрестному связыванию с антигенами.

«Антитело, дефицитное по эффекторной функции» или «антитело с дефицитом эффекторной функции» обозначает антитело, которое обладает значительно меньшей или не обладает способностью активировать один или несколько эффекторных механизмов, таких как активация комплемента или связывание с Fc-рецептором. Таким образом, антитела, дефицитные по эффекторной функции, обладают значительно меньшей или не обладают способностью опосредовать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Примером такого антитела является IgG4.

«Антитело, связывающее с-Met» представляет собой антитело, описанное выше, которое специфично связывается с антигеном с-Met.

При использовании в данном документе, подразумевается, что термин «человеческое антитело» включает антитела, содержащие переменные и константные области, выделенные из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. Человеческие антитела по изобретению могут включать

аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими зародышевыми последовательностями иммуноглобулинов (например, мутации, введенные неспецифическим или сайтспецифическим мутагенезом *in vitro* или соматическими мутациями *in vivo*). Однако, при использовании в данном документе, подразумевается, что термин «человеческое антитело» не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мыши, были пересажены в человеческие каркасные последовательности.

При использовании в данном документе, человеческое антитело «выделено из» зародышевой последовательности, если антитело получено из системы с использованием человеческих иммуноглобулиновых последовательностей, например, путем иммунизации трансгенной мыши, несущей человеческие иммуноглобулиновые гены, или путем скрининга библиотеки человеческих иммуноглобулиновых генов, и где выбранное человеческое антитело идентично по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой зародышевым иммуноглобулиновым геном, по меньшей мере, на 90%, например, по меньшей мере, на 95%, например, по меньшей мере, на 96%, например, по меньшей мере, на 97%, например, по меньшей мере, на 98%, или например по меньшей мере, на 99%. Как правило, помимо CDR3 тяжелой цепи, человеческое антитело, полученное из конкретной человеческой зародышевой последовательности, будет демонстрировать не более чем 20 аминокислотных отличий, например, не более чем 10 аминокислотных отличий, как например, не более чем 9, 8, 7, 6 или 5, например, не более чем 4, 3, 2, или 1 аминокислотное отличие от аминокислотной последовательности, кодируемой зародышевым иммуноглобулиновым геном.

В предпочтительном воплощении, антитело по изобретению является выделенным. При использовании в данном документе, подразумевается, что «выделенное антитело» обозначает антитело, которое по существу свободно от других антител, обладающих отличными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфично связывается с с-Met, по существу свободно от антител, которые специфично связываются с антигенами, отличными от с-Met). Выделенное антитело, которое специфично связывается с эпитопом, изоформой или вариантом человеческого с-Met, может, однако, обладать перекрестной реактивностью с другими родственными антигенами, например из других видов (например, с межвидовыми гомологами с-Met). Кроме того, выделенное антитело может быть фактически свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ. В одном воплощении настоящего изобретения два или несколько «выделенных» моноклональных антител, обладающих отличающимися антигенсвязывающими специфичностями, объединяются в хорошо

охарактеризованной композиции.

При использовании в данном документе в контексте двух или нескольких антител, термин «конкурирует с» или «перекрестно конкурирует с» обозначает, что два или несколько антител конкурируют за связывание с с-Met, например, конкурируют за связывание с с-Met в анализе, описанном в примерах данного документа. Для некоторых пар антител конкуренция при анализе в примерах наблюдается только тогда, когда антитело нанесено в виде покрытия на чашку, а другое антитело используется для конкуренции, а не наоборот. Также при использовании в данном документе подразумевается, что термин «конкурирует с» охватывает такие комбинации антител.

Термин «эпитоп» означает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы, как правило, содержат поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи и, как правило, имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем что связывание с первым, но не последним, нарушается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может включать аминокислотные остатки, непосредственно вовлеченные в связывание (также называемые иммунодоминантные компоненты эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые вовлечены в связывание, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются специфическим антигенсвязывающим пептидом (другими словами, аминокислотный остаток находится внутри футпринта специфического антигенсвязывающего пептида).

При использовании в данном документе, термин «моноклональное антитело» относится к препарату молекул антитела одной молекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела демонстрирует уникальную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Соответственно, термин «человеческое моноклональное антитело» обозначает антитела, демонстрирующие уникальную специфичность связывания, и которые содержат переменные и константные области, выделенные из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. Человеческие моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомы, которая является слитой с иммортализованной клеткой В-клеткой, полученной из трансгенного или трансхромосомного животного, отличного от человека, такого как трансгенная мышь, имеющего геном, включающий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи человека.

При использовании в данном документе, термин «связывание» в контексте связывания антитела с конкретным антигеном с аффинностью связывания,

соответствующей K_D около 10^{-7} М или менее, как например, около 10^{-8} М или менее, как например, около 10^{-9} М или менее, около 10^{-10} М или менее, или около 10^{-11} М или еще менее, согласно определению, с помощью, например технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе «BIAcore 3000» с использованием антигена в качестве лиганда и антитела в качестве аналита, которое связывается с конкретным антигеном с аффинностью, соответствующей K_D , которая, по меньшей мере, в десять раз ниже, например, в 100 раз ниже, например, по меньшей мере, в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере, в 10000 раз ниже, например, по меньшей мере, в 100000 раз ниже, чем аффинность связывания с неспецифичным антигеном (например, БСА, казеин), отличным от конкретного антигена или близкородственного антигена. Значение, на которое снижается аффинность, зависит от K_D антитела, так что когда K_D антитела очень низкая (то есть, антитело высокоспецифично), то значение, на которое аффинность к антигену ниже, чем аффинность для неспецифичного антигена, может быть, по меньшей мере, десятикратным.

Термин « k_d » (сек^{-1}), при использовании в данном документе, обозначает константу степени диссоциации конкретного взаимодействия антиген-антитело. Указанное значение также обозначается в виде k_{off} .

Термин « k_a » ($\text{М}^{-1} \times \text{сек}^{-1}$), при использовании в данном документе, обозначает константу степени ассоциации конкретного взаимодействия антиген-антитело.

Термин « K_D » (М), при использовании в данном документе, обозначает константу равновесной диссоциации конкретного взаимодействия антиген-антитело.

Термин « K_A » (М^{-1}), при использовании в данном документе, обозначает константу равновесной ассоциации конкретного взаимодействия антиген-антитело, которую получают путем деления k_a на k_d .

При использовании в данном документе, подразумевается, что термин «ингибирует рост» (например, в отношении клеток, таких как опухолевые клетки) включает любое измеряемое уменьшение клеточного роста при контакте с антителом, связывающим с-Met, по сравнению с ростом тех же клеток, не контактировавших с антителом, связывающим с-Met, например, ингибирование роста клеточной культуры, по меньшей мере, на величину около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, или 100%. Такое уменьшение клеточного роста может происходить с помощью различных механизмов, например, с помощью фагоцитоза эффекторных клеток, ADCC, CDC, и/или апоптоза.

В настоящем изобретении также предлагаются антитела, включающие функциональные варианты области V_L , области V_H , или одного или нескольких CDR антител из примеров. Функциональный вариант V_L , V_H , или CDR, используемых в

контексте антитела против с-Met, дает возможность антителу сохранить, по меньшей мере, существенную часть (по меньшей мере, около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более) аффинности/авидности и/или специфичности/селективности родительского антитела и в некоторых случаях такое антитело против с-Met может быть ассоциировано с большей аффинностью, селективностью и/или специфичностью, чем родительское антитело.

Такие функциональные варианты, как правило, сохраняют существенную идентичность последовательности с родительским антителом. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных позиций в последовательностях (т.е. % гомологии = числу идентичных позиций/общее число позиций $\times 100$), принимая во внимание число пробелов и длину каждого пробела, которые должны вноситься для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, может быть определен, например, с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988), который включен в программу «ALIGN» (версия 2.0) с использованием таблицы масс остатков PAM120, с штрафом за удлинение пробела, равным 12, и штрафом за внесение пробела, равным 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с помощью алгоритма Нидлмана и Вунша, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970).

Последовательность вариантов CDR может отличаться от последовательности CDR последовательностей родительских антител консервативными заменами; например, по меньшей мере, 10, например, по меньшей мере, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из замен в варианте являются консервативными заменами аминокислотных остатков.

В контексте настоящего изобретения, консервативные замены могут определяться с помощью замен внутри классов аминокислот, отраженных в следующей таблице:

Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Кислые остатки	Asp (D) и Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R), и His (H)
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (S), Thr (T), Asn (N), и Gln (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), и Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M), и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y), и Trp (W)

При использовании в данном документе, подразумевается, что термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») обозначает клетку, в

которую вводится экспрессирующий вектор, например, экспрессирующий вектор, кодирующий антитело по изобретению. Рекомбинантные клетки-хозяева включают, например, трансфектомы, такие как клетки CHO, клетки HEK293, клетки NS/0 и лимфоцитарные клетки.

Термин «трансгенное животное, отличное от человека» обозначает животное, отличное от человека, имеющее геном, включающий один или несколько трансгенов тяжелой и/или легкой цепи человека или включающий трансхромосомы (как интегрированные, так и не интегрированные в естественную геномную ДНК животного), и который способен экспрессировать полностью человеческие антитела. Например, трансгенная мышь может иметь трансген человеческой легкой цепи и либо трансген человеческой тяжелой цепи, либо трансхромосому человеческой тяжелой цепи, так что мышь продуцирует человеческие антитела против с-Met, при иммунизации антигеном с-Met и/или клетками, экспрессирующими с-Met. Трансген человеческой тяжелой цепи может быть интегрирован в хромосомную ДНК мыши, как в случае трансгенных мышей, например, мышей HuMAb, как например, мышей HCo7 или мышей HCo12, или трансген человеческой тяжелой цепи может поддерживаться внехромосомно, как в случае трансхромосомных мышей KM, как описано в WO02/43478. Похожие мыши, имеющие большой набор человеческих генов AT, включают HCo7 и HCo20 (см., например, WO2009097006). Такие трансгенные и трансхромосомные мыши (вместе обозначенные в данном документе как «трансгенные мыши») способны продуцировать множество изотипов человеческих моноклональных антител к данному антигену (таких как IgG, IgA, IgM, IgD и/или IgE), при рекомбинации V-D-J и переключении изотипов. Трансгенное животное, отличное от человека, также может использоваться для продуцирования антител против специфического антигена путем введения генов, кодирующих специфическое антитело, например, путем функционального связывания генов с геном, который экспрессируется в молоке животного.

«Лечение» обозначает введение эффективного количества терапевтически активного соединения по настоящему изобретению с целью облегчения, улучшения, купирования или устранения (излечения) симптомов болезненных состояний.

«Эффективное количество» обозначает количество, эффективное в такой дозировке и в течение таких периодов времени, которые необходимы для достижения целевого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела против с-Met, может варьировать согласно таким факторам, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивидуума, а также способность антитела против с-Met, вызывать целевой ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой

такое количество, в котором терапевтически полезные эффекты превышают любые токсические или вредные эффекты антитела или части антитела.

«Идиотипическое» антитело представляет собой антитело, которое распознает уникальные детерминанты, как правило, ассоциированные с антигенсвязывающим сайтом антитела.

Дополнительные аспекты и воплощения изобретения

Как описано выше в первом аспекте, изобретение относится к моноклональному человеческому антителу, которое связывает человеческий c-Met.

Моноклональные антитела по настоящему изобретению могут быть получены гибридным методом, впервые описанным Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), или могут быть получены с использованием методов рекомбинантной ДНК. Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговой библиотеки антител с помощью методов, описанных например, в Clackson et al, Nature 352: 624-628 (1991) и в Marks et al, J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991). Моноклональные антитела могут быть получены из любого подходящего источника. Таким образом, моноклональные антитела могут быть получены из гибридом, приготовленных из мышиных В-клеток селезенки, полученных из мышей, иммунизированных с использованием антигена, представляющего интерес, например, в форме клеток, экспрессирующих на своей поверхности антиген, или в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген, представляющий интерес. Моноклональные антитела также могут быть получены из гибридом, выделенных из экспрессирующих антитело клеток иммунизированных людей или млекопитающих, отличных от человека, таких как крысы, собаки, приматы и т.д.

В одном воплощении, антитело по изобретению является человеческим антителом. Человеческие моноклональные антитела, направленные против c-Met, могут быть получены с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих в большей степени части человеческой иммунной системы, а не мышинной. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, обозначенных в данном документе как мыши HuMAb и мыши КМ, соответственно, и вместе обозначаются в данном документе как «трансгенные мыши».

Мышь HuMAb содержит минилокус человеческих иммуноглобулиновых генов, который кодирует последовательности тяжелой цепи (μ и γ) и легкой цепи к иммуноглобулинов, вместе с направленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы цепей μ и κ (Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)). Соответственно, мыши демонстрируют пониженную экспрессию мышинового IgM или κ и, в ответ на иммунизацию, введенные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепи

подвергаются переключению класса и соматическим мутациям с образованием высокоаффинных человеческих моноклональных антител IgG,κ (Lonberg, N. et al. (1994), выше; обзор в Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995) и Harding, F. and Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)). Получение мышей HuMAb подробно описано в Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993), Tuaillon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). См., также US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5789650, US 5877397, US 5661016, US 5814318, US 5874299, US 5770429, US 5545807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 и WO 01/09187.

Мыши HCo7 содержат нарушение JKD в своих эндогенных генах легкой цепи (каппа) (как описано в Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)), и нарушение CMD в своих эндогенных генах тяжелой цепи (как описано в примере 1 WO 01/14424), трансген KCo5 человеческой легкой цепи каппа (как описано в Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)), и трансген HCo7 человеческой тяжелой цепи (как описано в US 5770429).

Мыши HCo12 содержат нарушение JKD в своих эндогенных генах легкой цепи (каппа) (как описано в Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)), и нарушение CMD в своих эндогенных генах тяжелой цепи (как описано в примере 1 WO 01/14424), трансген KCo5 человеческой легкой цепи каппа (как описано в Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)), и трансген HCo12 человеческой тяжелой цепи (как описано в примере 2 WO 01/14424).

В линии мышей КМ гомозиготно нарушен эндогенный мышинный ген легкой цепи каппа, как описано в Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993), а также гомозиготно нарушен эндогенный мышинный ген тяжелой цепи, как описано в примере 1 WO 01/09187. Данная линия мышей несет трансген человеческой легкой цепи каппа, KCo5, как описано в Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Данная линия мышей также несет трансхромосому человеческой тяжелой цепи, состоящую из фрагмента hCF (SC20) хромосомы 14, как описано в WO 02/43478.

Спленоциты из этих трансгенных мышей можно использовать для получения гибридом, которые секретируют человеческие моноклональные антитела, согласно известным методам.

Кроме того, человеческие антитела по настоящему изобретению или антитела по настоящему изобретению из других видов могут быть идентифицированы посредством

методов дисплейного типа, включающих в частности фаговый дисплей, ретровирусный дисплей, рибосомный дисплей и другие методы, хорошо известный в данной области, и полученные в результате молекулы могут быть подвергнуты дополнительному созреванию, такому как созревание аффинности в качестве такого метода, хорошо известного в данной области (см., например, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (фаговый дисплей), Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996) (фаговый дисплей), Hanes and Plutchau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997) (рибосомный дисплей), Parmley and Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (фаговый дисплей), Scott TIBS 17, 241-245 (1992), Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990), Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993), Hogenboom et al., Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992), Chiswell and McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992), и US 5733743). Если для получения антител, которые не являются человеческими, применяются технологии дисплея, то такие антитела могут быть гуманизированы.

В одном воплощении, антитело по изобретению относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, или IgM.

В первом основном воплощении антитела по изобретению, антитело конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с иммобилизованным антителом, которое содержит область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:33, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:37 **(024)**, предпочтительно, где антитело конкурирует более чем за 50%, как например, более чем за 75% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определению, данному в примере 17.

В следующем воплощении, антитело не конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с антителом, выбранным из группы, состоящей из:

а) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:1, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:5 **(005)**

б) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:17, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:21 **(008)**

с) иммобилизованного антитела, содержащего область VH и область VL антитела **5D5**, и

д) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:49, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:53 **(045)**,

предпочтительно, где антитело конкурирует менее чем на 25%, как например,

менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определениям, данным в примере 17.

В следующем воплощении, анти тело связывается с тем же эпитопом, что и анти тело, выбранное из группы, состоящей из:

- a) анти тела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:33, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:37 **(024)**
- b) анти тела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:65, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:69 **(061)**
- c) анти тела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:73, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:77 **(062)**
- d) анти тела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:81, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:85 **(064)**
- e) анти тела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:89, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:93 **(068)**
- f) анти тела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:97, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:101 **(069)**
- g) анти тела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:113, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:117 **(098)**
- h) анти тела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:121, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:125 **(101)** и
- i) анти тела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:129, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:133 **(181).**

В следующем воплощении анти тело содержит область CDR3 из VH, имеющую последовательность, представленную в

- a) SEQ ID NO:36 **(024)**
- b) SEQ ID NO:193, как например, область CDR3 из VH, представленную в SEQ ID NO:68, 76, 84 или 92 **(061, 062, 064, 068)**
- c) SEQ ID NO:196, как например, область CDR3 из VH, представленную в SEQ ID NO:100 или 132 **(069, 181)**
- d) SEQ ID NO:116 **(098)**, или
- e) SEQ ID NO:201, как например, область CDR3 из VH, представленную в SEQ

ID NO:124 (101).В следующем воплощении антитело содержит:

а) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:34, 185 и 36, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:38, 39 и 206, как например, антитело, которое содержит область VH, включающую последовательности SEQ ID NO:34, 35 и 36, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:38, 39 и 40, (024)

б) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:191, 192 и 193, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:78, 79 и 208, как например, антитело, включающее

а. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:66, 67 и 68, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:70, 71 и 72, (061)

б. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:74, 75 и 76, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:78, 79 и 80, (062)

с. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:82, 83 и 84, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:86, 87 и 88, (064)

д. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:90, 91 и 92, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:94, 95 и 96, (068)

с) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:194, 195 и 196, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:209, 210 и 104, как например, антитело, включающее

а. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:98, 99 и 100, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:102, 103 и 104, (069), или

б. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:130, 131 и 132, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:134, 135 и 136, (181)

д) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:197, 198 и 116, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:118, 119 и 211, как например, антитело, которое содержит область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:114, 115 и 116, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:117, 118 и 120, (098) или

е) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 199, 200 и 201 и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 126, 212 и 128, как например, антитело, которое содержит область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 122, 123 и 124 и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:126, 127 и 128 **(101)**.

В следующем воплощении антитело содержит:

- а) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:33, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:37 **(024)**
- б) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:61, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:69 **(061)**
- в) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:73, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:77 **(062)**
- г) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:81, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:85 **(064)**
- е) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:89, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:93 **(068)**
- ф) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:97, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:101 **(069)**
- г) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:113, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:117 **(098)**
- д) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:121, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:125 **(101)**
- и) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:129, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:133 **(181)**
- ж) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:159 и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:160 **(078)**
- з) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:161, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:162 **(084)**
- й) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:163, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:164 **(063)**
- м) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:165, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:166 **(087)**
- н) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:137, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:138 **(066)**
- о) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:139, и,

предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:140 **(065)**

р) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:141, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:142 **(082)**

q) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:143, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:144 **(089)**, или

г) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант предпочтительно содержит по большей мере 1, 2 или 3 аминокислотных модификации, более предпочтительно, аминокислотные замены, например, консервативные аминокислотные замены в указанных последовательностях.

В одном воплощении антитело содержит область VH, включающую CDR3-последовательность SEQ ID NO:100, и область VL, включающую CDR3-последовательность SEQ ID NO:104 **(069)**.

В одном воплощении антитело содержит область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:98, 99 и 100, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:102, 103 и 104, **(069)**.

В одном воплощении антитело содержит область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:97, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:101 **(069)**.

В другом основном воплощении антитело по изобретению:

- конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с иммобилизованным антителом, где указанное иммобилизованное антитело содержит область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:9, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:13 **(006)**, предпочтительно, где антитело конкурирует более чем на 50%, как например, более чем на 75% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определению, данному в примере 17,

и

- не конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с иммобилизованным антителом, содержащим область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:49, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:53 **(045)**, предпочтительно, где антитело конкурирует менее чем на 50%, например, менее чем на 25%, например, менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определению, данному в примере 17,

и

- связывает домен SEMA из -Met, предпочтительно, где антитело способно

ингибировать связывание HGF с доменом SEMA с IC50, составляющей менее чем 10 мкг/мл, например, менее чем 2 мкг/мл, как описано в примере 9.

В следующем воплощении, антитело не конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с иммобилизованным антителом, содержащим область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:33, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:37 **(024)**, предпочтительно, где антитело конкурирует менее чем на 25%, например, менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определению, данному в примере 17.

В следующем воплощении, антитело связывает тот же эпитоп, что и антитело, выбранное из группы, состоящей из:

- а) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:1, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:5 **(005)**
- б) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:9, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:13 **(006)**
- с) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:25, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:29 **(022)**, и
- д) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:57, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:61 **(058)**.

В следующем воплощении, антитело содержит область CDR3 из VH, имеющую последовательность, представленную в

- а) SEQ ID NO:181, как например, область CDR3 из VH, представленную в SEQ ID NO:4 или 12 **(005, 006)**
- б) SEQ ID NO:28 **(022)**, или
- с) SEQ ID NO:60 **(058)**.

В следующем воплощении антитело содержит:

- а) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:179, 180 и 181, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:6, 7 и 202, как например, антитело, содержащее
 - а. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:3, 4 и 3, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:6, 7 и 8, **(005)**, или
 - б. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:10, 11 и 12, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:14, 15 и 16, **(006)**
 - б) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:26,

184 и 28, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:30, 31 и 205, как например, антитело, содержащее область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:26, 27 и 28, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:30, 31 и 32 **(62)**, или

с) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 189, 190 и 60, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 62, 63 и 207, например, антитело, содержащее область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:58, 59 и 60, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:62, 63 и 64 **(058)**.

В следующем воплощении, антитело содержит:

а) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:1, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:5 **(005)**

б) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:9, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:13 **(006)**

с) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:25, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:29 **(022)**

д) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:57, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:61 **(058)**

е) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:145, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:146 **(031)**

ф) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:147, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:148 **(007)**

г) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:149, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:150 **(011)**

h) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:151, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:152 **(017)**

и) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:153, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:154 **(025)**, или

ж) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант содержит, по большей мере, 1, 2 или 3 аминокислотных модификации, более предпочтительно, аминокислотные замены, например, консервативные аминокислотные замены в указанных последовательностях.

В другом основном воплощении антитело по изобретению:

- конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с иммобилизованным

антителом, где указанное иммобилизованное антитело содержит область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:49, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:53 (045), предпочтительно, где антитело конкурирует более чем на 50%, например, более чем на 75% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определению, данному в примере 17,

и

- антитело не конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с иммобилизованным антителом, где указанное иммобилизованное антитело содержит область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:9, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:13 (006), предпочтительно, где антитело конкурирует менее чем на 25%, как например, менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определению, данному в примере 17.

В следующем воплощении антитело не конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с антителом, выбранным из группы, состоящей из:

а) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:17, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:21 (008), и

б) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:33, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:37 (024),

предпочтительно, где антитело конкурирует менее чем на 25%, например, менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определениям, данным в примере 17.

В следующем воплощении антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:49, и включающее область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:53 (045).

В следующем воплощении, антитело содержит область CDR3 из VH, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, например, область CDR3 из VH, представленную в SEQ ID NO:52 (045).

В следующем воплощении антитело содержит область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:186, 187 и 188, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO:54, 55 и 56, например, антитело, содержащее область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO:50, 51 и 52, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:54, 55 и 56, (045).

В следующем воплощении антитело содержит:

а) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:49, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:53 **(045)**

б) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:155, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:156 **(040)**

с) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:157, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:158 **(039)**, или

д) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант, предпочтительно, содержит, по большей мере, 1, 2 или 3 аминокислотных модификации, более предпочтительно, аминокислотных замены, таких как консервативные аминокислотные замены в указанных последовательностях.

В следующем воплощении антитело связывается с доменом SEMA из с-Met, предпочтительно, если антитело способно ингибировать связывание HGF с доменом SEMA с IC50, составляющей менее чем 10 мкг/мл, например, менее чем 2 мкг/мл, как описано в примере 9.

В другом основном воплощении антитела по изобретению, антитело связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:17, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:21 **(008)** или связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:41, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:45 **(035)**, или связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:105, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:109 **(096)**.

В следующем воплощении антитело содержит область CDR3 из VH, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO:183, например, область CDR3 из VH, представленную в SEQ ID NO:20, 44 или 108 **(008, 035, 096)**.

В следующем воплощении антитело содержит область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:18, 182 и 183, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:22, 203 и 204, например, антитело, содержащее

а) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:18, 19 и 20, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:22, 23 и 24, **(008)**,

б) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:42, 43 и 44, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:46, 47 и 48,

(035),

с) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:106, 107 и 108, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:110, 111 и 112, (096).

В другом воплощении антитело содержит:

а) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:17, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:21 (008)

б) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:41, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:45 (035)

с) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:105, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:109 (096)

или

д) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант, предпочтительно, содержит, по большей мере, 1, 2 или 3 аминокислотных модификации, более предпочтительно, аминокислотных замены, таких как консервативные аминокислотные замены в указанных последовательностях.

В следующем воплощении, антитело связывается с клетками A431 с EC50, составляющей 10 нМ или менее, как например, с EC50 равной 2 нМ или менее, предпочтительно, как определено согласно примеру 13.

В следующем воплощении, антитело связывается с с-Met с константой аффинности (K_D), составляющей 20 нМ или менее, например, 5 нМ или менее, предпочтительно, как определено согласно примеру 14.

В следующем воплощении, антитело связывается с с-Met макаки-резус, предпочтительно, если сигнал связывания антитела с с-Met макаки-резус, по меньшей мере, в 5 раз превышает сигнал для антитела отрицательного контроля, как определено согласно примеру 15.

В следующем воплощении, антитело ингибирует связывание HGF с внеклеточным доменом с-Met, предпочтительно, если антитело ингибирует связывание более чем на 40%, как например, более чем на 50%, например, более чем на 60%, например, более чем на 70%, например, более чем на 80%, например, более чем на 90%, как определено согласно примеру 16.

Еще в одном воплощении, антитело способно ингибировать жизнеспособность клеток КР4, предпочтительно, если антитело способно ингибировать жизнеспособность более чем на 10%, например, более чем на 25%, например, более чем на 40%, предпочтительно, как описано в примере 19.

Форматы антител

В настоящем изобретении предлагаются антагонистические и неантагонистические антитела, связывающие с-Met. Поскольку некоторые антитела действуют антагонистически на клетки-мишени независимо от того, моновалентны они или бивалентны, для других антител при этом функциональный эффект зависит от валентности. Как представлено в примере 19 в данном документе, антитела 024, 062, 064, 068, 069, 098, 101, 181 (которые все находятся в одной и той же группе перекрестной блокировки, см. пример 17), например, демонстрируют антагонистические свойства в анализе жизнеспособности клеток КР4 независимо от их формата. Антитела 022 и 058, с другой стороны, ведут себя антагонистично в данном анализе в моновалентном формате, но агонистично (или, по меньшей мере, не антагонистично) в бивалентном формате. Таким образом, в зависимости от искомым функциональных свойств для конкретного использования, конкретные антитела могут быть выбраны из набора антител, предлагаемых в настоящем изобретении и/или их формат может быть адаптирован путем изменения валентности.

Более того, антитело изобретения может быть антителом любого изотипа. При выборе изотипа, как правило, будут руководствоваться искомыми эффекторными функциями, такими как индукция ADCC. Примерами изотипов являются IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Может быть использована одна из двух константных областей человеческой легкой цепи, каппа или лямбда. При необходимости класс антитела против с-Met настоящего изобретения может быть изменен известными способами. Например, антитело настоящего изобретения, которое изначально было IgM, может быть изменено на класс антитела IgG настоящего изобретения. Кроме того, методы изменения класса могут быть использованы для конвертации одного подкласса IgG в другой, например, с IgG1 на IgG2. Таким образом, эффекторные функции антител настоящего изобретения могут быть изменены при смене изотипа, например, на антитело IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM для различных терапевтических применений. В одном воплощении антитело настоящего изобретения является антителом IgG1, например, IgG1,κ.

Отрицательная модуляция, индуцированная антагонистичными антителами, представляет собой механизм действия терапевтических антител против с-Met. Соответственно, в одном аспекте изобретения искомыми являются антитела с пониженными агонистическими свойствами, но с сохранившейся способностью индуцировать отрицательную модуляцию с-Met.

Было обнаружено, что при пониженной конформационной гибкости антител потенциальная остаточная агонистическая активность бивалентных IgG1 антител

минимизирована.

Соответственно, в одном воплощении, антитело изобретения было модифицировано так, чтобы сделать его менее гибким, например, посредством мутаций в шарнирной области.

Наибольшие конформационные изменения являются результатом гибкости шарнира, благодаря которой доступен широкий диапазон углов Fab-Fc (Ollmann Saphire, E., R.L. Stanfield, M.D.M. Crispin, P.W.H.I. Parren, P.M. Rudd, R.A. Dwek, D.R. Burton and I.A. Wilson. 2002. Contrasting IgG structures reveal extreme asymmetry and flexibility. *J. Mol. Biol.* 319: 9-18). Один из путей уменьшения гибкости Fab-плеча в иммуноглобулинах заключается в предотвращении образования дисульфидных связей между легкой и тяжелой цепью посредством генетической модификации. В естественном антителе IgG1 легкая цепь соединена с тяжелой цепью ковалентно через дисульфидную связь, соединяющую С-концевой цистеин легкой цепи с цистеином в позиции 220 (C220 EU нумерации) в шарнире Fc тяжелой цепи. Либо путем мутации аминокислоты C220 в серин либо любую другую естественную аминокислоту, либо удалением C220, либо путем полного удаления шарнира, либо путем замены шарнира IgG1 на шарнир IgG3, образуется молекула, в которой легкие цепи соединены через их С-концевые цистеины, аналогично ситуации, обнаруженной в человеческом изоците IgA2m(1). Это приводит к снижению гибкости Fab относительно Fc и, следовательно, уменьшает способность к перекрестному связыванию, как показано в примерах.

Другая стратегия уменьшения гибкости молекулы IgG1 заключается в замене шарнира IgG1 на шарнир IgG2 или IgG2-подобный шарнир (Dangl et al. *EMBO J.* 1988;7:1989-94). Данная шарнирная область имеет два свойства, отличные от свойств шарнира IgG1, которые, как считается, делают молекулу менее гибкой. Во-первых, по сравнению с шарниром IgG1 шарнир IgG2 на 3 аминокислоты короче. Во-вторых, шарнир IgG2 содержит дополнительный цистеин, таким образом, образуется три, вместо двух, дисульфидных мостика внутри тяжелой цепи. В ином случае, может быть введен вариант шарнира IgG1, который имеет сходство с шарниром IgG2. Этот мутант (TH7A6-9) (WO2010063746) содержит мутацию T223C и две делеции (K222 и T225) для образования более короткого шарнира с дополнительным цистеином.

В следующем воплощении антитело изобретения является подтипом IgG1, в котором область шарнира была модифицирована путем:

(i) удаления шарнирной области с последовательностью EPKSCDKTHTCPPCP и ее замены на шарнирную область IgG2 с последовательностью: ERKCCVECPPCP (IgG1 Шарнир-IgG2);

(ii) удаления в положении 220, так чтобы модифицированная шарнирная область содержала последовательность EPKSDKTHTCPPCP (IgG1 Δ C220);

(iii) замены цистеина в положении 220 на любую другую естественную аминокислоту (X) так, чтобы модифицированная шарнирная область содержала последовательность EPKSXDKTHTCPPCP (IgG1 C220X);

(iv) удаления шарнирной области с последовательностью EPKSCDKTHTCPPCP (UniBody IgG1);

(v) удаления шарнирной области с последовательностью EPKSCDKTHTCPPCP и ее замены на шарнирную область IgG3 с последовательностью

ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP (IgG1 Шарнир-IgG3); или

(vi) замены треонина в положении 223 на цистеин и удаления лизина в положении 222 и треонина в положении 225, так чтобы модифицированная шарнирная область содержала последовательность EPKSCDCHCPPCP (IgG1 TH7 Δ 6-9).

В одном воплощении изобретения антитело изобретения имеет подтип IgG1, в котором область шарнира была модифицирована удалением в позиции 220 таким образом, чтобы модифицированная область шарнира имела последовательность EPKSDKTHTCPPCP (IgG1 Δ C220) или заменой цистеина в позиции 220 на любую другую естественную аминокислоту (X), так чтобы модифицированная область шарнира имела последовательность EPKSXDKTHTCPPCP (IgG1 C220X);

В следующем воплощении антитело изобретения имеет подтип IgG1, в котором область шарнира была модифицирована заменой цистеина в позиции 220 на серин, так чтобы модифицированная область шарнира имела последовательность EPKSSDKTHTCPPCP (IgG1 C220S).

В следующем воплощении антитело изобретения имеет подтип IgG2.

В следующем воплощении в антителе изобретения модифицированы сахара для уменьшения количества фукозы и, таким образом, для усиления ADCC, например, путем добавления соединений в культуральную среду в ходе выработки антител, как описано в US2009317869 или как описано в van Berkel et al (2010) Biotechnol. Bioeng. 105:350 или с помощью нокаутных по FUT8 клеток, например, как описано в Yamane-Ohnuki et al (2004) Biotechnol. Bioeng 87:614. В ином случае ADCC может быть оптимизировано с помощью способа, описанного Umana et al. (1999) Nature Biotech 17:176.

В одном воплощении антитело содержит область VH, включающую CDR3-последовательность, SEQ ID NO:100, и область VL, включающую CDR3-последовательность, SEQ ID NO: 104 (069), подтипа IgG1, в котором область шарнира

была модифицирована заменой цистеина в позиции 220 на серин, так чтобы модифицированная шарнирная область имела последовательность EPKSSDKTHTCPPCP (IgG1 C220S).

В одном воплощении антитело содержит область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO:98, 99 и 100 и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO:102, 103 и 104 (069) подтипа IgG1, в котором область шарнира была модифицирована заменой цистеина в позиции 220 на серин, так чтобы модифицированная шарнирная область имела последовательность EPKSSDKTHTCPPCP (IgG1 C220S).

В одном воплощении антитело содержит область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:97 и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:101 (069) подтипа IgG1, в котором область шарнира была модифицирована заменой цистеина в позиции 220 на серин, так чтобы модифицированная шарнирная область имела последовательность EPKSSDKTHTCPPCP (IgG1 C220S).

В различных публикациях продемонстрирована корреляция между сниженным фукозилированием кора и повышенной активностью ADCC *in vitro* (Shields RL. 2002 JBC; 277:26733-26740, Shinkawa T. 2003 JBC; 278(5):3466-3473, Umana P. Nat Biotechnol. 1999 Feb;17(2):176-80).

В следующем воплощении антитело изобретения было модифицировано для уменьшения фукозилирования кора ниже 10%, например, ниже 5%, что определяется с помощью высокоэффективной анионообменной хроматографии вместе с импульсным амперометрическим детектированием (HPLC-PAD). Данная проверка может быть осуществлена хорошо известными в предшествующем уровне техники способами, например, обработкой кифуназином или получением клеток, отрицательных по FUT8.

В другом воплощении антитело изобретения было сконструировано для усиления активации комплемента, например, как описано в Natsume et al. (2009) Cancer Sci. 100:2411.

В одном воплощении антитело изобретения является полноразмерным, предпочтительно антителом IgG1, в частности, антителом IgG1,κ. В другом воплощении антитело изобретения является фрагментом антитела или одноцепочечным антителом.

Фрагменты антител могут быть получены, например, фрагментацией обычными методами, и фрагменты подвергаются скринингу таким же образом, как описано в данном документе для целых антител. Например, фрагменты F(ab')₂ могут быть получены путем обработки антитела пепсином. Полученный фрагмент F(ab')₂ может быть обработан для уменьшения дисульфидных мостиков для получения фрагментов Fab'. Фрагменты Fab

могут быть получены путем обработки антитела IgG папаином; Фрагменты Fab' могут быть получены расщеплением пепсином антитела IgG. Фрагмент F(ab') также может быть получен связыванием Fab', описанным ниже через тиоэфирную связь или дисульфидную связь. Фрагмент Fab' является фрагментом антитела, полученным расщеплением дисульфидной связи области шарнира F(ab')₂. Фрагмент Fab' может быть получен обработкой фрагмента F(ab')₂ восстанавливающим агентом, таким как дитиотреитол. Фрагмент антитела также может быть получен экспрессией нуклеиновых кислот, кодирующих такие фрагменты в рекомбинантных клетках (см., например, Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)). Например, химерный ген, кодирующий часть фрагмента F(ab')₂, может включать последовательности ДНК, кодирующие домен C_{H1} и область шарнира Н-цепи, после которых следует кодон остановки трансляции с получением таким образом молекулы фрагмента укороченного антитела.

Как указано выше, в одном воплощении антитело изобретения против с-Met является бивалентным антителом.

В одном воплощении антитело изобретения против с-Met является моновалентным антителом.

В одном воплощении антитело изобретения является фрагментом Fab или одноплечевым антителом таким, как описанное в US20080063641 (Genentech) или другим моновалентным антителом, например, таким, как описано в WO2007048037 (Amgen).

В предпочтительном воплощении, моновалентное антитело имеет структуру, описанную в WO2007059782 (Genmab) (который включен в данный документ ссылкой), имеющую делецию в области шарнира. Соответственно, в одном воплощении антитело является моновалентным антителом, где указанное антитело против с-Met сконструировано способом, включающим:

i) обеспечение нуклеотидного конструкта, кодирующего легкую цепь указанного моновалентного антитела, причем указанный конструкт содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую область VL выбранного антигенспецифического антитела против с-Met, и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область (CL) Ig, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая область VL выбранного антигенспецифического антитела, и указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая область CL Ig, функционально связаны друг с другом, и где в случае подтипа IgG1, нуклеотидная последовательность кодирующая область CL, была модифицирована так, чтобы область CL не содержала аминокислот, способных образовывать дисульфидные связи или ковалентные связи с другими пептидами, содержащими идентичную области CL

аминокислотную последовательность в присутствии поликлонального человеческого IgG или при введении животному или человеку;

ii) обеспечение нуклеотидного конструкта, кодирующего тяжелую цепь указанного моновалентного антитела, причем указанный конструкт содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую область VH выбранного антигенспецифического антитела, и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область Сн человеческого Ig, где нуклеотидная последовательность, кодирующая область СН модифицирована таким образом, чтобы область, соответствующая шарнирной области и, как требует подтип Ig, другие области СН, такие как область СН3, не содержала каких-либо аминокислотных остатков, которые принимают участие в образовании дисульфидных связей или ковалентных или устойчивых нековалентных межцепных связей тяжелой цепи с другими пептидами, содержащими аминокислотную последовательность идентичную константной области Сн человеческого Ig, в присутствии поликлонального человеческого IgG или при введении человеческому существу, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая область VH выбранного антигенспецифического антитела, и указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая область Сн указанного Ig, функционально связаны друг с другом;

iii) обеспечение клеточной экспрессирующей системы для получения указанного моновалентного антитела;

iv) получение указанного моновалентного антитела коэкспрессией нуклеотидных конструкций (i) и (ii) в клетках клеточной экспрессирующей системы (iii).

Подобным образом, в одном воплощении антитело против с-Met является моновалентным антителом, которое содержит

(i) вариабельную область антитела изобретения, как описано в данном документе или антигенсвязывающую часть указанной области, и

(ii) область С_Н иммуноглобулина или ее фрагмент, включающий участки С_Н2 и С_Н3, где область С_Н или ее фрагмент модифицированы так, чтобы область, соответствующая шарнирному участку, и, если иммуноглобулин не относится к изотипу IgG4, другие участки С_Н, такие как С_Н3, не несли никаких аминокислотных остатков, которые были бы не способны образовывать дисульфидные связи с идентичным участком С_Н или не способны образовывать другие ковалентные или стабильные нековалентные связи между тяжелыми цепями с идентичным участком С_Н в присутствии поликлонального человеческого IgG.

В следующем воплощении, тяжелая цепь моновалентного антитела против с-Met

была модифицирована таким образом, чтобы цельный шарнир был удален.

В другом дополнительном воплощении, указанное моновалентное антитело является подтипом IgG4, но область C_H3 была модифицирована так, чтобы одна или несколько следующих аминокислотных замен были внесены:

Нумерация мутаций CH3

КАВАТ*	EU индекс G4*	Мутации
E378	E357	E357A или E357T или E357V или E357I
S387	S364	S364R или S364K
T389	T366	T366A или T366R или T366K или T366N
L391	L368	L368A или L368V или L368E или L368G или L368S или L368T
D427	D399	D399A или D399T или D399S F405A или F405L или F405T или F405D или F405R или F405Q
F436	F405	или F405K или F405Y
Y438	Y407	Y407A или Y407E или Y407Q или Y407K или Y407F
F436 и Y438	F405 и Y407	(F405T и Y407E) или (F405D и Y407E) (D399S и Y407Q) или (D399S и Y407K) или (D399S и Y407E)
D427 и Y438	D399 и Y407	и Y407E)

*КАВАТ указывает на нумерацию аминокислот согласно Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). EU индекс указывает на нумерацию аминокислот согласно EU индексу как изложено в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

В следующем воплощении последовательность указанного моновалентного антитела была модифицирована таким образом, чтобы оно не содержало каких-либо акцепторных сайтов для N-связанного гликозилирования.

Антитела изобретения против c-Met также включают одноцепочечные антитела. Одноцепочечные антитела являются пептидами, в которых области Fv тяжелой и легкой цепей соединены. В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается одноцепочечная Fv (scFv) в которой тяжелая и легкая цепи в Fv антитела против c-Met настоящего изобретения объединены с гибким пептидным линкером (как правило около 10, 12, 15 или большего количества аминокислотных остатков) в одноцепочечном пептиде. Способы получения таких антител описаны, например, в US 4,946,778, Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), Bird et al., *Science* 242, 423-426 (1988), Huston et al., *PNAS USA* 5879, 5883-1988 (85) and McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554 (1990). Одноцепочечное антитело может быть моновалентным, если используют один тип V_H and

V_L , бивалентным если два типа V_H и V_L используют, или поливалентным, если используют больше двух типов V_H и V_L .

В одном воплощении антитело изобретения против с-Met является антителом с дефицитом эффекторной функции. В одном воплощении антитело против с-Met с дефицитом эффекторной функции является стабилизированным антителом IgG4, которое было модифицировано для предотвращения замены Fab-плеча (van der Neut Kolfschoten et al. (2007) Science 317(5844): 1554-7). Примерами подходящих стабилизированных антител IgG4 являются антитела, в которых аргинин в положении 409 в константной области тяжелой цепи человеческого IgG4, который указан по индексу EU как и в Kabat et al., заменен на лизин, треонин, метионин или лейцин, предпочтительно лизин (описанный в WO2006033386 (Kirin)) и/или где область шарнира была модифицирована так, чтобы она содержала последовательность Cys-Pro-Pro-Cys.

В другом воплощении стабилизированное IgG4 антитело против с-Met является антителом, содержащим тяжелую и легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит константную область человеческого IgG4, имеющую остаток, выбранный из группы, состоящей из Lys, Ala, Thr, Met и Leu в позиции, соответствующей 409 и/или остаток выбирают из группы, состоящей из: Ala, Val, Gly, Ile и Leu в позиции, соответствующей 405, и где указанное антитело необязательно включает одну или несколько дополнительных замен, делеций и/или вставок, и где указанное антитело содержит последовательность Cys-Pro-Pro-Cys в области шарнира. Предпочтительно, если указанное антитело содержит остаток Lys или Ala в позиции, соответствующей 409 или область CH3 антитела заменена на область CH3 человеческого IgG1, или человеческого IgG2 или человеческого IgG3. См. также WO2008145142 (Genmab).

В еще одном воплощении, стабилизированное IgG4 антитело против с-Met является антителом, содержащим тяжелую и легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит константную область человеческого IgG4, имеющую остаток, выбранный из группы, состоящей из Lys, Ala, Thr, Met и Leu в позиции, соответствующей 409 и/или остаток выбирают из группы, состоящей из: Ala, Val, Gly, Ile и Leu в позиции, соответствующей 405, и где указанное антитело необязательно включает одну или несколько дополнительных замен, делеций и/или вставок и где указанное антитело содержит последовательность Cys-Pro-Pro-Cys в области шарнира. Предпочтительно, если указанное антитело содержит остаток Lys или Ala в позиции, соответствующей 409 или область CH3 антитела заменена на область CH3 человеческого IgG1, или человеческого IgG2 или человеческого IgG3.

В следующем воплощении антитело против с-Met с дефицитом эффекторной

функции является антителом не IgG4 типа, например, IgG1, IgG2 или IgG3, которые были мутированы таким образом, чтобы способность опосредовать эффекторные функции, такие как ADCC, была снижена или даже устранена. Такие мутации описаны, например, у Dall'Acqua WF et al., J Immunol. 177(21:1129-1138 (2006) and Hezareh M, J Virol. ;75(24): 12161-12168 (2001).

Конъюгаты

В следующем воплощении в настоящем изобретении предлагается антитело против c-Met, конъюгированное с терапевтической составляющей, такой как цитотоксин, химиотерапевтическое лекарственное средство, иммуносупрессант или радиоизотоп. Такие конъюгаты называются в данном документе «иммуноконъюгатами». Иммуноконъюгаты, которые включают один или большее количество цитотоксинов называются «иммунотоксинами».

Цитотоксин или цитотоксический агент включает любой агент, который отрицательно сказывается на клетках (например, убивает их). Подходящие терапевтические агенты для формирования иммуноконъюгатов настоящего изобретения, включают таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидрокси-антрацин-дион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, декарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, гемцитабин, кладрибин), алкилирующие агенты (такие, как мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфамид, дибромоманнит, стрептозотоцин, дакарбазин (DTIC), прокарбазин, митомицин С, цисплатин и другие производные платины, такие как карбоплатин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, даунорубицин (ранее дауномицин), доксорубицин, идарубицин, митрамицин, митомицин, митоксантрон, пликамицин, антрамицин (АМС)), токсин дифтерии и связанные с ними молекулы (такие как цепь дифтерии А и их активные фрагменты и гибридные молекулы), токсин рицин (например, рицин или дегликозилированная цепь А рицина), холерный токсин, шигатоксин-подобный токсин (SLT-I, SLT-II, SLT-IV), LT токсин, СЗ токсин, шигатоксин, коклюшный токсин, столбнячный токсин, соевый ингибитор протеазы Баумана-Бирка, экзотоксин *Pseudomonas*, алорин, сапорин, модецин, геланин, цепь абрина А, цепь моддецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, и PAP-S), ингибитор *Momordica Charantia*, курцин,

кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, и эномицин. Другие подходящие конъюгированные молекулы включают рибонуклеазу (РНКазу), ДНКазу I, стафилококковый энтеротоксин-A, антивирусный белок лаконоса, дифтерийный токсин и эндотоксин псевдомонас. См., например, Pastan et al., Cell 47, 641 (1986) and Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994). Терапевтические агенты, которые могут быть введены в комбинации с антителом настоящего изобретения против c-Met, как описано где либо еще в данном документе, также могут быть кандидатами для терапевтических составляющих, применимых при конъюгации антитела настоящего изобретения.

В другом воплощении антитело против c-Met изобретения включает конъюгированную нуклеиновую кислоту или молекулу, ассоциированную с нуклеиновой кислотой. В одном из таких аспектов настоящего изобретения, конъюгированной нуклеиновой кислотой является цитотоксическая рибонуклеаза, антисмысловая нуклеиновая кислота, ингибирующая молекула РНК (например, молекула миРНК) или иммуностимулирующая нуклеиновая кислота (например, молекула ДНК, содержащая иммуностимулирующий CpG-мотив). В другом воплощении, антитело против c-Met изобретения конъюгировано с аптамером или рибозимом.

В одном воплощении предлагаются антитела против c-Met, содержащие одну или несколько радиоактивно меченных аминокислот. Радиоактивно меченное антитело против c-Met может быть использовано как в диагностических так и терапевтических целях (конъюгация с радиоактивно мечеными молекулами является другой возможной особенностью). Неограничивающие примеры меток для полипептидов включают ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , и ^{125}I , ^{131}I и ^{186}Re .

Антитела против c-Met также могут быть химически модифицированы ковалентной конъюгацией с полимером, например, для увеличения их периода полужизни в кровотоке. Примерные полимеры и способы прикрепления их к полипептидам, иллюстрированы например, в US 4,766,106, US 4,179,337, US 4,495,285 и US 4,609,546. Дополнительные полимеры включают полиоксиэтилированные полиолы и полиэтиленгликоль (ПЭГ) (например, ПЭГ с молекулярной массой от около 1000 до около 40 000, например, от около 2000 до около 20 000).

Для конъюгирования антитела против c-Met с конъюгируемой молекулой(ами), такой как те, что описаны выше, может быть использован любой способ, известный в данной области, включая способы, описанные Hunter et al., Nature 144, 945 (1962), David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974), Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981) and Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982). Такие антитела могут быть получены

химическим конъюгированием другой составляющей с N-концевой стороной или C-концевой стороной антитела против с-Met или его фрагмента (например, H- или L-цепи антитела против с-Met) (см., например, *Antibody Engineering Handbook*, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan (1994)). Такие производные конъюгированного антитела могут быть получены конъюгацией внутренних остатков или сахаров, где это необходимо. Агенты могут быть спарены либо напрямую, либо не напрямую с антителом против с-Met настоящего изобретения. Одним примером непрямого спаривания со вторым агентом является спаривание посредством спейсера. В одном воплощении, антитело против с-Met настоящего изобретения прикрепляется к хелатору-линкеру, например, тиукситану, который позволяет антителу быть конъюгированным с радиоизотопом.

Биспецифические антитела

В дополнительном аспекте, изобретение относится к биспецифической молекуле, содержащей первый антигенсвязывающий участок из антитела изобретения против с-Met, как описано в данном документе выше, и второй антигенсвязывающий участок, с различной связывающей специфичностью, такой как связывающая специфичность к человеческой эффекторной клетке, человеческому Fc-рецептору, Т-клеточному рецептору, В-клеточному рецептору или связывающей специфичностью к неперекрывающемуся эпитопу с-Met, т.е. биспецифическому антителу в котором первый и второй антигенсвязывающие участки не конкурируют за связывание с с-Met, например, биспецифическое антитело, в котором первый и второй антигенсвязывающие участки не конкурируют за связывание с с-Met, например, при тестировании, описанном в примере 17.

Примерные молекулы биспецифических антител изобретения включают (i) два антитела, одно со специфичностью к с-Met, а второе со специфичностью ко второй мишени, которые конъюгированы вместе, (ii) одиночное антитело, которое имеет одну цепь или плечо, специфичное к с-Met, и вторую цепь или плечо, специфичное ко второй молекуле, и (iii) одноцепочечное антитело, которое имеет специфичность к с-Met и ко второй молекуле. В одном воплощении вторая молекула является антигеном злокачественного новообразования /опухолевым антигеном, таким как онкоэмбриональный антиген (CEA), простатоспецифический антиген (PSA), RAGE (почечный антиген), а-фетопротеин, CAMEL (CTL-распознаваемый антиген меланомы), CT антигены (такие как MAGE-B5, -B6, -C2, -C3 и D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSX-2, GAGE, BAGE, MAGE, and SAGE), муциновые антигена (например, MUC1, муцин-CA125, и т.п.), ганглиозидные антигены, тирозиназы, gp75, C-мус, Marti, MelanA, MUM-1, MUM-2, MUM-3, HLA-B7, Еp-CAM или интегрин, ассоциированный с злокачественным

новообразованием, такой как $\alpha 5\beta 3$ интегрин. В другом воплощении, вторая молекула является ангиогенным фактором или другим ассоциированным со злокачественными новообразованиями фактором роста, таким как фактор роста эндотелия сосудов, фактор роста фибробластов, эпидермальный фактор роста, ангиогенин или рецептор любого из них, особенно рецепторы, ассоциированные с прогрессией злокачественных новообразований (например, один из рецепторов HER1-HER4). В одном воплощении биспецифическое антитело настоящего изобретения является диателом.

Нуклеотидные последовательности, вектора и клетки-хозяева

В дополнительном аспекте изобретение относится к нуклеотидным последовательностям, таким как последовательности ДНК, кодирующим тяжелую и легкую цепи антитела изобретения.

В одном воплощении последовательность нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177 и 178.

В другом конкретном воплощении, последовательность нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность VH, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97, 105, 113, 121, 129, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175 и 177.

В другом конкретном воплощении, последовательность нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность VL, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37, 45, 53, 61, 69, 77, 85, 93, 101, 109, 117, 125, 133, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176 и 178.

В следующем аспекте изобретение относится к экспрессирующему вектору, или набору экспрессирующих векторов, кодирующих антитело по изобретению. Тяжелая или легкая цепь антитела может быть закодирована тем же самым вектором или другим вектором.

Такие экспрессирующие вектора могут быть использованы для рекомбинантного продуцирования антител изобретения.

В одном воплощении экспрессирующий вектор изобретения содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113, 117,

121, 125, 129, 133, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177 и 178.

В другом конкретном воплощении экспрессирующий вектор изобретения содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей VH, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97, 105, 113, 121, 129, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175 и 177.

В другом конкретном воплощении экспрессирующий вектор изобретения содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей VL, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37, 45, 53, 61, 69, 77, 85, 93, 101, 109, 117, 125, 133, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176 и 178.

В следующем воплощении экспрессирующий вектор дополнительно включает нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область легкой цепи, тяжелой цепи или и легкой, и тяжелой цепей антитела, например, человеческого антитела.

Экспрессирующий вектор в контексте настоящего изобретения может быть любым подходящим вектором, включая хромосомный, нехромосомный и синтетический нуклеотидный векторы (нуклеотидная последовательность, содержащая набор элементов контроля экспрессии). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирусы, дрожжевые плазмиды, векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, и векторы на основе вирусных нуклеиновых кислот (РНК или ДНК). В одном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против с-Met, содержит «голый» ДНК или РНК вектор, включая, например, линейный экспрессирующий элемент (как описано, например, у Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)), упакованный нуклеотидный вектор (как описано, например, в US 6,077, 835 и/или WO 00/70087), плазмидный вектор, такой как pBR322, pUC 19/18, или pUC 118/119, нуклеотидный вектор минимального размера «midge» (как описано, например, в Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)), или преципитированный нуклеотидный вектор-конструкт, например, конструкт, преципитированный CaPO₄ (как описано, например, в WO 00/46147, Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., Cell 14, 725 (1978), и Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)). Такие нуклеотидные векторы и их применения хорошо известны в данной области (см. например, US 5,589,466 и US 5,973,972).

В одном воплощении, вектор подходит для экспрессии антитела против с-Мус в бактериальной клетке. Примеры таких векторов включают экспрессирующие векторы, такие как BlueScript (Stratagene), векторы pIN (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989), векторы pET (Novagen, Мэдисон, Висконсин) и т.п.).

Экспрессирующий вектор также может или в ином случае является вектором, подходящим для экспрессии в дрожжевой системе. Может быть использован любой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Подходящие вектора включают, без ограничения перечисленным, векторы, содержащие конститутивные или индуцибельные промоторы, такие как альфа-фактор, алкоголь оксидаза и PGH (рассмотренные в: F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), и Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)).

Экспрессирующий вектор также может быть или в ином случае является вектором, подходящих для экспрессии в клетках млекопитающих, например, вектор, содержащий глутаминсинтетазу в качестве селективного маркера, такой, как векторы описанные в (Bebbington (1992) Biotechnology (NY) 10:169-175).

Нуклеиновая кислота и/или вектор также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность секреции/локализации, которая может направлять полипептид, такой как растущая полипептидная цепь, в периплазматическое пространство или в клеточную культуральную среду. Такие последовательности известны в данной области и включают секреторный лидер или сигнальные пептиды.

В экспрессирующем векторе изобретения нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против с-Met, могут содержать или могут быть ассоциированы с любым подходящим промотором, энхансером и другими элементами облегчающими экспрессию. Примеры таких элементов включают промоторы для сильной экспрессии (например, человеческий CMV IE промотор/энхансер а также промоторы RSV, SV40, SL3-3, MMTV и HIV LTR), эффективные последовательности терминации с полиА, и точки начала репликации для плазмидного продукта в *E. coli*, ген устойчивости к антибиотику в качестве селективного маркера, и/или обычный участок для клонирования (например, полилинкер). Нуклеиновые кислоты также могут содержать индуцируемый промотор, в отличие от конститутивного промотора, такого как CMV IE.

В одном воплощении экспрессирующий вектор, кодирующий антитело против с-Met, может быть расположен в и/или доставлен в клетку-хозяин или в животное-хозяин посредством вирусного вектора.

В дополнительном аспекте изобретение относится к рекомбинантной эукариотической или прокариотической клетке-хозяину, такой как трансфектома, которая продуцирует антитело изобретения, определенное в данном документе. Примеры клеток-хозяев включают дрожжевые, бактериальные клетки и клетки млекопитающих, такие как клетки СНО или НЕК. Например в одном воплощении в настоящем изобретении предлагается клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, стабильно интегрированную в клеточный геном, который содержит кодирующую последовательность, экспрессирующую антитело против с-Met по настоящему изобретению. В другом воплощении в настоящем изобретении предлагается клетка, содержащая неинтегрированную нуклеиновую кислоту, такую как плаزمид, космид, фагемид или линейный экспрессирующий элемент, который содержит кодирующую последовательность, экспрессирующую антитело изобретения против с-Met.

В дополнительном аспекте изобретение относится к гибридоме, которая продуцирует антитело изобретения, определенное в данном документе. В еще одном дополнительном аспекте, изобретение относится к трансгенному животному, не являющемуся человеком, или растению, содержащему нуклеиновые кислоты, кодирующие человеческую тяжелую и легкую цепь, где животное или растение продуцируют антитело изобретения.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу получения антитела изобретения против с-Met, который включает стадии

- а) культивирования гибридомы или клетки-хозяина по изобретению, как описано в данном документе выше, и
- б) очистки антитела изобретения из культуральной среды.

Композиции

В дополнительном главном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей:

- антитело против с-Met, определенное в данном документе, и
- фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтическая композиция настоящего изобретения может содержать одно антитело настоящего изобретения или комбинацию различных антител настоящего изобретения.

Фармацевтические композиции могут быть созданы в соответствии с обычными методами, такими как те, что описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Фармацевтическая композиция настоящего изобретения может, например, включать разбавители,

наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионный детергент, такой как Tween-20 или Tween-80), стабилизаторы (например, сахара или безбелковые аминокислоты), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы, и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию.

Фармацевтически приемлемые носители включают любой и все подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и антигрибковые агенты, изотонические агенты, антиоксиданты и замедляющие абсорбцию агенты, и т.п., которые физиологически совместимы с соединением настоящего изобретения. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, солевой раствор, фосфатно-буферный солевой раствор, этанол, декстрозу, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, и т.п.), и их подходящие смеси, растительные масла, коллоидальные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовую камедь, и инъекционные органические эфиры, такие как этилолеат, и/или различные буферы. Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъеклируемых растворов или дисперсий для немедленного приема. Правильная текучесть может поддерживаться, например, при применении покрывающих материалов, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий, и с помощью использования ПАВ.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например, (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилоксианизол, бутилокситолуол, лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) хелатирующие металлы агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать изотонические агенты, такие как сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, глицерин или хлорид натрия в композициях.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать один или несколько адъювантов, подходящих для выбранного пути введения, такие как консерванты, увлажняющие агенты, эмульгирующие агенты, диспергирующие агенты, консерванты или буферы, которые могут усилить срок хранения или эффективность

фармацевтической композиции. Соединения могут быть приготовлены с носителями, которые будут предохранять соединение от быстрого высвобождения, такие как состав с контролируемым высвобождением, включая импланты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфиры и полимолочную кислоту отдельно или с воском, или другими материалами, хорошо известными в данной области. Способы приготовления таких составов запатентованы или хорошо известны специалистам в данной области.

Стерильные инъекционные растворы могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. В общем, дисперсии готовят путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, примерами способов приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из его предварительно стерильно фильтрованного раствора.

Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях могут варьировать для того чтобы количество активного ингредиента являлось эффективным для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретных пациента, композиции и режима введения, без оказания токсичного воздействия на пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от целого ряда фармакокинетических факторов, включая активность определенных композиций, используемых настоящим изобретением, или их амида, путь введения, время введения, скорость выведения определенного используемого соединения, длительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, массу, состояние, общий уровень здоровья и предыдущую историю болезни подвергнутого лечению пациента и т.п. факторы, хорошо известные в медицине.

Фармацевтическая композиция может быть введена любым подходящим путем или способом. В одном воплощении фармацевтическая композиция настоящего изобретения вводится парентерально. Словосочетание «вводить парентерально» используемое в

данном документе, означает режимы введения отличные от энтерального или местного введения, обычно инъекцией, и включает, без ограничения перечисленным, эпидермальную, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, внутритрахеальную, внутрикапсулярную, внутриорбитальную, внутрикардиальную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, эпидуральную и надчревную инъекцию или инфузию.

В одном воплощении фармацевтическую композицию вводят внутривенной или подкожной инъекцией или инфузией.

Применения

В дополнительном главном аспекте изобретение относится к антителу изобретения против c-Met для применения в качестве лекарственного средства.

Антитела изобретения против c-Met могут быть использованы в нескольких целях. Конкретно, антитела по изобретению могут быть использованы для лечения различных форм злокачественных новообразований, включая метастатические злокачественные новообразования и невосприимчивые к лечению злокачественные новообразования. Такие злокачественные опухоли могут быть HGF-зависимыми или HGF-независимыми.

В одном воплощении, антитела изобретения против c-Met используют при лечении формы злокачественного новообразования, выбранного из группы, состоящей из: рака мочевого пузыря, рака груди, рака шейки матки, холангиокарциномы, колоректального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, рака головы и шеи, рака почки, рака печени, рака легкого (такого как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC)), рака носоглотки, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака предстательной железы, рака щитовидной железы.

В другом воплощении, антитела изобретения против c-Met используют при лечении формы злокачественного новообразования, выбранной из группы, состоящей из: остеосаркомы, рабдомиосаркомы и синовиальной саркомы.

В другом воплощении, антитела изобретения против c-Met используют при лечении формы злокачественного новообразования, выбранной из группы, состоящей из: саркомы Капоши, лейомиосаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы и фибросаркомы.

В другом воплощении, антитела изобретения против c-Met используют при лечении гематопоетических злокачественных опухолей, например, злокачественных опухолей, выбранных из группы, состоящей из: острого миелогенного лейкоза, Т-клеточного лейкоза взрослых, хронического миелоидного лейкоза, лимфомы и

множественной миеломы.

В дополнительном воплощении, антитела изобретения против c-Met используют при лечении неоплазий, выбранных из группы, состоящей из: глиобластомы, астроцитомы, меланомы, мезотелиомы и опухоли Вилмса.

В дополнительном воплощении, антитела изобретения против c-Met используют при лечении MiT-опухолей, включающих светлоклеточную саркому (CCS), альвеолярную саркому мягких тканей (ASPS) и ассоциированную с транслокацией почечноклеточную карциному.

В другом воплощении, агонистические антитела изобретения против c-Met, используют для регуляции выработки цитокинов и индукции мобилизации эндотелиальных клеток-предшественников, например, у пациентов с ишемической болезнью сердца (Yang et al. (2009) Clin Exp Pharmacol Physiol. 36:790).

В другом воплощении, агонистические антитела изобретения против c-Met используют для ингибирования или улучшения состояния при хронической почечной недостаточности (Mizuno et al. (2008) Front Biosci. 13:7072).

Аналогично, изобретение относится к способу ингибирования роста и/или пролиферации опухолевой клетки, экспрессирующей c-Met, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества антитела по изобретению.

В одно воплощение указанная опухолевая клетка вовлечена в виде злокачественного новообразования, выбранного из группы, состоящей из: рака мочевого пузыря, рака груди, рака шейки матки, холангиокарциномы, колоректального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, рака головы и шеи, рака почки, рака печени, рака легкого, рака носоглотки, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, остеосаркомы, рабдомиосаркомы, синовиальной саркомы, саркомы Капоши, лейомиосаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитоксантомы, фибросаркомы, острого миелогенного лейкоза, Т-клеточного лейкоза взрослых, хронического миелоидного лейкоза, лимфомы, множественной миеломы, глиобластомы, астроцитомы, меланомы, мезотелиомы, опухоли Вилмса.

Также, изобретение относится к применению моноклонального антитела, которое связывает человеческий c-Met, для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, такого как одно из конкретных проявлений злокачественных новообразований, упомянутых выше.

В одном воплощении, отбор пациентов для лечения с использованием антитела

против с-Met, основан на уровне (сверх)экспрессии с-Met и/или HGF на соответствующих опухолевых клетках указанных пациентов.

В следующем воплощении способов лечения по настоящему изобретению, эффективность лечения отслеживается в процессе терапии, например, в определенные моменты времени путем определения уровня экспрессии с-Met на соответствующих опухолевых клетках.

Режимы дозировки в вышеуказанных способах лечения и применениях корректируются для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, может быть введен одиночный болюс, могут быть введены несколько доз в течение периода времени или дозы могут быть пропорционально уменьшены или увеличены в зависимости от потребностей терапевтической ситуации. Парентеральные композиции могут быть составлены в виде единичной лекарственной формы для легкого введения и единообразия доз.

Эффективные дозировки и режимы дозировки для антител против с-Met зависят от заболевания или состояния подвергаемого лечению, или могут определяться специалистом в данной области. Типичный неограничивающий интервал для терапевтически эффективного количества соединения по настоящему изобретению составляет около 0,1-100 мг/кг, например, около 0,1-50 мг/кг, например, около 0,1-20 мг/кг, как например, около 0,1-10 мг/кг, например, около 0,5, около 0,3, около 1, около 3, около 5, или около 8 мг/кг.

Врач или ветеринар, являющийся специалистом в данной области, может легко определить и прописать требуемое эффективное количество терапевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать с дозировки антитела против с-Met в фармацевтической композиции на уровне ниже, чем требуется для достижения требуемого терапевтического эффекта, с постепенным увеличением дозировки до достижения целевого эффекта. Вообще, подходящая суточная доза композиции по настоящему изобретению будет представлять собой такое количество соединения, которое составляет самую низкую дозу, эффективную для получения терапевтического эффекта. Введение может быть парентеральным, таким как внутривенное, внутримышечное или подкожное введение. В одном воплощении антитела против с-Met могут вводиться путем инфузии с еженедельной дозировкой от 10 до 500 мг/м², как например, от 200 до 400 мг/м². Такое введение может повторяться, например, 1-8 раз, например, 3-5 раз. Введение может осуществляться путем непрерывной инфузии в течение периода от 2 до 24 часов, например, от 2 до 12 часов. В одном воплощении, антитела против с-Met могут быть введены медленной непрерывной инфузией в течение длительного периода, например,

более чем за 24 часа, с целью уменьшения токсических побочных эффектов.

В одном воплощении, антитела против с-Met, могут быть введены с еженедельной дозировкой от 250 мг до 2000 мг, как например, 500 мг, 700 мг, 1000 мг, 1500 мг, 2000 мг или 300 мг, в течение до 8 раз, например, от 4 до 6 раз. Такой режим может повторяться один или более раз по необходимости, например, через 6 или 12 месяцев. Дозировка может быть определена или урегулирована путем измерения количества соединения по настоящему изобретению в крови при введении путем, например, забора биологического образца и использования антиидиотипических антител, мишенью которых является антигенсвязывающая область антител изобретения против с-Met.

В одном воплощении антитела против с-Met могут быть введены поддерживающей терапией, например, один раз в неделю в течение 6 месяцев или больше.

Антитела против с-Met также могут быть введены профилактически для уменьшения риска развития злокачественного новообразования, задержки наступления события в прогрессии злокачественного новообразования, и/или уменьшения риска рецидива при ремиссии злокачественного новообразования.

Антитела против с-Met также могут быть введены в комбинаторной терапии, т.е. комбинации с другими терапевтическими агентами, релевантными заболеванию или состоянию, подвергаемому лечению. Соответственно, в одном воплощении антителосодержащее лекарственное средство находится в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, например, цитотоксическим, химиотерапевтическим или антиангиогенным агентом.

Такое объединенное введение может быть одновременным, отдельным или последовательным. Для одновременного введения агенты могут быть введены в виде одной композиции или в виде отдельных композиций, по необходимости. В настоящем изобретении, таким образом, предлагаются способы лечения заболевания, в которое вовлечены клетки, экспрессирующие с-Met, как описано выше, где способы включают введение антитела против с-Met по настоящему изобретению, объединенного с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, как описано ниже.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается способ лечения расстройства, в которое вовлечены клетки, экспрессирующие с-Met, в объекте, где способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела против с-Met по настоящему изобретению, и, по меньшей мере, одного дополнительного терапевтического агента нуждающегося в этом объекте.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, где способ включает введение

терапевтически эффективного количества антитела против с-Met по настоящему изобретению, и, по меньшей мере, одного дополнительного терапевтического агента нуждающемуся в этом объекту.

В одном воплощении, такой дополнительный терапевтический агент может быть выбран из антиметаболита, такого как метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, декарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, гемцитабин или кладрибин.

В другом воплощении, такой дополнительный терапевтический агент может быть выбран из алкилирующего агента, такого как мехлореамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромоманнит, стрептозотозин, декарбазин (DTIC), прокарбазин, митомицин С, цисплатин и других платиновых производных, таких как карбоплатин.

В другом воплощении, такой дополнительный терапевтический агент может быть выбран из антимитотического агента, такого как таксаны, например, доксетаксель и паклитаксель, и алкалоиды барвинка, например, виндезин, викристин, винбластин и винорелбин.

В другом воплощении такой дополнительный терапевтический агент может быть выбран из ингибиторов топоизомераз, такого как топотекан или иринотекан, или цитостатического лекарственного средства, такого как этопозид и тенипозид.

В другом воплощении такой дополнительный терапевтический агент может быть выбран из ингибиторов фактора роста, такого как ингибитор ErbB1 (EGFR) (такой как антитело против EGFR, например, залутумумаб, цетуксимаб, панитумумаб или нимотузумаб или другие ингибиторы EGFR, такие как гефитиниб или ерлотиниб), ингибитор ErbB2 (Her2/neu) (такой как антитело против HER2, например, трастузумаб, трастузумаб DMI или пертузумаб) или ингибитор как EGFR, так и HER2, такой как лапатиниб).

В другом воплощении такой дополнительный терапевтический агент может быть выбран из ингибитора тирозинкиназы, такого как иматиниб (Glivec, Gleevec STI571) или лапатиниб, PTK787/ZK222584.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается способ лечения расстройства, в которое вовлечены клетки, экспрессирующие с-Met, в объекте, где способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела против с-Met по настоящему изобретению, и, по меньшей мере, одного ингибитора ангиогенеза, неоваскуляризации и/или другой васкуляризации, нуждающемуся в этом объекту.

Примерами таких ингибиторов ангиогенеза являются ингибиторы урокиназы,

ингибиторы матриксных металлопротеаз (такие как маримастат, Неовастат, BAY 12-9566, А. Г. 3340, BMS-275291 и т.п.), ингибиторы миграции и пролиферации эндотелиальных клеток (такие, как TNP-470, скваламин, 2-метоксиэстрадиол, комбретастины, эндостатин, ангиостатин, пеницилламин, SCH66336 (Schering-Plough Corp, Меэдисон, Нью-Джерси), R115777 (Янссен Фармацевтика, Inc, Титусвилль, Нью-Джерси) и подобные агенты), антагонисты ангиогенных факторов роста (например, такие как ZD6474, SU6668, антитела против ангиогенных агентов и/или их рецепторов (такие как VEGF (например, бевацизумаб), bFGF, и ангиопозтин-1), талидомид, аналоги талидомида (например, CC-5013), 5416 Sugen, SU5402, антиангиогенный рибозим (например, ангиозим), интерферон (например, интерферон $\alpha 2a$), сурамин и т.п.), ингибиторы киназы VEGF-R и других антиангиогенных тирозинкиназ (например, SU011248), ингибиторы специфичного для эндотелия интегрин/сигнальных путей выживания (такие как витаксин и подобные агенты), антагонисты/хелаторы меди (например, тетратиомолибдат, каптоприл и т.п.), карбоксиамидотриазол (CAI), ABT-627, CM101, интерлейкин-12 (IL-12), IM862, PNU145156E, а также нуклеотидные молекулы, ингибирующие ангиогенез (например, антисмысловая-VEGF-кДНК, кДНК, кодирующая ангиостатин, кДНК, кодирующая p53 и кДНК, кодирующая дефектный рецептор VEGF -2).

Другими примерами таких ингибиторов ангиогенеза, неоваскуляризации, и/или другой васкуляризации являются производные антиангиогенного гепарина (например, гепариназа III), темозоломид, NK4, фактор ингибирования миграции макрофагов, ингибиторы циклооксигеназы-2, ингибиторы индуцируемого гипоксией фактора 1, антиангиогенные изофлавоны сои, олтипраз, фумагиллин и его аналоги, аналоги соматостатина, пентозанполисульфат, текогалан натрия, дальтепарин, тумстатин, тромбоспондин, NM-3, комбрестатин, канстатин, авастатин, антитела против других целей, таких антитела против альфа-V/бета-3 интегрин и антитела против кинитостатина.

В одном воплощении терапевтический агент для применения в комбинации с антителом против c-Met при лечении расстройств, описанных выше, может быть иммуногеном против злокачественного новообразования, таким как антиген злокачественного новообразования/опухоль-ассоциированный антиген (например, молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM/TACSTD1), муцин 1 (MUC1), онкоэмбриональный антиген (ОЭА), ассоциированный с опухолями гликопротеин 72 (TAG-72), gp100, Melan-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, вакцины против вирусов, ассоциированных со злокачественными новообразованиями (например, вакцины против вируса папилломы человека) или опухолевые белки теплового шока.

В одном воплощении терапевтический агент для применения в комбинации с

антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, может быть противоопухолевым цитокином, хемокином, или их комбинацией. Примеры, подходящих цитокинов и факторов роста включают IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN α (например, IFN α 2b), IFN β , GM-CSF, CD40L, лиганд Flt3, фактор стволовых клеток, анцестим и TNF α . Подходящие хемокины могут включать Glu-Leu-Arg (ELR)-отрицательные хемокины, такие как IP-10, MCP-3, MIG и SDF-1a из семейств человеческих хемокинов CXC и C-C. Подходящие цитокины включают производные цитокинов, варианты цитокинов, фрагменты цитокинов и химерные белки на основе цитокинов.

В одном воплощении терапевтический агент для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, может быть регулятором контроля клеточного цикла/апоптоза (или «регулирующим агентом»). Регулятор контроля клеточного цикла/апоптоза может включать молекулы, которые направляют и модулируют регуляторы контроля клеточного цикла/апоптоза такие как (i) cdc-25 (например, NSC 663284), (ii) циклин-зависимые киназы, которые сверхстимулируют клеточный цикл (например, флавопиридол (L868275, HMR1275), 7-гидроксистауропорин (UCN-01, KW-2401), и росковитин (R-росковитин, CYC202)), и (iii) модуляторы теломеразы (например, BIBR1532, SOT-095, GRN163 и композиции описанные, например, в US 6,440,735 и US 6,713,055). Неограничивающие примеры молекул, которые интерферируют с апоптотическими сигнальными путями, включают апоптоз-индуцирующий лиганд, родственник TNF (TRAIL)/лиганд 2 апоптоза (Apo-2L), антитела, которые активируют рецепторы TRAIL, IFN, и антисмысловую Bcl-2.

В одном воплощении терапевтический агент для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, может быть гормональным регулирующим агентом, таким как агенты, применимые в антиандрогенной и антиэстрогенной терапии. Примерами таких гормональных регулирующих агентов являются тамоксифен, идоксифен, фулвестрант, дролоксифен, торемифен, ралоксифен, диэтилстильбестрол, этинилэстрадиол/этинил, антиандроген (такой, как флутаминд/эулексин), прогестин (например, таких, как гидроксипрогестерона капроат, медрокси-прогестерон/провера, мегестрол ацепат/мегэйс), адренкортикостероид (например, гидрокортизон, преднизолон), рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона (и его аналоги и других агонисты ЛГРГ, таких как бусерелин и гозерелин), ингибитор ароматазы (например, анастразола/аримидекс, аминоглютетимид/цитраден, экземестан) или гормональный ингибитор (например, октреотид/сандостатин).

В одном воплощении терапевтический агент для применения в комбинации с

антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, может быть любым антианергическим агентом, например, соединениями, которые являются молекулами, блокирующими активность CTLA-4, например, может быть ипилимумабом.

В одном воплощении терапевтический агент для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, может быть противоопухолевой нуклеиновой кислотой или противоопухолевой ингибирующей молекулой РНК.

Примерами других противоопухолевых агентов, которые могут быть применимы в качестве терапевтических агентов для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, являются агенты, индуцирующие дифференцировку, аналоги ретиноевой кислоты (такие как все из числа транс-ретиноевой кислоты, 13-цис-ретиноевой кислоты и похожих агентов), аналоги витамина D (такие как сеокальцитол и похожие агенты), ингибиторы ErbB3, ErbB4, IGF-IR, рецепторов инсулина, PDGFR α , PDGFR β , Flk2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TRKA, TRKC, RON (например, антитело против RON), Sea, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Alk, LTK, PTK7 и похожие агенты.

Примерами других противоопухолевых агентов, которые можно применять в качестве терапевтических агентов в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, являются эстрамустин и эпирубицин.

Примерами других противоопухолевых агентов, которые можно применять в качестве терапевтических агентов для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, являются ингибитор HSP90, такой как 17-аллиламиногельдаминин, антитела против опухолевого антигена, такого как PSA, CA125, KSA, интегрин, например, интегрин β 1, или ингибиторы VCAM.

Примерами других противоопухолевых агентов, которые можно применять в качестве терапевтических агентов для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, являются ингибиторы кальциневрина (такие как валсподар, PSC 833 и другие ингибиторы MDR-1 или р-гликопротеина), ингибиторы TOR (такие как сиролимус, еверлимус и рапамицин), и ингибиторы механизма «хоминга лимфоцитов» (такие как FTY720), и агенты, оказывающие воздействие на клеточные сигнальные пути, такие как ингибиторы молекул адгезии (например, анти-LFA).

В одном воплощении антитело изобретения против с-Met предназначено для применения в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими антителами, такими как офатумумаб, занолимумаб, даратумумаб, ранибизумаб, зенапакс,

Симулект, Ремикад, Химура, Тусабри, Ксолаир, Раптива и/или ритуксимаб.

Другими терапевтическими антителами, которые могут быть использованы в комбинации с антителом настоящего изобретения, являются антитела против с-Met, которые связывают другие области с-Met, такие как антитела описанные в WO2005016382, WO2006015371, WO2007090807, WO2007126799 или WO2009007427 (все включены в данный документ ссылкой).

В другом воплощении при лечении заболевания используют комбинацию двух или нескольких различных антител изобретения, описанных в данном документе. Особенно интересные комбинации включают два или большее количество неконкурирующих антител. Такая комбинационная терапия может приводить к связыванию повышенного количества молекул антител на клетку, что может увеличить эффективность через активацию комплемент-опосредованного лизиса.

В дополнение к вышеуказанному, другие воплощения комбинационных терапий изобретения включают следующее:

- При лечении немелкоклеточного рака легкого применяют антитело против с-Met в комбинации с ингибиторами EGFR, такими как антитело против EGFR, например, залутумумаб, цетуксимаб, панитумумаб или нимотузумаб, или другими ингибиторами EGFR, такими как гефитиниб или ерлотиниб) или в комбинации с ингибитором ErbB2 (Her2/neu) (таким как антитело против HER2, например, трастузумаб, трастузумаб-DM1 или пертузумаб) или в комбинации с ингибитором как EGFR так и HER2, таким как лапатиниб, или в комбинации с ингибитором HER3.
- При лечении глиомы применяют антитело против с-Met в комбинации с темозоломидом или ингибитором ангиогенеза, таким как бевацизумаб.
- При лечении колоректального рака применяют антитело против с-Met в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из: гемцитабина, бевацизумаба, фолфокса, фолфири, кселокса, IFL, оксалиплатина, иринотекана, 5-FU/LV, капецитабина, UFT, нацеливающих на EGFR агентов, таких как цетуксимаб, панитумумаб, залутумумаб; ингибиторов VEGF или ингибиторов тирозинкиназ, таких как сунитиниб.
- При лечении рака предстательной железы применяют антитело против с-Met в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из: гормональной/антигормональной терапии; например, антиандрогенов, агонистов релизинг-фактор лютеинизирующего гормона (LHRH), и химиотерапевтических веществ, таких как таксаны, митоксантрон, эстрамустин, 5FU, винбластин, иксабепилон.

Лучевая терапия - хирургия

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается способ лечения расстройства, в которое вовлечены клетки, экспрессирующие с-Met, в объекте, где способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела против с-Met по настоящему изобретению, и, по меньшей мере, одного дополнительного терапевтического агента, нуждающегося в этом объекту.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается способ лечения или предотвращения злокачественного новообразования, причем способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела против с-Met по настоящему изобретению, и применение лучевой терапии у нуждающегося в этом объекта.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается применение антитела против с-Met по настоящему изобретению для приготовления фармацевтической композиции для лечения злокачественного новообразования путем введения антитела в комбинации с лучевой терапией.

Лучевая терапия может включать облучение или ассоциированное введение пациенту радиофармацевтических веществ. Источник излучения может быть как внешним, так и внутренним по отношению к пациенту, подвергаемому обработке (лучевая обработка может, например, быть в форме внешней направленной лучевой терапии (EBRT) или в форме брахотерапии (BT)). Радиоактивные элементы, которые могут использоваться при практическом осуществлении таких методов, включают, например, цезий-137, иридий-192, америций-241, золото-198, кобальт-57, медь-67, технеций-99, йодид-123, йодид-131, и индий-111.

В следующем воплощении в настоящем изобретении предлагается способ лечения или предотвращения злокачественного новообразования, причем способ включает введение нуждающемуся в этом объекту терапевтически эффективного количества антитела против с-Met, такого как антитело против с-Met по настоящему изобретению в комбинации с хирургической операцией.

Диагностические применения

Антитела изобретения против с-Met также могут быть использованы для диагностических целей. Таким образом, в следующем аспекте изобретение относится к диагностической композиции, включающей антитело против с-Met, определенное выше.

В одном воплощении, антитела против с-Met по настоящему изобретению могут использоваться *in vivo* или *in vitro* для диагностики заболеваний, в которых активированные клетки, экспрессирующие с-Met, играют активную роль в патогенезе, путем определения уровня с-Met, или уровня клеток, которые содержат с-Met на своей

мембранной поверхности. Этого можно достичь, например, путем контакта тестируемого образца необязательно вместе с контрольным образцом, с антителом против с-Met в условиях, которые дают возможность образования комплекса между антителом и с-Met.

Таким образом, в следующем аспекте, изобретение относится к способу обнаружения наличия антигена с-Met или клетки, экспрессирующей с-Met, в образце, включающему

- контакт образца с антителом в условиях, которые дают возможность образования комплекса между антителом и с-Met; и
- анализ образования комплекса.

В одном воплощении, способ осуществляют *in vitro*.

Более конкретно, в настоящем изобретении предлагаются способы идентификации и диагностики инвазивных клеток и тканей и других клеток, на которые направлены антитела против с-Met по настоящему изобретению, и способы мониторинга прогресса терапевтического лечения, состояния после лечения, риска развития злокачественного новообразования, прогрессии злокачественного новообразования и т.п.

Подходящие метки для антитела против с-Met, и/или для вторичных антител, используемые в таких методах, хорошо известны в данной области.

В дополнительном аспекте изобретение относится к набору реактивов для обнаружения наличия антигена с-Met или клетки, экспрессирующей с-Met, в образце, который содержит:

- антитело изобретения против с-Met или биспецифичную молекулу по изобретению; и
- инструкции по применению набора реактивов.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается набор для диагностики злокачественного новообразования, содержащий контейнер, в котором находится антитело против с-Met, и один или несколько реактивов для обнаружения связывания антитела против с-Met с с-Met. Реактивы включают, например, флуоресцентные метки, ферментные метки или другие детектируемые метки. Реактивы также могут включать вторичные или третичные антитела или реактивы для ферментативных реакций, где ферментативные реакции дают продукт, который может быть визуализирован.

Антиидиотипические антитела

В дополнительном аспекте изобретение относится к антиидиотипическому антителу, которое связывает антитело изобретения против с-Met, описанное в данном документе.

«Антиидиотипическое» (Id) антитело представляет собой антитело, которое распознает уникальные детерминанты, как правило, ассоциированные с антигенсвязывающим сайтом антитела. В качестве источника мАТ против с-Met с мАТ, Id-антитело может быть получено иммунизацией животного того же самого вида и генетического типа, для которого получено антитело против Id. Иммунизированное животное, как правило, распознает и отвечает на идиотипические детерминанты иммунизированного антитела выработкой антитела к этим идиотипическим детерминантам (антитело против Id).

Антитела против Id также могут быть использованы в качестве «иммуногена» для индукции иммунного ответа в другом животном, продуцируя так называемое антитело против антитела против Id. Антитело против антитела против Id может быть эпитопно идентичным исходному мАТ, которое индуцирует антитело против Id. Таким образом, при использовании антител к идиотипическим детерминантам мАТ, можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела идентичной специфичности.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны толковаться как ограничивающие.

Примеры

Пример 1. Конструкты, экспрессирующие с-Met

Получали оптимизированные по кодонам конструкты для экспрессии с-Met, внеклеточного домена (ECD) (ак 1-932 и С-концевая метка His6 или домен SEMA из с-Met (ак 1-567 и С-концевая метка His9) в клетках НЕК и CHO. Белки, кодируемые этими конструктами идентичны учетной записи Genbank NM 000245 для с-Met. Конструкты содержат подходящие сайты рестрикции для клонирования и оптимальную последовательность Козак (Kozak et al. (1999) Gene 234: 187-208). Конструкты клонировали в вектор для экспрессии в млекопитающих pEE13.4 (Lonza Biologies) (Bebbington (1992) Biotechnology (NY) 10:169-175), с получением pEE13.4cMet, pEE13.4cMetECDHis и pEE13.4cMetSEMA-567His8.

Пример 2. Экспрессирующие конструкты для 5D5v1, 5D5 и G11-HZ

Получали оптимизированные по кодонам конструкты для экспрессии тяжелой (HC) и легкой цепей (LC) антител IgG1 5D5v1, 5D5 и G11-HZ в клетках НЕК. Белки, кодируемые этими конструктами, идентичны тем, что описаны в Пат. США 6468529 (последовательности 3 и 4) для тяжелой и легкой цепей 5D5v1, WO 2006/015371 A2 (фигура 13) для тяжелой и легкой цепей 5D5, и WO 2009/007427 A2 (последовательность была выделена из множества фигур) для тяжелой и легкой цепей 224G11. 224G11 также называется в данном документе G11-HZ.

Пример 3. Временная экспрессия в клетках НЕК-293F

Клетки Freestyle™ 293-F (субклон НЕК-293 адаптирован для суспензионного роста и химически заданной среды «Freestyle» (НЕК-293F)) были получены из «Invitrogen» и трансфецированы соответствующей плазмидной ДНК, с помощью «293fectin» (Invitrogen), согласно инструкциям производителя. Экспрессию с-Met проверяли с помощью анализа FACS, как описано ниже. В случае экспрессии антитела, соответствующие экспрессирующие векторы для тяжелой и легкой цепей коэкспрессировали.

Пример 4. Временная экспрессия в клетках СНО

pEE13.4сMet временно трансфецировали в клеточную линию Freestyle™ CHO-S (Invitrogen) с помощью реактива для трансфекции «Freestyle MAX transfection reagent» (Invitrogen). Экспрессию с-Met проверяли анализом FACS, как описано ниже.

Пример 5. Клонирование и экспрессия моновалентных антител (молекул UniBody®)

Для экспрессии моновалентных антител в клетках млекопитающих константную область HC из IgG4, утратившую область шарнира (Ch) (аминокислоты E99-P110) и содержащую 2 мутации F405T и Y407E в области CH3, синтезировали в виде оптимизированного по кодам конструкта в экспрессирующем в млекопитающих векторе pcDNA3.3 (Invitrogen) и назвали pUniTE. Путем вставки оптимизированной по кодам константной области в область человеческой легкой цепи каппа в pcDNA3.3 сконструировали отдельный вектор.

Релевантные области VH и VL вставили соответственно в pUniTE и pКарра с получением векторов для экспрессии тяжелой и легкой цепей специфических антител. Котрансфекция векторов с тяжелой и легкой цепями специфического антитела в клетках НЕК-293F (Invitrogen), приводила к временной выработке моновалентных антител с искомыми специфичностями. Очистку антител осуществляли с помощью аффинной колоночной хроматографии с протеином А (как описано в примере 11).

Пример 6. Очистка His-меченного с-Met

сMetECDHis и сMetSEMAHis экспрессировали в клетках НЕК-293F. Метка His в сMetECDHis и сMetSEMAHis позволяет очищать их с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом. В этом способе, хелатор, зафиксированный в хроматографической смоле, наполнен Co^{2+} . Надосадочные жидкости, содержащие сMetECDHis и сMetSEMAHis, инкубировали со смолой в периодическом режиме (т.е. в растворе). Меченный His белок сильно связывается с гранулами смолы, тогда как другие белки, присутствующие в культуральной надосадочной жидкости, связываются не сильно. После инкубации гранулы извлекали из надосадочной жидкости и помещали в

колонку. Колонку промывали для удаления слабо связанных белков. Затем элюировали сильно связанные белки сMetECDHis и сMetSEMAHis буфером, содержащим имидазол, который конкурирует с His за связывание с Co^{2+} . Элюэнт удаляли из белка заменой буфера на обессоливающей колонке.

Пример 7. Процедура иммунизации трансгенных мышей

Антитела 005, 006, 007, 008, 011, 012, 016, 017, 022, 024, 025, 028, 031, 035, 039, 040, 045, 093, 095, 096, 101 и 104 выделяли из следующих иммунизаций: одну мышь HCo20 (1 самка, штамм GG2713), одну мышь HCol7 (самка, штамм GG2714) и две мыши HCol2-Balb/C (2 самки, штамм GG2811) (Medarex, Сан-Хосе, Калифорния, США; для ссылки см. выше параграф о мышах HuMab, WO2009097006 и US2005191293) иммунизировали каждые две недели по очереди 5×10^6 опухолевых клеток NCI-H441 внутривенно (в.б.) и подкожно (п.к.) 20 мкг белка сMetECDHis, связанного с гаптеном гемоцианина лимфы улитки (KLH).

Антитела 058, 061, 062, 063, 064, 065, 066, 068, 069, 078, 082, 084, 087, 089, 098 и 181 выделяли из следующих иммунизаций: две мыши HCo20 (1 самец и 1 самка, штамм GG2713), одну мышь HCol2-Balb/C (1 самец, штамм GG2811) (Medarex, Сан-Хосе, Калифорния, США; для ссылки см. выше абзац о мышах HuMab) иммунизировали каждые две недели по очереди 5×10^6 клеток CHO-K1SV, временно трансфицированных сMetECD, внутривенно (в.б.) и подкожно (п.к.) 20 мкг белка сMetECDHis, связанного с гаптеном гемоцианина лимфы улитки (KLH).

Осуществляли максимум восемь иммунизаций на мышь, четыре в.б. и четыре п.к. иммунизации в крестец. Первую иммунизацию проводили с помощью клеток в полном адьюванте Фрейнда (CFA; Difco Laboratories, Детройт, Мичиган, США). Для всех остальных иммунизаций, клетки инъецировали в.б. в PBS, а сMetECD, соединенный с KLH, инъецировали п.к. с использованием неполного адьюванта Фрейнда (IFA; Difco Laboratories, Детройт, Мичиган, США). Объединяли мышей, по меньшей мере, с двумя последовательными титрами с-Met-специфичного антитела, равными 200 (разведение сыворотки 200/1) или выше, определенных в анализе антиген-специфичного скрининга FMAT, как описано в примере 8.

Пример 8. Анализ гомогенным антигенспецифичным скринингом

Наличие антител против с-Met в сыворотке иммунизированных мышей или в гибридомах «HuMab» (человеческие моноклональные антитела) или в надосадочной жидкости культуры трансфектом, определяли в анализе гомогенным антигенспецифичным скринингом (четвертый квадрант) с помощью технологии «Fluorometric Micro volume Assay Technology» (FMAT; Applied Biosystems, Фостер-Сити,

Калифорния, США). Для этого использовали комбинацию 3 анализов на основе клеток и одного анализа на основе гранул. В анализах на основе клеток, определяли связывание с TH1016-cMet (клетки HEK-293F временно экспрессирующие внеклеточный домен рецептора c-Met; полученные как описано выше) и с HT29 (которые экспрессируют c-Met на клеточной поверхности), а также с клетками HEK293 дикого типа (отрицательный контроль который не экспрессирует c-Met). Для анализа на основе гранул, определяли связывание с SB1016-cMet (cMetECDHis, полученный при временной экспрессии в клетках HEK-293F, как описано выше, биотинилированный и спаренный с покрытыми стрептавидином гранулами). Образцы добавляли к клеткам/гранулам для связывания с c-Met. Затем связывание «HuMab» детектировали с помощью флуоресцентного конъюгата (козьи антитела против человеческих IgG-Cy5; Jackson ImmunoResearch). Химерное антитело специфичное к c-Met 5D5v1 (полученное в клетках HEK-293F) использовали в качестве положительного контроля, а смешанную сыворотку HuMab и HuMab-KLN использовали в качестве отрицательных контролей. Образцы сканировали с помощью системы детекции «Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System» (8200 CDS) и значения 'импульсы x флуоресценция' использовали в качестве выводимых данных. Образцы установили как положительные, когда импульсы были выше чем 50, а 'импульсы x флуоресценция' были, по меньшей мере, в три раза выше, чем в случае отрицательного контроля HuMab-KLN.

Пример 9. Получение гибридомы «HuMab»

Мышей «HuMab» с достаточным развитием антиген-специфичного титра (определенного выше) умерщвляли и собирали селезенку и лимфоузлы, фланкирующие абдоминальную аорту и полую вену. Слияние спленоцитов и клеток лимфоузлов с клеточной линией мышинной миеломы осуществляли электрослиянием с помощью системы «CEEF 50 Electrofusion System» (Cyto Pulse Sciences, Глен-Бурни, Мериленд, США), преимущественно согласно инструкциям изготовителя. Планшеты для слияния скринировали с помощью антиген-специфичных анализов связывания, как описано выше, а клетки, положительные по этому анализу, тестировали в анализе ERK-фосфорилирования «Alphascreen® SureFire®», и в анализе оценки аффинности «Octet», как описано ниже. Антитела 031, 035, 087 и 089 наращивали и культивировали по стандартным протоколам (например, как описано в Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., eds. *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., 2006).

Параллельно клонировали антитела 005, 006, 007, 008, 011, 012, 016, 017, 022, 024, 025, 028, 035, 039, 040, 045, 058, 061, 062, 063, 064, 065, 066, 068, 069, 078, 082, 084, 093,

095, 096, 098, 101, 104 и 181 с использованием системы «ClonePix» (Genetix, Гэмпшир, Великобритания). Специфические первичные луночные гибридомы высевали на полужидкую среду, приготовленную из 40% «CloneMedia» (Genetix, Гэмпшир, Великобритания) и 60% полной среды НуQ 2х (Hyclone, Уолтем, США), и выкалывали приблизительно 100 субклонов каждой первичной лунки. Субклоны тестировали в антигенспецифичном анализе связывания, как описано ранее, а уровень IgG измеряли с использованием «Octet» с целью отбора наиболее специфичного и продуктивного клона из первичной лунки для последующего наращивания. Следующее наращивание и культивирование полученных в результате гибридом «HuMab» проводили по стандартным протоколам (например, как описано в Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006).

Пример 10. Масс-спектрометрия очищенных антител

Малую аликвоту 0,8 мл антитела, содержащего надосадочную жидкость гибридом из 6-луночной стадии или стадии «Hyperflask» очищали с помощью колонок «PhyTip», содержащих смолу с протеином G (PhyNexus Inc., Сан-Хосе, США) на рабочей станции «Sciclone ALH 3000» (Caliper Lifesciences, Хопкинтон, США). Колонки «PhyTip» использовали согласно инструкциям производителя, но буферы заменили на: Буфер для Связывания PBS (B. Braun, Medical B.V., Осс, Нидерланды) и Буфер для элюции 0.1M Глицин-HCl pH 2,7 (Fluka Riedel-de Haen, Букс, Германия). после очистки образцы нейтрализовали 2 М 2M Tris-HCl pH 9,0 (Sigma-Aldrich, Зейндрехт, Нидерланды). В ином случае в некоторых случаях большие объемы культуральной надосадочной жидкости очищали с помощью аффинной колоночной хроматографии с протеином А.

После очистки образцы поместили в 384-луночный планшет (Waters, планшет с 100 мкл квадратными лунками, part* 186002631). Образцы дегликозилировали в течение ночи при 37°C с помощью N-гликозидазы F. Добавляли DTT (15 мг/мл) (1 мкл/лунку) и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Образцы (5 или 6 мкл) обессоливали на «Acquity UPLC™» (Waters, Милфорд, США) с помощью колонки a ВЕН300 C18, 1.7цт, 2.1x 50 мм при 60°C. Воду MQ и ацетонитрил категории LC-MS (Biosolve, cat no 01204101, Валкенсваард, Нидерланды), оба с 0,1% муравьиной кислотой (Fluka, cat no 56302, Букс, Германия), использовали в качестве Элюентов А и В, соответственно. Масс-спектры с времяпролетной ионизацией электрораспылением записывали в режиме реального времени на масс-спектрометре «micrOTOF™» (Bruker, Бремен, Германия), функционирующем в режиме положительных ионов. До анализа шкалу 900-3000 m/z калибровали с помощью смеси для Настройки «ES» (Agilent Technologies, Санта-Клара,

США). Масс-спектры подвергали деконволюции с помощью программного обеспечения «DataAnalysis™ software v. 3.4» (Bruker) при использовании алгоритма максимальной энтропии для поиска молекулярных масс между 5 и 80 кДа.

После деконволюции полученные массы тяжелой и легкой цепей для всех образцов сравнивали для обнаружения дублирующих антител. В сравнении тяжелых цепей было принято во внимание возможное присутствие вариантов с С-концевым лизином. Был получен список уникальных антител, в котором уникальные определены как уникальная комбинация тяжелой и легкой цепей. В случае если дублированные антитела были найдены, результаты из других тестов использовали для решения, какое из антител является лучшим материалом для продолжения экспериментов.

Пример 11. Анализ и клонирование в экспрессирующие векторы последовательностей переменных доменов антитела против c-Met

Общую РНК HuMab против c-Met получали из 5×10^6 клеток гибридомы, а 5'-RACE-комплементарную ДНК (кДНК) получали из 100 нг общей РНК, с помощью набора «SMART RACE cDNA Amplification kit» (Clontech), согласно инструкциям производителя. Кодировующие области VH (вариабельная область тяжелой цепи) и VL (вариабельная область легкой цепи) амплифицировали ПЦР и в рамке считывания клонировали в векторы с константной областью pGlf (содержащий оптимизированную по кодонам, полностью синтетическую, константную область тяжелой цепи человеческого IgG1 (аллотип f) в экспрессирующем в млекопитающих векторе pEE6.4 (Lonza Biologies, Слау, Великобритания (Bebbington et al. (1992) *Biotechnology* 10:169-175)) и pKappa (содержащий оптимизированную по кодонам, полностью синтетическую, константную область человеческой легкой цепи каппа (аллотип Km3) в экспрессирующем в млекопитающих векторе pEE12.4 (Lonza Biologies, Слау, Великобритания (Bebbington et al. (1992) *Biotechnology* 10:169-175)) с помощью независимой от лигирования стратегии клонирования (Aslanidis et al. *Nucleic Acids Res.* 18:6069-6074). Для каждого HuMab 12 клонов VL и 8 клонов VH секвенировали и их теоретические массы рассчитывали и сравнивали с доступными масс-спектрометрическими данными по антителам. Последовательности даны в перечне последовательностей и в таблице 1 в данном документе ниже. Последовательности CDR определяли согласно Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). В таблицах 2 и 3 дан обзор информации о последовательностях антител и большинстве гомологичных зародышевых последовательностей.

Таблица 1. Последовательности варибельной области тяжелой цепи (VH), варибельной области легкой цепи (VL) и последовательности CDR из HuMab

SEQ ID No: 1	VH 005	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYGFGWVRQAPGQGLEWMGRISPILGIANY AQMFGQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDVG YDWPDTFDI WGQGT MVIV SS
SEQ ID No: 2	VH 005, CDR1	SYGFG
SEQ ID No: 3	VH 005, CDR2	RISPILGIANYAQMFGQ
SEQ ID No: 4	VH 005, CDR3	DVG YDWPDTFDI
SEQ ID No: 5	VL 005	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR FSGGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN SFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 6	VL 005, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 7	VL 005, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 8	VL 005, CDR3	QQYNSFPPT
SEQ ID No: 9	VH 006	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SFGIGWVRQAPGQGLEWMGRIFPILGTANY AQMFGQGRVTITADKSTSTAYMELTSLRSED TAVYYCARDVG YDSADA FDI WGQGT MVTV SS
SEQ ID No: 10	VH 006, CDR1	SFGIG
SEQ ID No: 11	VH 006, CDR2	RIFPILGTANYAQMFGQ
SEQ ID No: 12	VH 006, CDR3	DVG YDSADA FDI
SEQ ID No: 13	VL 006	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN SYPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 14	VL 006, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 15	VL 006, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 16	VL 006, CDR3	QQYNSYPPT
SEQ ID No: 17	VH 008	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSETRY SPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARQEITGEFDYW GQGT LVT VSS
SEQ ID No: 18	VH 005, CDR1	SYWIG
SEQ ID No: 19	VH 008, CDR2	IIYPGDSETRYSPSFQG
SEQ ID No: 20	VH 008, CDR3	QEITGEFDY
SEQ ID No: 21	VL 008	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSY PRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 22	VL 008, CDR1	RASQGISSALA
SEQ ID No: 23	VL 008, CDR2	DASSLES
SEQ ID No: 24	VL 008, CDR3	QQFNSYPRT

SEQ ID No: 25	VH 022	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARELLWFGELW GYFDLWGRGTLVTVSS
SEQ ID No: 26	VH 022, CDR1	SYAMH
SEQ ID No: 27	VH 022, CDR2	VISYDGSNKYYADSVKG
SEQ ID No: 28	VH 022, CDR3	ELLWFGELWGYFDL
SEQ ID No: 29	VL 022	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQHKGPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQEASS FTWTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 30	VL 022, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 31	VL 022, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 32	VL 022, CDR3	QEASSFTWT
SEQ ID No: 33	VH 024	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSSGGSTY YVDSVKGRFTISRANSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDLDRGWMG YFGYWGQGTTLVTVSS
SEQ ID No: 34	VH 024, CDR1	SYAMS
SEQ ID No: 35	VH 024, CDR2	AISGSSGGSTYYVDSVKG
SEQ ID No: 36	VH 024, CDR3	DLDRGWMGYFGY
SEQ ID No: 28	VL 024	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQHKGPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAN SFPTFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 38	VL 024, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 39	VL 024, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 40	VL 024, CDR3	QQANSFPT
SEQ ID No: 41	VH 035	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDS DTRY SPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWNSLKASDT AMYVCARQEITGEFDYW GQGTTLVTVSS
SEQ ID No: 42	VH 035, CDR1	SYWIG
SEQ ID No: 43	VH 035, CDR2	IYPGDS DTRYSPSFQG
SEQ ID No: 44	VH 035, CDR3	QEITGEFDY
SEQ ID No: 45	VL 035	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES GVP SRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSY PMYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No: 46	VL 035, CDR1	RASQGISSALA
SEQ ID No: 47	VL 035, CDR2	DASSLES
SEQ ID No: 48	VL 035, CDR3	QQFNSYPMYT
SEQ ID No: 49	VH 045	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGITYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDRGWGSDYW GQGTTLVTVSS
SEQ ID No: 50	VH 045, CDR1	SYAMS
SEQ ID No: 51	VH 045, CDR2	VISGSGGITYYADSVKG
SEQ ID No: 52	VH 045, CDR3	DRGWGSDY

SEQ ID No: 53	VL 045	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSY LAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF SGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSN WPFTFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 54	VL 045, CDR1	RASQSVSSYLA
SEQ ID No: 55	VL 045, CDR2	DASNRAT
SEQ ID No: 56	VL 045, CDR3	QQRSNWPFT
SEQ ID No: 57	VH 058	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS DYMYWVRQTPEKRLEWVATISDDGSYTY YPDSVKGRFTISRDNANKNNLYLQMSSLKSE DTAMYYCAREGLYYYGSGSYYNQDYWGQ GTLTVSS
SEQ ID No: 58	VH 058, CDR1	DYMY
SEQ ID No: 59	VH 058, CDR2	TISDDGSYTYYPDSVKG
SEQ ID No: 60	VH 058, CDR3	EGLYYYGSGSYYNQDY
SEQ ID No: 61	VL 058	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSA LAWYRQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFTSYP QITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 28	VL 058, CDR1	RASQGLSSALA
SEQ ID No: 63	VL 058, CDR2	DASSLES
SEQ ID No: 64	VL 058, CDR3	QQFTSYPQIT
SEQ ID No: 65	VH 061	QLQLQESGSLVKPSQTLSTCAVSGGSISS GGHSWSWIRQPPGKGLEWIGX1IYHSGNTY DNPSLKSRTIAVDRSKNQLSLKLSFLTAAD TAVYYCARSSYDFLTDWG QGTLTVSS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 66	VH 061, CDR1	SGGHSWS
SEQ ID No: 67	VH 061, CDR2	X1IYHSGNTYDNPSLKS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 68	VH 061, CDR3	SSYDFLTD
SEQ ID No: 69	VL 061	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQHKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAN GFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 70	VL 061, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 71	VL 061, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 72	VL 061, CDR3	QQANGFPIT
SEQ ID No: 73	VH 062	QLQLQESGSLVKPSQTLSTCAVSGGSISS GGHSWSWIRQPPGKGLEWIGX1IYHSGNTY DNPSLKSRTIAVDRSKNQLSLKLSFVTAAD TAVYYCARSSYDILTDWGQGTLTVSS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 74	VH 062, CDR1	SGGHSWS
SEQ ID No: 75	VH 062, CDR2	X1IYHSGNTYDNPSLKS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 76	VH 062, CDR3	SSYDILTD

SEQ ID No: 77	VL 062	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGISS WLA WYQHKGPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAN GFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 78	VL 062, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 79	VL 062, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 80	VL 062, CDR3	QQANGFPIT
SEQ ID No: 81	VH 064	QLQLQESGSLVKPSQTLSTCAVSGGSISS GGHSWSWIRQPPGKGLEWIGX1IYHSGNTY DNPSLKS RVTISVDRSKNQVSLKLSSVTAAD TAVYYCARSSYDILTDWGQGT LVTVSS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 82	VH 064, CDR1	SGGHSWS
SEQ ID No: 83	VH 064, CDR2	X1IYHSGNTYDNPSLKS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 84	VH 064, CDR3	SSYDILTD
SEQ ID No: 85	VL 064	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGISS WLA WYQHKGPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAN GFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 86	VL 064, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 87	VL 064, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 88	VL 064, CDR3	QQANGFPIT
SEQ ID No: 89	VH 068	QLQLQESGSLVKPSQTLSTCAVSGGSISS GGYSWSWIRQPPGKGLEWIGXHYHSGSTYY NPSLKS RVTISVDRSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARSSYDILTDW GQGT LVTVSS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 90	VH 068, CDR1	SGGYSWS
SEQ ID No: 91	VH 068, CDR2	X1IYHSGSTYYNPSLKS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 92	VH 068, CDR3	SSYDILTD
SEQ ID No: 93	VL 068	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGISS WLA WYQHKGPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAN SFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 94	VL 068, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 95	VL 068, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 96	VL 068, CDR3	QQANSFPIT
SEQ ID No: 97	VH 069	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFT SYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAYNGYTN YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGT LVTVS S
SEQ ID No: 98	VH 069, CDR1	SYGIS
SEQ ID No: 99	VH 069, CDR2	WISAYNGYTN YAQKLQG
SEQ ID No: 100	VH 069, CDR3	DLRGTNYFDY

SEQ ID No: 101	VL 069	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGISEN WLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAN SFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 102	VL 069, CDR1	RASQGISNWL
SEQ ID No: 103	VL 069, CDR2	AASSLLS
SEQ ID No: 104	VL 069, CDR3	QQANSFPIT
SEQ ID No: 105	VH 096	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDSSTRY SPSFQGGVTSADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARQEITGDFDYWGQGTLLTVSS
SEQ ID No: 106	VH 096, CDR1	SYWIG
SEQ ID No: 107	VH 096, CDR2	IYPGDSSTRYSPSFQG
SEQ ID No: 108	VH 096, CDR3	QEITGDFDY
SEQ ID No: 109	VL 096	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSA LAWYQQKPGKAPNLLIYAASSLESQVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSY PLTFGGGGTKVEIK
SEQ ID No: 110	VL 096, CDR1	RASQGISSALA
SEQ ID No: 111	VL 096, CDR2	AASSLES
SEQ ID No: 112	VL 096, CDR3	QQFNSYPLT
SEQ ID No: 113	VH 098	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTF TNFGISWVRQAPGQGLEWMGWISAFNGHT DYSQKVQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVFYCARSHYYGSGSPFDYWGQGTLLV TVSS
SEQ ID No: 114	VH 098, CDR1	NFGIS
SEQ ID No: 115	VH 098, CDR2	WISAFNGHTDYSQKVQG
SEQ ID No: 116	VH 098, CDR3	SHYYGSGSPFDY
SEQ ID No: 117	VL 098	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISEN WLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYK SYPWTFGQGGTKVEIK
SEQ ID No: 118	VL 098, CDR1	RASQGISNWL
SEQ ID No: 119	VL 098, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 120	VL 098, CDR3	HQYKSYPT
SEQ ID No: 121	VH 101	QVQLVQSGGEVKKPGASVKVSCASGYTF TRHGITWVRQAPGQGLEWMGWISADNGNT NYAQKFQDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVFYCARVFRYFDWLLPYFDYWGQGT LTVST
SEQ ID No: 122	VH 101, CDR1	RHGIT
SEQ ID No: 123	VH 101, CDR2	WISADNGNTNYAQKFQD
SEQ ID No: 124	VH 101, CDR3	VFRYFDWLLPYFDY
SEQ ID No: 125	VL 101	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYGVSFRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSPYTFGQGGTKLEIK
SEQ ID No: 126	VL 101, CDR1	RASQSVSSSYLA
SEQ ID No: 127	VL 101, CDR2	GVFSRAT
SEQ ID No: 128	VL 101, CDR3	QQYGSSPYT

SEQ ID No: 129	VH 181	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYNGYT NYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARDLRGTAYFDYWGQGTLLTV SS
SEQ ID No: 130	VH 181, CDR1	SYGIS
SEQ ID No: 131	VH 181, CDR2	WISTYNGYTNIAQKLQG
SEQ ID No: 132	VH 181, CDR3	DLRGTAIFYD
SEQ ID No: 133	VL 181	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQG ISNWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQAN SFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 134	VL 181, CDR1	RASQGISNWL
SEQ ID No: 135	VL 181, CDR2	AASSLLS
SEQ ID No: 136	VL 181, CDR3	QANSFPIT
SEQ ID No: 137	VH 066	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTFT SYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAYNGYTN YIAQKLQGRVTMTADTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGTLLTV SS
SEQ ID No: 138	VL 066	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQG ISNWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQAN SFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 139	VH 065	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTFT NYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAYNGYTN YIAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSD DTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGTLLTVS S
SEQ ID No: 140	VL 065	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQG ISNWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQAN SFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 141	VH 082	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFT SYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAYNGYTN YIAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGTLLTVS S
SEQ ID No: 142	VL 082	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQG ISNWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQAN SFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 143	VH 089	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFT SYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAYNGYTN YIAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGTLLTVS S
SEQ ID No: 144	VL 089	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQG ISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQAN SFPITFGQGRLEIK

SEQ ID No: 145	VH 031	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYGFGWVRQAPGQGLEWMGRISPILGITNY AQMFGQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDVGYPDWDPTFDIWGQGTMVIV SS
SEQ ID No: 146	VL 031	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR FSGGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN SFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 147	VH 007	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYGIGWVRQAPGQGLEWMGRIFPILGTANY AQMFGQGRVTITADKSTSTAYIELTSLRSED AVYYCARDVGYSADAFDIWGQGTMTVS S
SEQ ID No: 148	VL 007	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN SYPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 149	VH 011	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYGIGWVRQAPGQGLEWMGRVFPILGTAN YAQMFGQGRVTITADKSTSTAYMELTSLRSE DTAVYYCARDVGYSADAFDIWGQGTMTV VSS
SEQ ID No: 150	VL 011	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN SYPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 151	VH 017	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYAMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKY FADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARELLWFGELWGYFDLWGRGTL VTVSS
SEQ ID No: 152	VL 017	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQEANS FTWTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 153	VH 025	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYAMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSSKD YADSVKGRFTIFRDNSKNTLYLQMSSLRAA DTAVYYCARELLWFGELWGYFDLWGRGTL VTVSS
SEQ ID No: 154	VL 025	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTNS FTWTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 155	VH 040	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGITYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDRGWGS DYWGQGT LVTVSS

SEQ ID No: 156	VL 040	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSY LAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF SGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSN WPFTFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 157	VH 039	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN NYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGITY YADSEKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDRGWGSDCWGQGTLLTVSS
SEQ ID No: 158	VL 039	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSY LAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF SGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSN WPFTFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 159	VH 078	QLQLQESGSGLVKPSQTLSTCAVSGGSISS GGHSWSWIRQPPGKGLEWIGLYHSGNTYY NPSLKSRVTISVDRSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARSSYDILTDWGQGILTVTVSS
SEQ ID No: 160	VL 078	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAN SFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 161	VH 084	QLQLQESGSGLVKPSQTLSTCGVSGGSISS GGHSWSWIRQPPGKGLEWIGLYHSGNTYY NPSLKSRVTISVDRSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARSSYDILTDWGQGILTVTVSS
SEQ ID No: 162	VL 084	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAN SFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 163	VH 063	QLQLQESGSGLVKPSQTLSTCAVSGGSISS GGHSWSWIRQPPGKGLEWIGCIYHSGNTYD NPSLKSRVTIAVDRSKNQSLKLSFVTAADT AVYYCARSSYDILTDWGQGILTVTVSS
SEQ ID No: 164	VL 063	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAN GFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 165	VH 087	QLQLQESGSGLVKPSQTLSTCAVSGGSISS GGHSWSWIRQPPGKGLEWIGCIYHSGNTYD NPSLKSRVTISVDRSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARSSYDILTDWGQGILTVTVSS
SEQ ID No: 166	VL 087	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAN GFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 167	VH 016	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYIFTS YWIGWVRQMPGKGLEWMGIHYPGDS TRY SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARQEVTGDFDYWGQGTLLTVTVSS
SEQ ID No: 168	VL 016	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSY PLTFGGGGTKVEIK

SEQ ID No: 169	VH 028	EVQLVQSGGEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARQEVTGDFDYWGQGT LVTVSS
SEQ ID No: 170	VL 028	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSY PLTFGGG TKVEIK
SEQ ID No: 171	VH 012	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARQEITGEFDYWGQGT LVTVSS
SEQ ID No: 172	VL 012	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSY PRTFGG G TKVEIK
SEQ ID No: 173	VH 095	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS NTRY SPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARQEITGDFDYW GQGT LVTVSS
SEQ ID No: 174	VL 095	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSA LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSY PLTFGGG TKVEIK
SEQ ID No: 175	VH 093	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARQEITGDFDYW GQGT LVTVSS
SEQ ID No: 176	VL 093	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSA LAWYQQKPGKAPNLLIYAASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSY PLTFGGG TKVEIK
SEQ ID No: 177	VH 104	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFIS YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRY SPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARQEITGDFDYW GQGT LVTVSS
SEQ ID No: 178	VL 104	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSA LAWYQQKPGKAPKLLIYVASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQFNSY PITFGQG TRLEIK

Таблица 2. Гомологии мышиногo первоисточника и последовательностей тяжелых цепей

Антитело	номер мыши	мышинная линия	зародышевый VH
TH1016-005	339732	HCol2B, CI	IgHV1-69-4
TH1016-006	339732	HCol2B, CI	IgHV1-69-4
TH1016-008	339732	HCol2B, CI	IgHV5-51-1
TH1016-022	339733	HCol2B, CI	IgHV3-30-3*1
TH1016-024	339733	HCol2B, CI	IgHV3-23-1
TH1016-035-D09	339732	HCol2B, CI	IgHV5-51-1

Антитело	номер мыши	мышинная линия	зародышевый VH
TH1016-045	339282	HCo17, CI	IgHV3-23-1
TH1016-058	343191	HCo12B, C2	IgHV3-II-3
TH1016-061	348072	HCo20, C2	IgHV4-30-2*1
TH1016-062	348072	HCo20, C2	IgHV4-30-2*1
TH1016-064	348072	HCo20, C2	IgHV4-30-2*1
TH1016-068	348072	HCo20, C2	IgHV4-30-2*1
TH1016-069	348072	HCo20, C2	IgHV1-18-1
TH1016-096	339732	HCo12B, C1	IgHV5-51-1
TH1016-098	347330	HCo20, C2	IgHV1-18-1
TH1016-101	340659	HCo20, C1	IgHV1-18-1
TH1016-181	348072	HCo20, C2	IgHV1-18-1

Таблица 3. Гомологии мышиногo первоисточника и последовательностей легких цепей

Антитело	номер мыши	мышинная линия	зародышевая линия
PC1016-005	339732	HCo12B, CI	IGKV1D-16*01
PC1016-006	339732	HCo12B, CI	IGKV1D-16*01
PC1016-008	339732	HCo12B, CI	IGKV1-13*02
PC1016-022	339733	HCo12B, CI	IGKV1-12*01
PC1016-024	339733	HCo12B, CI	IGKV1-12*01
P1016-035	339732	HCo12B, CI	IGKV1-13*02
PC1016-045	339282	HCo17, CI	IGKV3-11*01
PC1016-058	343191	HCo12B, C2	IGKV1-13*02
PC1016-061	348072	HCo20, C2	IGKV1-12*01
PC1016-062	348072	HCo20, C2	IGKV1-12*01
PC1016-064	348072	HCo20, C2	IGKV1-12*01
PC1016-068	348072	HCo20, C2	IGKV1-12*01
PC1016-069	348072	HCo20, C2	IGKV1-12*01
PC1016-096	339732	HCo12B, CI	IGKV1-13*02
PC1016-098	347330	HCo20, C2	IGKV1D-16*01
PC1016-101	340659	HCo20, CI	IGKV3-20*01
PC1016-181	348072	HCo20, C2	IGKV1-12*01

На фигурах 1 и 2 представлено выравнивание последовательностей HuMabs. На основании этих последовательностей может быть определена консенсусная последовательность для последовательностей CDR. Эти консенсусные последовательности представлены в таблице 4.

Таблица 4. Консенсусные последовательности

SEQ ID No: 179 005-006	IgHV1-69-4	CDR1	SX1X2X3X4	где X1=Y или F, X2=A или G, X3 = F или I, X4 = S или G. Предпочтительно, если X1=Y олиг F, X2 = G, X3 = F или I и X4=G.
------------------------------	------------	------	-----------	--

SEQ ID No: 180 005-006	IgHV1-69-4	CDR2	RXIX2PILGX3X4NYAQ X5FQG	где X1=I или V, X2 = I,S или F, X3=I или T, X4=A или T, X5 = K или M. Предпочтительно, если X1=I или V, X2=S или F, X3=I или T, X4=A или T и X5 = M.
SEQ ID No: 181 005-006	IgHV1-69-4	CDR3	DVGYDX1X2DX3FDI	где X1=W или S, X2 = P или A, X3=T или A
SEQ ID No: 182 008-035	IgHV5-51-1	CDR2	IIYPGDSXITRYSPSFQG	где X1 = D, E или N
SEQ ID No: 183 008-035-096	IgHV5-51-1	CDR3	QEX1TGX2FDY	где X1=V или I, X2 = E или D
SEQ ID No: 184 022	IgHV3-30-3*1	CDR2	X1ISYDGSX2KX3X4AD SVKG	где X1=V или F, X2 = N или S, X3 = D или Y, X4=Y или F
SEQ ID No: 185 024	IgHV3-23-1	CDR2	AISGSX1GGSTYYX2DS VKG	где X1 = S или отсутствие ак, X2=V или A
SEQ ID No: 186 045	IgHV3-23-1	CDR1	X1YAMX2	где X1 = S или N, X2=S или T
SEQ ID No: 187 045	IgHV3-23-1	CDR2	X1ISGSGGX2TYYADS X3KG	где X1=A или V, X2 = S или I, X3=V или E. Предпочтительно, где X1=A или V, X2 = I и X3=V или E.
SEQ ID No: 188 045	IgHV3-23-1	CDR3	DRGWGSDX1	где X1=Y или C
SEQ ID No: 189 058	IgHV3-11-3	CDR1	DYYMX1	где X1=Y или S
SEQ ID No: 190 058	IgHV3-11-3	CDR2	X1ISX2X3X4SYTX5YX 6DSVKG	где X1=T или Y, X2 = D или S, X3= D или S, X4 = G или S, X5=Y или N, X6 = P или A
SEQ ID No: 191 062-064-068	IgHV4-30-2*1	CDR1	SGGX1SWS	где X1=Y или H
SEQ ID No: 192 062-064-068	IgHV4-30-2*1	CDR2	X1X2YHSGX3TYX4NPS LKS	где X1=любая аминокислота, предпочтительно C, Y, S или A, X2 = I или L, X3=S или N, X4=Y или D
SEQ ID No: 193 062-064-068	IgHV4-30-2*1	CDR3	SSYDX1LTD	где X1=F или I

SEQ ID No: 194 069-181	IgHVI-18-1	CDR1	X1YGIS	где X1=S или N
SEQ ID No: 195 069-181	IgHVI-18-1	CDR2	WISX1YNGX2TNYAQK LQG	где X1=A или T, X2 = N или Y. Предпочтительно, где X1=A или T и X2=Y
SEQ ID No: 196 069-181	IgHVI-18-1	CDR3	DLRGTX1YFDY	где X1=A или N
SEQ ID No: 197 098	IgHVI-18-1	CDR1	X1X2GIS	где X1 = N или S, X2 = F или Y
SEQ ID No: 198 098	IgHVI-18-1	CDR2	WISAX1NGX2TX3YX4 QKX5QG	где X1 = F или Y, X2 = H или N, X3 = D или N, X4=S или A, X5=V или L
SEQ ID No: 199 101	IgHVI-18-1	CDR1	X1X2GIX3	где X1 = R или S, X2 = H или Y, X3=T или S
SEQ ID No: 200 101	IgHVI-18-1	CDR2	WISAX1NGNTNYAQK X2QX3	где X1 = D или Y, X2 = F или L, X3 = D или G
SEQ ID No: 201 101	IgHVI-18-1	CDR3	VX1RYFDWLLX2YFDY	где X1 = F или L, X2 = P или отсутствие ак
SEQ ID No: 202 005-006	IGKV1D- 16*01	CDR3	QQYNSX1PX2T	где X1=Y или F, X2 = P или W. Предпочтительно, где X1=Y или F и X2 = P
SEQ ID No: 203 008-035	IGKV1- 13*02	CDR2	X1ASSLES	где X1 = D, V или A
SEQ ID No: 204 008-035	IGKV1- 13*02	CDR3	QQFNSYPLX1T	где X1 = R, I, L, W или MY
SEQ ID No: 205 022	IGKV1- 12*01	CDR3	QX1X2X3SFX4WT	где X1 = Q или E, X2=A или T, X3 = N или S; X4 = P или T
SEQ ID No: 206 024	IGKV1- 12*01	CDR3	QQANSFPX1T	где X1=I или отсутствие ак
SEQ ID No: 207 058	IGKV1- 13*02	CDR3	QQFX1SYPX2IT	где X1=T или N, X2 = Q или отсутствие ак
SEQ ID No: 208 062-064- 068	IGKV1- 12*01	CDR3	QQANX1FPIT	где X1 = G или S
SEQ ID No: 209 069-181	IGKV1- 12*01	CDR1	RASQGISX1WLA	где X1=S или N

SEQ ID No: 210 069-181	IGKV1- 12*01	CDR2	AASSLX1S	где X1=Q или L
SEQ ID No: 211 098	IGKV1D- 16*01	CDR3	X1QYX2SYPWT	где X1 = H или Q, X2 = K или N
SEQ ID No: 212 101	IGKV3- 20*01	CDR2	GX1X2SRAT	где X1=V или A, X2 = F или S

Пример 12. Очистка антител

Культуральную надосадочную жидкость фильтровали через 0,2 мкм тупиковый фильтр и наносили на 5 мл колонки «MabSelect SuRe» (GE Health Care) и элюировали 0,1 М цитратом натрия - NaOH, pH 3. Элюат немедленно нейтрализовали 2 М Tris-HCl, pH 9 и диализовали в течение ночи против 12,6 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, pH 7,4 (B.Braun). В ином случае, после очистки элюат наносили на колонку «HiPrep Desalting column» и заменяли в антителах буфер на 12,6 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, pH 7,4 (B.Braun). После диализа или замены буфера образцы стерильно фильтровали через 0,2 мкм тупиковые фильтры. Чистоту определяли посредством ДСН-ПААГ, а концентрацию измеряли нефелометрией и по поглощению при 280 нм. Очищенные антитела хранили при 4°C. Масс-спектрометрию осуществляли для идентификации молекулярной массы тяжелой и легкой цепей антител, экспрессируемых гибридами, как описано в примере 10.

Пример 13. Связывание клонов анти-с-Met с опухолевыми клетками, которые экспрессируют мембраносвязанный с-Met, измеренное посредством анализа FACS

Связывание антител с-Met и их моновалентных форм (также называемых в данном документе «молекулами UniBody» см. пример 5) с клетками A431, экспрессирующими мембраносвязанный с-Met (приобретенными у ATCC, CRL-1555), проверяли с помощью проточной цитометрии (FACS Canto II, BD Biosciences). Анализ «Qifi» (Dako, Глоструп, Дания) выявил, что клетки A431 экспрессируют в среднем 30 000 копий белка с-Met на клетку. Связывание антител против с-Met и молекул «UniBody» определяли с помощью конъюгированных с фикоэритрином козьих антител, связывающих человеческие IgG (Jackson). IgG1-5D5 использовали в качестве положительного контрольного антитела, а HuMab-KLN использовали в качестве антитела изотипного контроля. Значения EC₅₀ определяли посредством нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая «доза-эффект» с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения «GraphPad Prism V4.03» (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

На фигуре 3 показано, что все протестированные антитела и молекулы «UniBody» против с-Met связывают с-Met, экспрессируемый на клетках A431 дозозависимым

способом. Значения EC_{50} для связывания варьируют в диапазоне 0,28-1,92 нМ для IgG и 0,52-13,89 нМ для молекул «UniBody». Интересно, что антитело IgG1-024 продемонстрировало высокие уровни ненасыщенного связывания с клетками A431, которое не наблюдалось при тестировании связывания с клетками HT-29 (приобретенных у ATCC, НТВ-38™) (данные не представлены). Для антител 022, 024, 062, 064, 069, 098, 101 и 181, снижения EC_{50} не наблюдалось или наблюдалось менее чем 2 кратное снижение между IgG1 и молекулами «UniBody» идентичных клонов. Также уровни максимального связывания не менялись у IgG1 и молекул «UniBody». Для антител 005, 006, 008, 035, 045 и 058, с другой стороны, при сравнении IgG1 с эквивалентным «UniBody» наблюдали больше чем 2 кратное уменьшение значения EC_{50} , а также уменьшение уровня максимального связывания. Это, по всей вероятности, произошло из-за более низких скоростей диссоциации (K_d) этих антител (см. пример 14).

Пример 14. Анализ «Octet» для ранжирования аффинности

Связывание антитела с cMetECDHis анализировали посредством технологии «Bio-Layer Interferometry» (BLI) на системе «Octet» (Fortebio, Менло-Парк, США). Биосенсоры, покрытые антителами к человеческим IgG (Fc-специфичными) использовали для захвата антител против c-Met согласно процедуре, рекомендованной изготовителем. cMetECDHis, полученный из клеток HEK293, наносили сверху на иммобилизованные антитела против c-Met путем помещения загруженного биосенсора в лунку, содержащую 10 мкл/мл cMetECDHis разведенного в 10 раз в буфере для измерения кинетики (Fortebio). Различие в отражении света ($\Delta\lambda$, нм) поверхности биосенсора из-за связывания с cMetECDHis измеряли в реальном времени в течение примерно 10 минут, а для расчета константы ассоциации (k_a [1/М x с]) использовали программное обеспечение «Octet» (V4.0, Fortebio). Затем загруженный биосенсор помещали в лунку, содержащую только буфер для измерения кинетики (разведенный в 10 раз в PBS) для определения константы диссоциации (k_d [1/с]). Анализ кинетики осуществляли для определения аффинности (K_D [М]) при использовании модели 1:1 (ленгмюр). В качестве положительного контроля использовали 0,2 мкг/мл IgG15D5, продуцируемого клетками HEK293.

В таблице 5 показано, что все антитела против c-Met связывают cMetECDHis с наномолярными аффинностями в диапазоне 0,6-13,9 нМ.

Таблица 5. Кинетические константы (k_a , k_d и K_D) антител при связывании с cMetECDHis

Клон	K_a [1/Мс]	k_d [1/с]	K_D [М]
5D5	2,14E+05	1,25E-03	5,86E-09
005	3,18E+05	2,52E-03	7,92E-09
006	4,25E+05	4,20E-03	9,89E-09

Клон	K_a [1/Мс]	k_d [1/с]	K_D [М]
008	3,08E+05	1,57E-03	5,12E-09
022	2,36E+05	2,51E-04	1,06E-09
024	1,45E+05	2,28E-04	1,57E-09
035	2,64E+05	3,68E-03	1,39E-08
045	7,21E+05	2,07E-03	2,87E-09
058	4,64E+05	1,25E-03	2,70E-09
061	2,56E+05	1,53E-04	5,96E-10
062	2,73E+05	3,19E-04	1,17E-09
064	2,84E+05	3,24E-04	1,14E-09
068	3,21E+05	1,35E-03	4,21E-09
069	2,12E+05	2,67E-04	1,26E-09
096	1,96E+05	5,00E-04	2,55E-09
098	1,64E+05	2,97E-04	1,82E-09
101	1,69E+05	2,14E-04	1,27E-09
181	2,37E+05	5,31E-04	2,23E-09

Пример 15. Связывание антител против с-Met с мембрано-связанным с-Met на эпителиальных клетках макак-резусов, измеренное анализом FACS

Для определения кросс-реактивности с с-Met макак-резусов, связывание антител против с-Met с с-Met-положительными эпителиальными клетками макак-резусов (4MBr-5, приобретенными у ATCC) тестировали с помощью проточной цитометрии (FACS Canto II, BD Biosciences). Конъюгированное с фикоэритрином козье антитело против человеческих IgG (Jackson) использовали в качестве вторичного конъюгата. NuMab-KLN использовали в качестве изотипного контрольного антитела.

На фигуре 4 продемонстрировано, что все протестированные антитела против с-Met являются кросс-реактивными с с-Met макаки-резуса. В обеих протестированных концентрациях (0,5 мкг/мл и 10 мкг/мл) антитела против с-Met были способны специфически связывать с-Met макаки-резуса. Для всех антител, сигнал был, по меньшей мере, в 5 раз выше, чем для изотипного контрольного антитела NuMab-KLN. Интересно, что P1016-035 продемонстрировал намного более высокие верхние уровни флуоресценции (MFI ~200 000) по сравнению с другими специфичными к с-Met антителами. Это различие не наблюдалось на клеточных линиях, экспрессирующих человеческий рецептор с-Met.

Пример 16. Блокирование связывания HGF с внеклеточным доменом с-Met, определенное с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (тИФА)

Для анализа возможности антител против с-Met блокировать связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с рецептором с-Met осуществляли тИФА. Для этого прикрепленный внеклеточный домен с-Met инкубировали с немеченым антителом против с-Met и флуоресцентно меченым HGF. Неблокирующие антитела не конкурируют с меченым HGF за связывание с с-Met, что дает максимальный сигнал флуоресценции.

Блокирующие антитела конкурируют с меченным HGF за связывание с с-Met, что приводит к снижению флуоресцентного сигнала.

HGF (ProSpec Tany, Реховот, Израиль) флуоресцентно метили путем конъюгации с Европием³⁺ (PerkinElmer, Турку, Финляндия). Лунки для тИФА покрывали в течение ночи при 4°C 0,5 мкг/мл рекомбинантным человеческим внеклеточным доменом с-Met (R&D systems, Миннеаполис, США), разведенным в PBS. Затем лунки для тИФА отмывали PBST (PBS, дополненный 0,05% Tween-20 [Sigma-Aldrich, Звейндрахт, Нидерланды]) и блокировали в течение одного часа при комнатной температуре (КТ) PBST, дополненным 2% (об./об.) куриной сывороткой (Gibco, Пейсли, Шотландия). После отмывки PBST, лунки для тИФА инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре в темноте со смесью 50 мкл серийно разведенного антитела против с-Met (0,128-10000 нг/мл в 5-кратных разведениях) и HGF, конъюгированным с 50 мкл 0,44 мкг/мл Европия³⁺ в PBST. Затем несвязанный HGF, конъюгированный с Европием³⁺, отмывали PBST, а связанный HGF, конъюгированный с Европием³⁺, инкубировали в течение 30 минут при КТ в темноте с раствором «Delfia Enhancement Solution» (PerkinElmer) для усиления флуоресцентного сигнала. Среднюю интенсивность флуоресценции при 615 нм измеряли с помощью ридера «EnVision 2101 Multilabel reader» (PerkinElmer) со следующими устанавливаемыми параметрами: парное зеркало Lance/Delfia, фильтр эмиссии 615, фильтр возбуждения 340 нм, время задержки 400 мкс, окно 400 мкс, 100 вспышек, 2000 мкс на цикл и двунаправленное построчное считывание. Для определения значений IC₅₀, кривые связывания анализировали с помощью нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая «доза-эффект» с вариабельным наклоном, высшие значения ограничены общим значением для всех наборов данных) с помощью программного обеспечения «GraphPad Prism V4.03» (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

На фигуре 5 представлены характерные примеры кривых ингибирования связывания HGF антителами против с-Met, связывающими внеклеточный домен рекомбинантного человеческого с-Met. 5D5 использовали в качестве положительного контрольного антитела. Все антитела против с-Met в эксперименте продемонстрировали свою способность конкурировать с HGF, конъюгированным с Европием³⁺, за связывание с рекомбинантным с-Met. Значения IC₅₀ варьируют в диапазоне 0,0011-0,0794 мкг/мл. Без добавления HGF, конъюгированного с Европием³⁺, детектировали приблизительно 600 относительных флуоресцентных единиц (англ. relative fluorescent units, RFU), что указывает на уровень сигнала при достижении максимального ингибирования. Когда связывание HGF, конъюгированного с Европием³⁺, не ингибировалось, детектировали примерно ~66,000 RFU. Антитела 005, 006, 058, 101 и антитело положительного контроля

5D5 были способны ингибировать на 84,5-92,1% связывание HGF с рецептором с-Met. Все другие антитела были способны ингибировать связывание HGF с с-Met, по меньшей мере, на 55%. Поскольку HGF может связывать рецептор с-Met по обоим доменам SEMA и в Ig-области, некоторые антитела могут ингибировать только одно из этих взаимодействий. Для определения, какое из взаимодействий ингибировано, осуществляли анализ ингибирования на основе сMetSEMAHis резонансным переносом энергии флуоресценции с временным разрешением (англ. time-resolved fluorescence resonance energy transfer, TR-FRET).

Пример 17. Конкуренция антител против с-Met за связывание с растворимым сMetECDHis, измеренная с помощью сэндвич-тИФА.

Во-первых, определяли концентрации оптимального покрытия тестируемых антител против с-Met и оптимальную концентрацию сMetECDHis. Далее лунки для тИФА покрывали в течение ночи при 4°C HuMab против с-Met, серийно разведенными в PBS (8 мкг/мл в 2-кратных разведениях). Затем лунки для тИФА отмывали PBST (PBS, дополненный 0,05% Tween-20 [Sigma-Aldrich, Звейндрахт, Нидерланды]) и блокировали в течение одного часа при комнатной температуре (КТ) PBSTC (PBST, дополненный 2% (об./об.) куриной сывороткой [Gibco, Пейсли, Шотландия]). После этого, лунки для тИФА отмывали PBST и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с биотинилированными сMetECDHis серийно разведенными в PBSTC (1 мкл/мл в 2-кратных разведениях). Несвязанный биотинилированный сMetECDHis отмывали с PBST, и связанный биотинилированный сMetECDHis инкубировали в течение одного часа при КТ с 0,1 мкг/мл Стрептавидин-поли-HRP (Sanquin, Амстердам, Нидерланды) разведенным в PBST. После отмывки, реакцию визуализировали после 15 минутной инкубации с 2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислотой (ABTS: развести одну таблетку ABTS в 50 мл буфера ABTS [Roche Diagnostics, Алмер, Нидерланды]) при КТ с защитой от света. Окрашивание останавливали путем добавления равного объема щавелевой кислоты (Sigma-Aldrich, Звейндрахт, Нидерланды). Флуоресценцию при 405 нм измеряли с помощью ридера микротитрационных планшетов (Biotek Instruments, Винуски, США). Условия, которые приводили к субоптимальному (прим. 80%) связыванию каждого антитела, были определены и использованы для последующих экспериментов перекрестного блокирования.

Лунки для тИФА покрывали антителом против с-Met в субоптимальной дозе, как описано выше. После блокировки лунки для тИФА инкубировали с заданной концентрацией биотинилированного сMetECDHis в присутствии избытка антитела против с-Met. Реакция развивалась, как описано выше. Остаточное связывание было выражено

как процент относительно связывания, наблюдаемого в отсутствии антитела-конкурента.

Таблица 6. При добавлении в качестве конкурента, все антитела против с-Met были способны конкурировать за связывание с их иммобилизованными эквивалентами. 022, 058 и 5D5, при добавлении в качестве антител-конкурентов, конкурировали с антителами 005 и 006. Однако в обратной реакции выявили только частичную конкуренцию антител 005 и 006. Эти отличия могут быть объяснены более низкими аффинностями антител 005 и 006 к биотинилированному сMetECDHis. Антитело 5D5, при добавлении в качестве антитела-конкурента, также демонстрировало частичную конкуренцию с антителами 008 и 045, тогда как в обратной реакции не наблюдали или наблюдали минимальную конкуренцию. Кроме того, антитела 024, 062, 064, 068 и 181 при добавлении в качестве антител-конкурентов демонстрируют частичную конкуренцию с антителом 101, тогда как обратная реакция продемонстрировала полное ингибирование связывания сMetECDHis. Значения выше чем 100% могут быть объяснены эффектами avidности и образованием комплексов антитело-сMetECDHis, содержащим два неконкурирующих антитела.

Антитела 024, 062, 064, 068, 069, 098, 101 и 181 конкурируют друг с другом за связывание с сMetECDHis. Антитела 005, 006, 022 и 058 рассматривались как принадлежащие к одной перекрестно-блокирующей группе, которая отличается полной конкуренцией с 005, 006, 022, 058 и 5D5. Однако антитело 5D5 было единственным антителом, которое также было способно конкурировать за связывание с антителом 045. Другая группа антител, которые конкурируют за связывание с сMetECDHis, образована из 008, 035 и G11-HZ.

Таблица 6. Конкуренция антител против с-Met за связывание с биотинилированным сMetECDHis

Иммобилизованное антитело	Конкурирующее антитело							
	005	006	008	022	024	035	045	058
005	7,7	18,2	81,9	4,9	113,5	84,9	116,9	3,6
	±1,1	±3,6	±3,1	±1,3	±5,0	±0,2	±7,0	±0,1
006	11,3	14,6	58,8	4,6	113,3	67,5	114,5	3,6
	±0,9	±0,7	±2,2	±0,3	±1,0	±4,2	±3,5	±0,3
008	63,9	47,3	5,4	82,1	103,2	32,9	100,4	40,8
	±3,1	±1,2	±0,3	±3,0	±0,4	±1,0	±3,8	±0,8
022	37,9	60,5	94,1	3,8	99,4	92,4	95,7	5,8
	±3,9	±4,0	±3,5	±1,2	±4,8	±0,4	±3,5	±0,0
024	98,4	101,4*	104,2*	100,2*	5,4	108,1*	98,1*	102,8*
	±10,4	±16,7	±12,7	±9,0	±0,5	±5,8	±11,9	±12,8
035	36,7	33,0	7,2	54,6	121,4	10,6	125,0	18,5
	±1,0	±17,6	±1,7	±6,5	±27,8	±0,3	±16,8	±2,5
045	111,4	110,6	98,5	105,3	102,4	105,4	21,3	115,3*
	±1,5	±3,5	±3,1	±2,5	±5,6	±5,5	±0,1	±6,5

Иммобилизованное антитело	Конкурирующее антитело							
	005	006	008	022	024	035	045	058
058	31,4 ±3,6	43,6 ±2,1	90,2 ±2,5	6,8 ±0,3	109,0 ±4,1	90,1 ±5,4	111,7 ±4,9	4,0 ±0,2
062	95,8 ±5,1	95,2 ±6,8	97,4 ±5,3	94,6 ±4,0	7,3 ±2,9	90,6 ±11,5	97,0 ±3,0	94,4 ±4,3
064	90,4 ±1,9	90,1* ±1,4	94,6* ±0,5	94,2 ±3,6	7,5 ±2,5	83,5 ±12,2	95,0 ±4,9	95,5 ±0,6
068	101,1 ±7,6	98,5 ±6,7	101,7 ±5,5	99,6 ±4,0	4,7 ±2,3	88,6 ±12,7	100,4 ±9,0	101,5 ±5,1
069	102,3 ±11,2	100,3 ±12,3	102,1 ±12,8	97,8 ±12,5	6,6 ±4,1	91,7 ±27,3	99,8 ±14,4	100,6 ±14,1
098	99,6 ±6,3	97,9 ±6,7	99,8 ±4,2	95,8 ±5,4	12,9 ±4,2	89,4 ±20,6	96,7 ±3,7	98,6 ±2,9
101	91,5 ±7,2	89,7 ±7,9	94,0 ±6,3	90,7 ±5,3	40,5 ±5,4	96,7 ±1,9	94,7 ±5,1	93,1 ±5,2
181	95,9 ±7,8	93,7 ±8,4	98,7 ±5,8	92,5 ±7,4	4,3 ±1,9	96,0 ±9,6	96,8 ±6,7	98,9 ±9,8
5D5	42,3 ±14,7	58,8 ±19,4	90,2 ±9,9	12,4 ±4,7	94,2 ±9,7	98,1 ±13,4	83,9 ±3,2	6,6 ±3,2
G11-HZ	50,5 ±7,6	47,7 ±2,9	33,3 ±0,2	54,3 ±3,7	98,8 ±5,6	32,8 ±4,0	72,0 ±9,9	27,6 ±4,3

Конкуренция 75 -> 100%

Конкуренция 25 - 74%

конкуренция 0 - 24%

Иммобилизованное антитело	Конкурирующее антитело								G11-HZ
	062	064	068	069	098	101	181	5D5	
005	117,7 ±10,7	118,2 ±7,8	128,7 ±9,5	124,0 ±8,0	110,4 ±7,6	103,2 ±5,0	131,0 ±7,7	2,9 ±0,1	76,8 ±4,4
006	118,8 ±8,4	122,2 ±5,3	128,6 ±6,5	124,5 ±1,0	110,6 ±2,3	105,9 ±4,1	123,5 ±6,1	3,1 ±0,0	54,0 ±35,1
008	100,5 ±2,5	107,1 ±6,2	112,2 ±5,1	104,1 ±4,4	106,6 ±2,6	101,0 ±2,5	111,3 ±1,3	32,4 ±0,8	2,7 ±0,2
022	99,4 ±2,0	101,9 ±3,2	104,1 ±3,3	99,6 ±6,0	104,8 ±4,0	103,6 ±5,1	107,1 ±5,2	4,2 ±2,1	85,9 ±8,3
024	2,3 ±0,6	2,3 ±0,6	12,0 ±5,5	2,9 ±0,5	10,4 ±4,2	4,8 ±1,0	7,1 ±2,8	95,5* ±1,1	98,2* ±1,3
035	119,6 ±11,2	131,7 ±20,0	175,1 ±30,2	150,9 ±24,9	126,2 ±19,9	113,0 ±4,6	159,1 ±12,9	25,5 ±9,9	7,8 ±3,2
045	103,1 ±3,5	103,7 ±5,7	113,1 ±1,4	97,0 ±5,2	76,4 ±11,7	101,5 ±5,1	99,4 ±3,8	27,8 ±3,9	99,3 ±5,3
058	109,1 ±4,6	108,8 ±4,4	118,8 ±4,2	112,6 ±4,0	111,8 ±6,2	104,4 ±0,8	121,3 ±3,1	2,8 ±0,4	81,5 ±8,6
062	2,4 ±0,5	2,2 ±0,2	14,2 ±1,8	2,9 ±0,1	13,2 ±0,9	7,8 ±1,1	9,4 ±1,6	97,7 ±8,5	101,3 ±0,9
064	2,2 ±0,6	2,0 ±0,2	13,0 ±0,9	2,7 ±0,2	14,7 ±1,2	7,6 ±0,8	10,1 ±3,0	94,9* ±4,6	102,0 ±10,5

Иммобилизованное антитело	Конкурирующее антитело								
	062	064	068	069	098	101	181	5D5	G11-HZ
068	2,0 ±0,3	2,0 ±0,3	6,6 ±0,7	2,4 ±0,4	8,2 ±1,3	4,8 ±0,7	5,2 ±0,6	94,8 ±2,7	110,3 ±6,6
069	2,2 ±0,4	2,3 ±0,5	10,1 ±2,6	2,4 ±0,7	12,5 ±3,1	3,9 ±0,5	6,3 ±1,0	99,4 ±16,2	110,4 ±13,2
098	8,8 ±0,6	9,3 ±1,3	18,0 ±2,5	3,4 ±0,6	2,6 ±0,4	4,0 ±0,6	12,0 ±2,1	94,9 ±1,2	99,6 ±1,2
101	36,9 ±3,3	37,4 ±3,7	45,9 ±4,3	9,5 ±1,2	9,7 ±1,5	3,7 ±2,4	41,9 ±0,8	97,2 ±4,6	98,3 ±2,1
181	2,0 ±0,2	2,1 ±0,3	6,5 ±1,1	2,2 ±0,3	5,1 ±1,1	2,4 ±0,2	3,6 ±0,2	94,2 ±4,5	98,7 ±6,7
5D5	97,6 ±8,1	97,1 ±12,7	97,8 ±6,6	99,6 ±3,9	97,6 ±4,9	97,9 ±10,6	103,4 ±4,3	4,1 ±1,5	97,3
G11-HZ	95,3 ±3,1	99,2 ±0,6	102,6 ±1,3	95,0 ±8,4	96,2 ±11,8	90,1 ±6,8	101,1 ±5,2	29,1 ±9,2	2,6 ±0,4

Представленные данные являются процентом ингибирования связывания $\pm$ ст. откл. 3 независимых экспериментов. Для антител 035, 5D5 и G11-HZ перекрестно-блокирующий тИФА осуществляли только дважды. Кроме того, несколько конкурентных реакций (*) давших значения Оптимальной Плотности выше, чем 5,0, которые выше предела детекции ридера для тИФА. Эти результаты были исключены из анализа в результате повторных измерений.

Пример 18. Блокирование связывания HGF с cMetSEMA-567His8, определенное анализом резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением (TR-FRET)

HGF может связывать рецептор c-Met как в домене SEMA, так и в IgG-области. Однако только связывание HGF с доменом SEMA оказалось критическим для активации рецептора. По этой причине, с помощью технологии TR-FRET было исследовано взаимодействие антител против c-Met с доменом SEMA рецептора c-Met. Для осуществления данного анализа на основе однородного сближения, фактор роста гепатоцитов (HGF, ProSpec Tanyu, Реховот, Израиль) конъюгировали с флуоресцентным красителем-акцептором AlexaFluor-647 (Invitrogen, Бреда, Нидерланды). cMetSEMA-567His8 метили флуоресцентной донорной молекулой, направленной против гистиридиновой метки (Anti-6xhis Europium³⁺, PerkinElmer, Турку, Финляндия). Связывание HGF, конъюгированного с AlexaFluor-647, с меченным Европием³⁺ cMetSEMA-567His8 делает возможным перенос энергии с донорной молекулы (возбуждение 340 нм) на акцепторную молекулу (эмиссия 665 нм). Среднюю интенсивность флуоресценции при 665 нм измеряли на ридере «EnVision 2101 Multilabel reader» (PerkinElmer). Конкуренцию

немеченых антител против с-Met с HGF, конъюгированным с AlexaFluor-647, измеряли по уменьшению сигнала TR-FRET при 665 нм, из-за того, что в несвязанном состоянии дистанция между донорным и акцепторным флуорофорами слишком большая для осуществления переноса энергии.

Все разведения были сделаны в 0,5х буфере для детекции «LANCE Detection Buffer» (PerkinElmer), дополненном 2,67% стабилизирующим раствором (PerkinElmer) и 0,03% (об./об.) Tween-20 (Riedel de Haen, Зельце, Германия). 25 мкл сMetSEMA-567His8 добавляли к 25 мкл HGF, конъюгированного с AlexaFluor-647, 35 мкл «Anti-6xhis Europium³⁺» и 25 мкл немеченого антитела против с-Met в 96-луночной планшете «opti-white» (PerkinElmer). Была получена конечная концентрация 2,93 мкл/мл сMetSEMA-567His8, 0,96 мкл/мл HGF, конъюгированного с AlexaFluor-647 и 0,4 мкл/мл «Anti-6xhis Europium³⁺». Тестировали 4-кратное серийное разведение немеченого антитела против с-Met в диапазоне 0,49-8000 нг/мл. После инкубирования при 4°C в темноте в течение ночи. Среднюю интенсивность флуоресценции при 665 нм измеряли с помощью ридера «EnVision 2101 Multilabel reader» (PerkinElmer) со следующими устанавливаемыми параметрами: парное зеркало Lance/Delfia, фильтр эмиссии 615-665 нм, фильтр возбуждения 320 нм, время задержки 60 мкс, окно 100 мкс, 100 вспышек, 2000 мкс на цикл и двунаправленное построчное считывание. Для определения значений IC₅₀ кривые связывания анализировали с помощью нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая «доза-эффект» с вариабельным наклоном) с помощью программного обеспечения «GraphPad Prism V4.03» (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

На фигуре 6 представлены кривые ингибирования связывания различных антител, связывающих Met, при связывании с сMetSEMA_567His8, протестированные с помощью TR-FRET. За исключением антител 008, 035 и 096, все антитела были способны конкурировать с HGF, конъюгированным с AlexaFluor-647, за связывание с сMetSEMA-567His8. Антитело 022 было способно ингибировать ~80% связывания HGF, тогда как антитела 005, 006, 024, 045, 058, 061, 062, 064, 068, 069, 101, 181 и антитело положительного контроля 5D5 были способны ингибировать >90% связывание HGF с сMetSEMA-567His8. Определили значения IC₅₀, которые находятся в диапазоне 0,082-0,624 мкг/мл.

Таблица 7. Значения IC₅₀ (мг/мл) и процент ингибирования антителами против с-Met связывания лиганда с сMetSEMA-567His8, определенные с помощью TR-FRET

мАТ	IC ₅₀	% ингибирования
005	0,16	92
006	0,16	92
008	н.о.	4

мАТ	IC ₅₀	% ингибирования
022	0,37	77
024	0,39	95
035	н.о.	19
045	0,17	92
058	0,15	99
061	0,49	96
062	0,58	97
064	0,07	97
068	0,26	96
069	0,54	97
096	н.о.	16
098	0,55	98
101	0,53	96
181	0,34	93
5D5	0,2	95

Представленные данные являются средним MFI трех независимых экспериментов.

Пример 19. Анализ жизнеспособности КР4

Антитела против с-Met тестировали по их способности ингибировать жизнеспособность клеток КР4 (Riken BioResource Center Cell Bank, RCB1005). Клетки КР4, которые аутокринным образом экспрессируют высокие уровни как с-Met, так и HGF, рассевали в 96-луночном культуральном планшете (Greiner bio-one, Фриккенхаузен, Германия) (10000 клеток/лунка) в бессывороточной среде (1 часть HAM's F12K [Cambrex, Ист-Резерфорд, Нью-Джерси] и 1 часть DMEM [Cambrex]). Получали 66,7 нМ разведение антитела с-Met в бессывороточной среде и добавляли к клеткам. Через 3 дня инкубации, количество жизнеспособных клеток подсчитывали с помощью «Alamarblue» (BioSource International, Сан-Франциско, США) согласно инструкции производителя. Флуоресценцию отслеживали с помощью ридера «EnVision 2101 Multilabel reader» (PerkinElmer, Турку, Финляндия) со стандартными параметрами для «Alamarblue». Сигнал «Alamarblue» обработанных антителом клеток наносили на диаграмму в виде процента сигнала по сравнению с необработанными клетками.

На фигуре 7 изображено процентное ингибирование жизнеспособных клеток КР4 после обработки антителом, связывающим с-Met, по сравнению с необработанными клетками (0%). Окаймленные рамкой клоны являются антителами, которые перекрестно конкурируют друг с другом как описано в примере 17. Интересно, что антитела 024, 062, 064, 068, 069, 098, 101 и 181, которые принадлежат к одной перекрестно-блокирующей группе, все были способны ингибировать жизнеспособность КР4 (18-46%), как виде IgG1, так и в виде молекул «UniBody». Также молекулы IgG1 антител 008, 061 и 096 были способны ингибировать жизнеспособность КР4. Напротив, антитело 045 не ингибирует

жизнеспособность КР4 ни в виде IgG1, ни в виде молекулы «UniBody». Для Uni-1016-045-TE это возможно происходит из-за его низкой кажущейся аффинности к мембраносвязанному с-Met, что измерено с помощью анализа FACS (пример 13). Антитела IgG1 клонов 005, 006, 022 и 058 не ингибируют значимым образом жизнеспособность КР4, тогда как Uni-1016-022-TE, Uni-1016-058-TE и IgG1-1016-058-wtFab ингибировали жизнеспособность КР4 на 57, 38 и 44%, соответственно. Uni-1016-005 и Uni-1016-006 также перекрестно конкурируют с клонами 022 и 058, но не ингибируют значимым образом жизнеспособность КР4. Это возможно происходит из-за их низких кажущихся аффинностей, измеренных анализом FACS (пример 13). Интересно, что IgG4-1016-058 также продемонстрировал некоторое ингибирование жизнеспособности КР4. Этого не наблюдалось с IgG4-5D5).

В целом данные указывают на то, что в некоторых перекрестно-блокирующих группах, для ингибирования жизнеспособности КР4 требуется моновалентное связывание, тогда как в других перекрестно-блокирующих группах жизнеспособность КР4 могут ингибировать как моновалентно, так и бивалентно связывающие антитела.

Пример 20. Опухолевая модель на основе ксенотрансплантата КР4 в SCID-мышцах

Опухолевую модель на основе ксенотрансплантата в SCID-мышцах использовали для определения эффективности HuMab против с-Met при ингибировании опухолевого роста *in vivo*. Семи-одиннадцати недельные самки SCID-мышей, линии C.B-17/1crPrkdc-scid/CRL, приобрели у «Charles River Laboratories Nederland» (Маастрихт, Нидерланды) и содержали в стерильных условиях в клетках с верхним фильтром с кормом и водой, которые предлагались *ad libitum*. Для идентификации мышей использовали микрочипы (PLEXX BV, Элст, Нидерланды). Все эксперименты были одобрены комитетом по этике отношения к животным университета Утрехта.

В день 0, 10×10^6 клеток КР4 инокулировали подкожно в 200 мкл PBS в правый бок. Мышей проверяли, по меньшей мере, дважды в неделю по клиническим признакам заболевания. Размер опухоли определяли, по меньшей мере, раз в неделю. Объемы (мм^3) рассчитывали после измерений штангенциркулем (PLEXX) как $0,52 \times (\text{длина}) \times (\text{ширина})^2$, начиная с 16 дня. На 9 день измеряли средние размеры опухолей и мышей разделяли на 8 групп по 7 мышей в каждой. Антитела против с-Met (008, 058, 069 и 098) инъецировали внутрибрюшинно. Антитело G11-HZ использовали в качестве антитела положительного контроля, тогда как антитела 5D5 и изотипного контроля использовали в качестве антител отрицательного контроля. Мыши получали насыщающую дозу 400 мкг/мышь с последующей еженедельной поддерживающей дозой 200 мкг/мышь, в течение

7 недель.

Дополнительно образцы плазмы, собирали до введения 1, 3 и 5 поддерживающей дозы, а затем мышей умерщвляли, и определяли наличие человеческих IgG с помощью латексных гранул на нефелометре «BNI» (Dade Behring, Аттербури, Великобритания).

На фигурах 8 и 9 показано, что опухолевый рост клеток KP4 ингибировали NuMab 008, 069, 098 и положительный контроль G11-HZ. Ингибирование сравнивали с обработкой антителом изотипического контроля. Опухолевый рост клеток KP4 был замедлен, но не был полностью ингибирован контрольным антителом G11-HZ. Клоны 069 и 098 продемонстрировали более мощное ингибирование по сравнению с клонами 008 и G11-HZ. Антитела 5D5 и 058 не ингибировали опухолевый рост. Это согласовалось с данными *in vitro*, описанными в примере 19. В совокупности, эти данные указывают на то, что в некоторых перекрестно-блокирующих группах бивалентно связывающие антитела могут ингибировать рост опухоли KP4.

Пример 21. Опухолевая модель на основе ксенотрансплантата MKN45

Опухолевую модель ксенотрансплантата человеческой аденокарциномы желудка MKN45 в голых мышах использовали для определения эффективности NuMab против c-Met при ингибировании опухолевого роста *in vivo*.

Клетки человеческой аденокарциномы желудка MKN45 культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде RPMI-1640, содержащей 100 единиц/мл натриевой соли пенициллина G, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина, 25 мкг/мл гентамицина, 20% фетальной бычьей сыворотки и 2 mM глутамина. Использовали семи-восьми недельных самок голых мышей (nu/nu, Harlan) (массы тела в диапазоне от 17,0 до 26,4 г в начале исследования). Животные получали воду и корм *ad libitum*. Мышей размещали в условиях, удовлетворяющих рекомендациям руководства по уходу и использованию лабораторных животных. Уход за животными и программа использования были аккредитованы AAALAC. В 0 день, 1×10^7 клеток MKN45 инокулировали подкожно в 200 мкл 50% матригеля в PBS в бок каждой мыши. В 7 день, животных рассортировали в пять групп (n=10) со средним объемом опухоли от 80 до 120 мм³ и начали обработку. Антитела против c-Met (008, 058, 069) инъецировали в хвостовую вену (в.в.). Антитело G11-HZ использовали в качестве антитела положительного контроля, а антитело изотипического контроля использовали в качестве антитела отрицательного контроля. Все мыши получили 40 мг/кг антитела на 7 день и 20 мг/кг антитела на 14, 21 и 28 день.

Опухоли измеряли дважды в неделю с помощью штангенциркуля до конечного объема опухоли 700 мм³ или до конца исследования (день 62). На фигурах 10 и 11 показано, что рост опухоли клеток MKN45 был значимо замедлен антителами 008, 058,

069, и контрольным антителом G11-HZ по сравнению с обработкой антителом изотипического контроля.

Пример 22. Снижение остаточной агонистической активности IgG1-антител против c-Met путем ослабления конформационной гибкости

Естественный лиганд c-Met, HGF, является функциональным димером, который индуцирует димеризацию двух молекул c-Met. Последующее внутриклеточное фосфорилирование внутриклеточного домена c-Met приводит к активации нескольких сигнальных путей, которые вовлечены в пролиферацию, инвазию и выживание клеток. Большинство бивалентных антител, индуцированных против c-Met, демонстрируют сравнимые с HGF эффекты на направление развития клеток, особенно когда связываемые антителом эпитопы в c-Met расположены около или в домене SEMA.

Для минимизации потенциальной остаточной агонистической активности бивалентных антител IgG1, была использована стратегия уменьшения конформационной гибкости. В IgG1 у плечей Fab есть большая степень свободы для движения относительно домена Fc. Наибольшие конформационные изменения являются результатом гибкости шарнира, который позволяет широкий диапазон углов Fab-Fc (Ollmann Saphire, E., R.L. Stanfield, M.D.M. Crispin, P.W.H.I. Parren, P.M. Rudd, R.A. Dwek, D.R. Burton and I.A. Wilson. 2002. Contrasting IgG structures reveal extreme asymmetry and flexibility. *J. Mol. Biol.* 319: 9-18). Один путь уменьшения гибкости Fab-плеча в иммуноглобулинах заключается в предотвращении образования дисульфидных связей между легкой и тяжелой цепью посредством генетической модификации. В естественном антителе IgG1 легкая цепь соединена ковалентно с тяжелой цепью через дисульфидную связь, соединяющую C-концевой цистеин легкой цепи с цистеином в позиции 220 (C220 по нумерации EU) в шарнире Fc тяжелой цепи. Либо путем мутации аминокислоты C220 в серин или любую другую естественную аминокислоту, либо путем полного удаления шарнира, либо путем замены шарнира IgG1 на шарнир IgG3, образуется молекула, в которой легкие цепи соединены через их C-концевые цистеины, аналогично ситуации, обнаруженной в человеческом изоците IgA2m(1). Это приводит к сниженной гибкости Fab относительно Fc и следовательно снижает способность к перекрестному связыванию, что показано в сравнительных исследованиях агонистического антитела против c-Met (5D5) в формате IgA2m(1) и IgG1 при анализе жизнеспособности KP4 (фигура 12).

Другая стратегия уменьшения гибкости молекулы IgG1 заключается в замене шарнира IgG1 на шарнир IgG2 или IgG2-подобный шарнир. (Dangl et al. *EMBO J.* 1988;7:1989-94). Данная шарнирная область имеет два свойства, отличные от свойств шарнира IgG1, которые, как считается, делают молекулу менее гибкой. Во-первых, по

сравнению с шарниром IgG1 шарнир IgG2 на 3 аминокислоты короче. Во-вторых, шарнир IgG2 содержит дополнительный цистеин, таким образом, образуется три, вместо двух, дисульфидных мостика внутри тяжелой цепи. В ином случае, может быть введен вариант шарнира IgG1, который имеет сходство с шарниром IgG2. Этот мутант (ТН7А6-9) (WO2010063746) содержит мутацию Т223С и две делеции (К222 и Т225) для образования более короткого шарнира с дополнительным цистеином.

Пример 23. Получение молекул IgG1 с пониженной гибкостью (жесткие молекулы IgG1)

Клонирование и экспрессия

Мутантные антитела IgG1 были разработаны и клонированы с помощью стандартных молекулярно-биологических методов. Обзор последовательностей всех полученных мутаций шарнирной области представлен в таблице 8 ниже.

Таблица 8. Аминокислотная последовательность шарнира мутантных IgG1-антител. Делеции отмечены '-', а мутации подчеркнуты.

IgG1 Дикий Тип	EPKSCDKTHTCPPCP
IgG1 Шарнир-IgG2	ERKCCVE---CPPCP
IgG1 ΔC220	EPKS-DKTHTCPPCP
IgG1 C220S	EPKSSDKTHTCPPCP
IgG1 ТН7А6-9	EPKSCD-CH-CPPCP
IgG1 с удаленным шарниром (Uni-IgG1)	-----
IgG1 Шарнир-IgG3	<u>ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP</u> <u>EPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP</u>

Для экспрессии полученных жестких антител IgG1 в клетках млекопитающих, константную область HC из IgG1, содержащую мутации в области шарнира (см. выше таблицу 8), синтезировали в виде конструктора с оптимизированными кодонами в векторе для экспрессии в млекопитающих pcDNA3.3 (Invitrogen). Отдельный вектор сконструировали путем вставки оптимизированной по кодонам константной области в область человеческой легкой цепи каппа в pcDNA3.3. Области VH и VL клона 069 и контрольного антитела 5D5 вставляли в плазмиду с константной областью HC и плазмиду с легкой цепью каппа, что дает вектора для экспрессии (мутированных) тяжелой и легкой цепей специфических антител. Котрансфекция векторов с тяжелой и легкой цепями специфического антитела в клетках HEK-293F (Invitrogen), приводила к временной выработке мутантных антител. Очистку антител осуществляли с помощью аффинной колоночной хроматографии с протеином А (как описано в примере 11).

Определение биохимических характеристик

Временная экспрессия

Все мутанты экспрессировались на достаточных уровнях и не демонстрировали аберрантное образование мультимеров, что было определено посредством MS (>99% чистоты) и ДСН-ПААГ.

Результаты ДСН-ПААГ представлены на фигуре 13. Наблюдали в мутантах C220 (C220S и DC220) и вариантах IgG1 с удаленным шарниром (варианты IgG1 с удаленным шарниром также называются UniBody-IgG1 или Uni-IgG1) спаривание легких цепей, видимое в виде белковой полосы около 50 кДа при анализе в невосстанавливающем ДСН-ПААГ. Вариант с шарниром IgG3 также продемонстрировал спаривание легких цепей, тогда как вариант с шарниром IgG2 и мутант IgG1 TH7A6-9 продемонстрировали нормальное спаривание легкой и тяжелой цепей.

Пример 24. Свойства связывания мутантов с c-Met

Свойства связывания мутантов с c-Met тестировали с помощью тИФА. Лунки планшета для тИФА покрывали в течение ночи при 4°C rhHGF R/Fc Chimera (R&D Systems; Cat.358MT/CF) в PBS (1 мкг/мл). Затем лунки для тИФА отмывали PBST (PBS, дополненный 0,05% Tween-20 [Sigma-Aldrich, Звейндрехт, Нидерланды]) и блокировали в течение одного часа при комнатной температуре (КТ) PBSTC (PBST, дополненный 2% (об./об.) куриной сывороткой [Gibco, Пейсли, Шотландия]). После этого, лунки отмывали PBST и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с антителами против c-Met и вариантами, серийно разведенными в PBSTC (10 мкл/мл в 4-кратных разведениях). Несвязанное антитело отмывали с помощью PBST, и антитело, связанное с покрытием определяли при инкубации в течение одного часа при КТ с козьими F(ab')₂-HRP против человеческих IgG, разведенных в PBST (Jackson cat.no. 109-035-097). После отмывки, реакцию визуализировали 15 минутной инкубацией с 2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислотой (ABTS: развести одну таблетку ABTS в 50 мл буфера ABTS [Roche Diagnostics, Алмер, Нидерланды]) при КТ с защитой от света. Окрашивание останавливали путем добавления равного объема щавелевой кислоты (Sigma-Aldrich, Звейндрехт, Нидерланды). Флуоресценцию при 405 нм измеряли с помощью ридера микротитрационных планшетов (Biotek Instruments, Винуски, США). Все мутанты связывались с c-Met со сравнимой наблюдаемой аффинностью (EC₅₀) (фигура 14). В таблице 10 представлены значения EC₅₀ мутантов, полученных в данном эксперименте.

Таблица 9. Значения EC₅₀, определенные с помощью тИФА

	IgG1- 1016- 069	IgG1- 1016- 069- ДС220	IgG1- 1016- 069- С220S	IgG1- 1016- 069- Шарни р IgG2	IgG2- 1016- 069	IgG1- 1016- 069 ТН7Δ6- 9	Uni- 1016- 069- ТЕ	IgG1- 1016- 069	IgG1- 1016- 069- Шарни р IgG3	Uni- IgG1- 1016- 069
EC ₅₀ (нг/мл)	49,5	18,87	15,56	23,03	29,61	18,81	30,08	45,43	14,18	15,39

Пример 25. Сниженный агонистический эффект жестких IgG1-антител против с-Met

Фосфорилирование рецепторов

Для определения агонистических свойств защищенных антител исследовали воздействие антител на фосфорилирование с-Met. После димеризации двух соседствующих рецепторов с-Met либо естественным лигандом HGF, либо большинством бивалентных антител, три остатка тирозина (позиции 1230, 1234 и 1235) во внутриклеточном домене с-Met становятся перекрестно фосфорилированными, после чего происходит дальнейшее фосфорилирование нескольких других аминокислот внутриклеточного домена и активация нескольких сигнальных каскадов. Димеризацию и активацию с-Met можно, следовательно, отслеживать с помощью антител, специфичных к фосфорилированному в этих позициях рецептору, и таким образом можно использовать в качестве данных о потенциальном агонизме антител против с-Met.

Клетки A549, CCL-185 полученные из ATCC, выращивали в сыворотке, содержащей среду DMEM, до достижения 70% конфлюэнтности. После трипсинизации и отмывки клетки рассеивали в 6-луночном культуральном планшете по 1*10⁶ клеток/лунку, в культуральную среду, содержащую сыворотку. После ночной инкубации клетки обрабатывали либо HGF (R&D systems; cat. 294-HG) (50 нг/мл), либо панелью антител (30 мкг/мл) и инкубировали в течение 15 минут при 37°C. Клетки затем отмывали дважды ледяным PBS и лизировали буфером для лизирования (Cell Signaling; cat. 9803) дополненным коктейлем ингибиторов протеаз (Roche; cat. 11836170001), образцы хранили при -80°C. Активацию рецептора определяли измерением фосфорилирования посредством вестерн-блоттинга с помощью антител, специфичных к фосфо-с-Met. Белки в клеточном лизате разделяли на 4-12% геле ДСН-ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану, которую затем окрашивали антителом, специфичным к фосфорилированному с-Met (Y1234/1235) (Cell Signaling, cat: 3129). Для контроля загрузки геля использовали антитела против общего с-Met и бета-актина. Результаты вестерн-блоттинга представлены на фигуре 15.

Контроли среды тканевой культуры и клетки, обработанные моновалентным форматом UniBody антитела 5D5, не продемонстрировали фосфорилирования рецептора. Напротив, вестерн-блоттинг клеток, обработанных положительным контролем HGF или антителом-агонистом IgG1-1016-058, продемонстрировал четкую полосу ожидаемой массы. Антитело IgG1-1016-069 продемонстрировало низкое, но детектируемое фосфорилирование рецептора, что указывает на то, что имеет место некоторое перекрестное связывание рецептора. Однако варианты, которые были разработаны для уменьшения гибкости молекулы антитела, продемонстрировали минимальную активацию рецептора, вплоть до уровня, сравнимого с уровнями детектируемыми в клетках, обработанных моновалентным контролем Uni-5D5-TE (фигура 15).

Эффект антител с-Met на пролиферацию NCI-H441 in vitro

Потенциальную пролиферативную агонистическую активность антител против с-Met тестировали с помощью клеточной линии легочной аденокарциномы NCI-H441 (ATCC, HTB-174™), которая экспрессирует высокие уровни с-Met, но не продуцирует его лиганд HGF. Клетки NCI-H441 рассеивали в 96-луночные планшеты для тканевых культур (Greiner bio-one, Фриккенхаузен, Германия) (5000 клеток/лунку) в RPMI (Lonza) без сыворотки. Разведения антитела против с-Met (66,7 нМ) готовили в RPMI без сыворотки и добавляли к клеткам. Через 7 дней инкубации при 37°C/5% CO₂, количество жизнеспособных клеток подсчитывали с помощью «Alamarblue» (BioSource International, Сан-Франциско, США) согласно инструкции производителя. Флуоресценцию отслеживали с помощью ридера «EnVision 2101 Multilabel reader» (PerkinElmer, Турку, Финляндия) со стандартными параметрами для «Alamarblue».

Как видно из фигуры 17 пролиферация клеток NCI-H441 сильно индуцируется агонистическими контрольными мАТ IgG1-058 и IgG1-5D5. Антитело IgG1-1016-069 также продемонстрировало агонистический эффект по сравнению с клетками, обработанными изотипическим контролем. Агонистическая активность IgG1-1016-069 может быть полностью устранена путем введения мутаций в C220, C220S и -del, и частично вариантами с шарниром IgG2 и TH7Δ6-9 или с каркасом IgG2. Контрольные образцы, обработанные изотипным контролем и моновалентной версией 5D5 (Uni-5D5-TE), не индуцировали рост клеток.

Анализ жизнеспособности KP4

Способность ингибировать HGF-зависимые клетки также была определена для мутантов антитела против с-Met в анализе жизнеспособности KP4 (см. пример 19 для экспериментальных процедур). Результаты представлены на фигуре 17. Эффективность мутантов на основе IgG1-1016-069 полностью сохранялась или была незначительно лучше

в C220-мутантах. Примечательно, что внесение мутации в C220 в агонистичное антитело 5D5 приводит к значительному снижению жизнеспособности КР4. Отсутствие агонистического эффекта у антител 058 и 5D5 в формате IgG1 наблюдали из-за высокой экспрессии HGF клетками КР4 (аутокринная петля HGF).

Отрицательная модуляция

Отрицательная модуляция, индуцированная антагонистичными антителами, представляет собой механизм действия терапевтических антител против с-Met. Соответственно, в одном воплощении искомыми являются антитела с пониженными агонистическими свойствами, но с сохранившейся способностью индуцировать отрицательную модуляцию с-Met. Для определения отрицательного потенциала антител, клетки A549 (CCL-185, полученные из ATCC) рассевали в 6-луночные планшеты для тканевых культур (500 000 клеток/лунку) в клеточную культуральную среду с сывороткой и культивировали в течение ночи при 37°C. На следующее утро антитела против с-Met добавляли в конечной концентрации 10 мкг/мл и планшеты инкубировали следующие 2 дня при 37°C. После отмывки PBS, клетки лизировали инкубацией в течение 30 минут при комнатной температуре с 250 мкл буфера для лизиса (Cell signaling, Данверс, США). Общий белок подсчитывали с помощью реактива для определения белка с бицинхолиновой кислотой (англ. bicinchoninic acid, BCA) (Pierce), следуя протоколу производителя. Уровни белка с-Met в клеточных лизатах подсчитывали с помощью специфичного к с-Met сэндвич-тИФА. С этой целью, лунки планшетов для тИФА покрывали в течение ночи при 4°C козым антителом против человеческого с-Met, направленного против внеклеточного домена с-Met (R&D systems), разведенным в PBS (1 мкг/мл). Затем лунки для тИФА отмывали PBST (PBS, дополненный 0,05% Tween-20 [Sigma-Aldrich, Звейндрахт, Нидерланды]) и блокировали в течение одного часа при комнатной температуре (КТ) PBSTC (PBST, дополненный 2% (об./об.) куриной сывороткой [Gibco, Пейсли, Шотландия]). Добавляли неразведенные клеточные лизаты (100 мкл) и инкубировали один час при КТ. После отмывки PBST лунки инкубировали один час при комнатной температуре с мышинным антителом против внутриклеточного остатка тирозина -1234 человеческого с-Met (Cell signaling), разведенного 1:1000 в PBSC. Лунки опять отмывали PBST и инкубировали в течение одного часа при КТ с козым антителом против мышинового Fc-HRP (Jackson), разведенным 1:5000 в PBSC. После отмывки PBST, реакцию визуализировали после 30 минутной инкубации с 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислотой) (ABTS: развести одну таблетку ABTS в 50 мл буфера ABTS [Roche Diagnostics, Алмер, Нидерланды]) при КТ с защитой от света. Окрашивание останавливали путем добавления равного объема щавелевой кислоты

(Sigma-Aldrich, Звейндрахт, Нидерланды). Флуоресценцию при 405 нм измеряли с помощью ридера микротитрационных планшетов (Biotek Instruments, Винуски, США). Как видно из фигуры 18 все мутанты антитела 069 были способны индуцировать отрицательную модуляцию.

Пример 26. Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC)

Клетки MKN45 (приобретенные у RIKEN BioResource Center, Цукуба, Япония, RCB1001) собирали (5×10^6 клеток), отмывали (дважды в PBS, 1500 об./мин., 5 мин) и собирали в 1 мл среды RPMI 1640, дополненной 10% сывороткой CCS (cosmic calf serum) (HyClone, Логан, Юта, США), к которой добавляли 200 мкКи ^{51}Cr (Хром-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Розендал, Нидерланды). Смесь инкубировали в перемешиваемой водяной бане в течение 1,5 часов при 37°C. После отмывки клеток (дважды в PBS, 1500 об./мин., 5 мин), клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640, дополненной 10% CCS, подсчитывали по включению трипанового синего и разводили до концентрации 1×10^5 клеток/мл.

При этом мононуклеарные клетки периферической крови выделяли из свежих лейкоцитомобитарных слоев (Sanquin, Амстердам, Нидерланды) с помощью стандартного центрифугирования в градиенте плотности фиколла согласно инструкциям производителя (среда для отделения лимфоцитов; Lonza, Вербье, Франция). После ресуспендирования в среде RPMI 1640, дополненной 10% CCS, клетки подсчитывали по включению трипанового синего и концентрировали до 1×10^7 клеток/мл.

Для каждого эксперимента ADCC, 50 мкл меченных ^{51}Cr клеток MKN45 (5000 клеток) предварительно инкубировали с 15 мкг/мл антитела против c-Met в конечном объеме 100 мкл среды RPMI, дополненной 10% CCS, в 96-луночном микротитрационном планшете. После 15 минут при КТ, добавляли 50 пкл РВМС (500,000 клеток), с получением соотношения эффектора к мишени 100:1. Максимальное количество лизиса клеток определяли инкубацией 50 мкл меченных ^{51}Cr клеток MKN45 (5000 клеток) с 100 мкл 5% Triton-X100. Количество спонтанного лизиса определяли инкубацией 5000 меченных ^{51}Cr клеток MKN45 в 150 мкл среды, без антитела или клеток-эффекторов. Уровень антитело-независимого лизиса клеток определяли инкубацией 5000 клеток MKN45 с 500000 РВМС без антитела. Затем, клетки инкубировали 4 часа при 37°C, 5% CO_2 . Клетки центрифугировали (1200 об./мин., 3 мин) и 75 мкл надосадочной жидкости переносили в микронные пробирки, после которых подсчитывали ^{51}Cr с помощью счетчика гамма-излучения. Измеренные импульсы в минуту (имп./мин.) использовали для расчета процента опосредованного антителами лизиса следующим образом:

(имп./мин. образца - имп./мин. антитело-независимого лизиса)/(имп./мин. макс. лизис - имп./мин. спонтанного лизиса) x 100%

В различных публикациях продемонстрирована корреляция между сниженным фукозилированием кора и повышенной активностью ADCC *in vitro* (Shields RL. 2002 JBC; 277:26733-26740, Shinkawa T. 2003 JBC; 278(5):3466-3473). На фигуре 19 показано, что антитело 069 не индуцирует лизис клеток MKN45 через ADCC. Однако когда фукозилирование кора было снижено из-за присутствия кифунензина в процессе продуцирования МАТ в клетках НЕК, антитело 069 было способно индуцировать больше 30% лизиса клеток MKN45. Более того, лизис уже наблюдался при концентрациях антител ниже 0,01 мкг/мл. Представленные значения являются средними максимальными процентами высвобождения $^{51}\text{Cr} \pm$ станд. откл. из одного репрезентативного *in vitro* ADCC эксперимента с клетками MKN45. Антитело 069 с низким уровнем фукозы вырабатывалось в клетках НЕК 293 в присутствии кифунензина, что дает ~99,5% не коровое фукозилирование (т.е. отсутствие фукозы). Антитело 069 с высоким уровнем фукозы вырабатывались в клетках НЕК 293 без кифунензина, что дает ~2,11% не коровое фукозилирование, что определено высокоэффективной анионообменной хроматографией, соединенной с импульсным амперометрическим детектированием (HPLC-PAD) (данные не показаны).

Пример 27. Утрата связывания антител против c-Met с человеческими клетками периферической крови

Для выяснения связывания клона 069 с тремя типами клеток (В-клетки, моноциты и гранулоциты), присутствующими в периферической крови, осуществили анализ связывания с помощью FACS. Флуоресцентно меченый клон 069 использовали для прямого измерения на FACS без использования вторичных детектирующих антител. Клеточные популяции в крови были идентифицированы в анализе с помощью флуоресцентных коммерческих антител против специфических маркеров на представляющих интерес клетках.

Периферическую кровь из здоровых волонтеров (Медицинский центр Университета Утрехта) разводили в десять раз в буфере для FACS (PBS + 0,4% BSA + 0,02% NaN_3) и инкубировали с антителами против c-Met, конъюгированными с Alexa⁴⁸⁸, и антителами против CD19, CD16 и CD14, конъюгированными с FITC (конечная концентрация 10 пг/мл), и антителами против CD19, CD16 и CD14, меченными фикоэритрином (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) для идентификации клеточных популяций (соотв. В-клеток, гранулоцитов и моноцитов) в конечном объеме 100 мкл. После 30 минут при 4°C, образцы центрифугировали (300 g, 3 мин), надосадочную

жидкость удаляли, эритроциты лизировали инкубацией (10 мин, 4°C) с 200 мкл раствора «Ery-lysis solution» (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA [pH 7.4]), и отмывали образцы дважды в буфере для FACS. Образцы ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS и анализировали с помощью «FACS Canto II» (BD Biosciences).

Фигура 20 представляет диаграмму FACS, в которой показано, что 069, конъюгированное с Alexa⁴⁸⁸, не связывало популяцию В-клеток (CD19-PE⁺ клетки в пределах окна лимфоцитов). Связывание конъюгированного с Alexa⁴⁸⁸ ритуксимаба использовали в качестве положительного контроля. Связывание с другими клеточными популяциями анализировали таким же образом, и характерные результаты для одного из 3 доноров также помещены на диаграмму на фигуре 21. Антитело 069-Alexa⁴⁸⁸ не связывает В-клетки, моноциты или гранулоциты, тогда как антитела положительного контроля демонстрировали специфическое связывание.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Genmab A/S

<120> Monoclonal antibodies against c-Met

<130> P/59.WO

<160> 212

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Ser Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Met Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Val Gly Tyr Asp Trp Pro Asp Thr Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Ser Tyr Gly Phe Gly
1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

Arg Ile Ser Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Met Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 4

Asp Val Gly Tyr Asp Trp Pro Asp Thr Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<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 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Gly 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 Asn Ser Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 7

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 9

<211> 121

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 9

Gln val Gln Leu val Gln Ser Gly Ala Glu val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser val Lys val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Ile Gly Trp val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Ile Leu Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Met Phe
50 55 60

Gln Gly Arg val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp val Gly Tyr Asp Ser Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met val Thr val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 10

Ser Phe Gly Ile Gly
1 5

<210> 11

<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 11

Arg Ile Phe Pro Ile Leu Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Met Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 12

Asp Val Gly Tyr Asp Ser Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 13

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 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser 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 Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

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

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 14

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 15

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 16

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 17
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Glu Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Glu Ile Thr Gly Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 18

Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 19

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

Gly

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 20

Gln Glu Ile Thr Gly Glu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 21
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 21

Ala Ile Gln Leu 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 Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

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

<210> 22
<211> 11
<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 23

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 24

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 25

<211> 123

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Leu Leu Trp Phe Gly Glu Leu Trp Gly Tyr Phe Asp Leu
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 26

Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 27

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 28
<211> 14
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 28

Glu Leu Leu Trp Phe Gly Glu Leu Trp Gly Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 29
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val 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 Ala Trp Tyr Gln His 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 Glu Ala Ser Ser Phe Thr Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 31

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 32

Gln Glu Ala Ser Ser Phe Thr Trp Thr
 1 5

<210> 33
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 33

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80

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

Cys Ala Lys Asp Leu Asp Arg Gly Trp Met Gly Tyr Phe Gly Tyr Trp
 100 105 110

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

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 34

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 35
<211> 18
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 35

Ala Ile Ser Gly Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 36

Asp Leu Asp Arg Gly Trp Met Gly Tyr Phe Gly Tyr
1 5 10

<210> 37
<211> 106
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 37

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val 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 Ala Trp Tyr Gln His 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 Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 38

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 39

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 40

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Thr
1 5

<210> 41
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Glu Ile Thr Gly Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 42

Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 43

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

Gly

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 44

Gln Glu Ile Thr Gly Glu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 45

Ala Ile Gln Leu 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 Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Met
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 46

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 47

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 48

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 49
<211> 117
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 49

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Trp Gly Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 50

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 51

Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 52

Asp Arg Gly Trp Gly Ser Asp Tyr
1 5

<210> 53
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 53

Glu 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 Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 54

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 55

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 56

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 57
<211> 125
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 57

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Gln
100 105 110

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

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 58

Asp Tyr Tyr Met Tyr
1 5

<210> 59
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 59

Thr Ile Ser Asp Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 60
<211> 16
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 60

Glu Gly Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Gln Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 61
<211> 108
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 61

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

<210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 62

Arg Ala Ser	Gln Gly	Leu Ser Ser	Ala Leu	Ala
1	5		10	

<210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 63

Asp Ala Ser	Ser Leu	Glu Ser
1	5	

<210> 64
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 64

Gln Gln Phe	Thr Ser Tyr	Pro Gln Ile	Thr
1	5		10

<210> 65
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (52)..(52)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 65

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly His Ser Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Xaa Ile Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Asp Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ala Val Asp Arg Ser Lys Asn Gln Leu
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Phe Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Asp Phe Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 66

Ser Gly Gly His Ser Trp Ser
1 5

<210> 67

<211> 16

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 67

Xaa Ile Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 68

Ser Ser Tyr Asp Phe Leu Thr Asp
1 5

<210> 69

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 69

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val 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 Ala Trp Tyr Gln His 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 Asn Gly Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 70

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 71

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 72

Gln Gln Ala Asn Gly Phe Pro Ile Thr
1 5

<210> 73
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(52)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 73

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly His Ser Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Xaa Ile Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Asp Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ala Val Asp Arg Ser Lys Asn Gln Leu
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Phe Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 74

Ser Gly Gly His Ser Trp Ser
1 5

<210> 75
<211> 16
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 75

Xaa Ile Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 76

Ser Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Asp
1 5

<210> 77
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 77

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val 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 Ala Trp Tyr Gln His 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 Asn Gly Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 78
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 78

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 79
<211> 7
<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 79

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 80

Gln Gln Ala Asn Gly Phe Pro Ile Thr
1 5

<210> 81

<211> 118

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (52)..(52)

<223> xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 81

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly His Ser Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly xaa Ile Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Asp Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 82

Ser Gly Gly His Ser Trp Ser
1 5

<210> 83

<211> 16

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 83

Xaa Ile Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 84

Ser Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Asp
1 5

<210> 85

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 85

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val 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 Ala Trp Tyr Gln His 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 Asn Gly Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 86

Arg Ala ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 87

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 88

Gln Gln Ala Asn Gly Phe Pro Ile Thr
1 5

<210> 89
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(52)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 89

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

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

Trp Ile Gly Xaa Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 90

Ser Gly Gly Tyr Ser Trp Ser
1 5

<210> 91
<211> 16
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 91

Xaa Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 92
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 92

Ser Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Asp
1 5

<210> 93
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 93

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val 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 Ala Trp Tyr Gln His 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 Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 94
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 94

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 95
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 95

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 96

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr
1 5

<210> 97
<211> 119
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 97

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 98
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 98

Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 99
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 99

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 100

Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 101
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 101

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Leu 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 Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 102
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 102

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 103

Ala Ala Ser Ser Leu Leu Ser
1 5

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 104

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr
1 5

<210> 105
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 105

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
Страница 28

35

40

45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Glu Ile Thr Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 106
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 106

Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 107
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 107

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

Gly

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 108

Gln Glu Ile Thr Gly Asp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 109
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 109

Ala Ile Gln Leu 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 Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 110

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 111

Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 112

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 113
<211> 121
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 113

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Phe Asn Gly His Thr Asp Tyr Ser Gln Lys Val
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 114
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 114

Asn Phe Gly Ile Ser
1 5

<210> 115
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 115

Trp Ile Ser Ala Phe Asn Gly His Thr Asp Tyr Ser Gln Lys Val Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 116
<211> 12
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 116

Ser His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 117
<211> 107
<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 117

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 Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser 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 His Gln Tyr Lys Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 118

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 119

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 120

His Gln Tyr Lys Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 121

<211> 123

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 121

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Asp Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Val Phe Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Pro Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 122

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 122

Arg His Gly Ile Thr
1 5

<210> 123

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 123

Trp Ile Ser Ala Asp Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Asp

<210> 124

<211> 14

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 124

Val Phe Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Pro Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 125
<211> 108
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 125

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser 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 Gly Val Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 126
<211> 12
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 126

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 127
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 127

Gly Val Phe Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 128

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 129
<211> 119
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 129

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Arg Gly Thr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 130
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 130

Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 131
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 131

Trp Ile Ser Thr Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 132
<211> 10

<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 132

Asp Leu Arg Gly Thr Ala Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 133
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 133

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Leu 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 Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 134
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 134

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 135
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 135

Ala Ala Ser Ser Leu Leu Ser
1 5

<210> 136
<211> 9
<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 136

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr
1 5

<210> 137

<211> 119

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 137

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 138

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 138

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Leu 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 Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 139
<211> 119
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 139

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 140
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 140

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Leu 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 Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 141
<211> 119
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 141

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 142
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 142

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
Страница 39

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Leu 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 Asn Ser Phe Pro Ile
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 143
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 143

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 144
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 144

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Leu 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 Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 145
<211> 121
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 145

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Ser Pro Ile Leu Gly Ile Thr Asn Tyr Ala Gln Met Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Val Gly Tyr Asp Trp Pro Asp Thr Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 146
<211> 107

<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 146

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 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Gly 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 Asn Ser Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 147
<211> 121
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 147

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Ile Leu Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Met Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Val Gly Tyr Asp Ser Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 148
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 148

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 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser 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 Asn Ser Tyr Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 149
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 149

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Val Phe Pro Ile Leu Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Met Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Val Gly Tyr Asp Ser Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 150
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 150

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 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser 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 Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

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

<210> 151
<211> 123
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 151

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Ala Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Leu Leu Trp Phe Gly Glu Leu Trp Gly Tyr Phe Asp Leu
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 152
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 152

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val 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 Ala Trp Tyr Gln His 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 Glu Ala Asn Ser Phe Thr Trp
85 90 95

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

<210> 153
<211> 123
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 153

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Ala Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Leu Leu Trp Phe Gly Glu Leu Trp Gly Tyr Phe Asp Leu
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 154
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 154

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val 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 Ala Trp Tyr Gln His 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 Thr Asn Ser Phe Thr Trp
85 90 95

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

<210> 155
<211> 117
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 155

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Страница 46

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

<210> 156
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 156

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

<210> 157
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 157

Glu val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Arg Gly Trp Gly Ser Asp Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 158
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 158

Glu 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 Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 159
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 159

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly His Ser Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Cys Leu Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Ile
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 160
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 160

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val 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 Ala Trp Tyr Gln His 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 Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 161

<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 161

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Gly Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly His Ser Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Cys Leu Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 162
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 162

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val 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 Ala Trp Tyr Gln His 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 Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 163
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 163

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly His Ser Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Cys Ile Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Asp Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ala Val Asp Arg Ser Lys Asn Gln Leu
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Phe Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 164
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 164

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val 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 Ala Trp Tyr Gln His 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 Asn Gly Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 165
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 165

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly His Ser Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Cys Ile Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Asp Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 166
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 166

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val 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 Ala Trp Tyr Gln His 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 Asn Gly Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 167
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 167

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 Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Glu Val Thr Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 168
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 168

Ala Ile Gln Leu 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 Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
Страница 53

35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 169
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 169

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

<210> 170
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 170

Ala Ile Gln Leu 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 Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 171
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 171

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Glu Ile Thr Gly Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 172
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 172

Ala Ile Gln Leu 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 Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

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

<210> 173
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 173

Glu val Gln Leu val Gln Ser Gly Ala Glu val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asn Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Glu Ile Thr Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu val Thr val Ser Ser
115

<210> 174

<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 174

Ala Ile Gln Leu 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 Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 175
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 175

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Glu Ile Thr Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 176
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 176

Ala Ile Gln Leu 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 Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 177
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 177

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 Ile Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Glu Ile Thr Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 178
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 178

Ala Ile Gln Leu 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 Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Val Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 179
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> X1=Y or F

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> X2=A or G

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> X3=F or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> X4=S or G

<400> 179

Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 180
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> X1=I or V

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> X2=I,S or F

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> X3=I or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> X4=A or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (14)..(14)
<223> X5=K or M

<400> 180

Arg Xaa Xaa Pro Ile Leu Gly Xaa Xaa Asn Tyr Ala Gln Xaa Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 181
<211> 12
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> X1=W or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> X2=P or A

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> X3=T or A

<400> 181

Asp Val Gly Tyr Asp Xaa Xaa Asp Xaa Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 182

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> X1=D, E or N

<400> 182

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

Gly

<210> 183

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> X1=V or I

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> X2=E or D

<400> 183

Gln Glu Xaa Thr Gly Xaa Phe Asp Tyr
1 5

<210> 184

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> X1=V or F

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> X2=N or S

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> X3=D or Y

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)..(11)
<223> X4=Y or F

<400> 184

Xaa Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Xaa Lys Xaa Xaa Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 185
<211> 18
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> X1=S or no aa

<220>
<221> VARIANT
<222> (13)..(13)
<223> X2=V or A

<400> 185

Ala Ile Ser Gly Ser Xaa Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Xaa Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 186
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> X1=S or N

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> X2=S or T

<400> 186

Xaa Tyr Ala Met Xaa
1 5

<210> 187
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> X1=A or V

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> X2=S or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (15)..(15)
<223> X3=V or E

<400> 187

Xaa Ile Ser Gly Ser Gly Gly Xaa Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Xaa Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 188
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> X1=Y or C

<400> 188

Asp Arg Gly Trp Gly Ser Asp Xaa
1 5

<210> 189
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> X1=Y or S

<400> 189

Asp Tyr Tyr Met Xaa
1 5

<210> 190
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)

<223> X1=T or Y

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> X2=D or S

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> X3= D or S

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> X4=G or S

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> X5=Y or N

<220>

<221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> X6=P or A

<400> 190

Xaa Ile Ser Xaa Xaa Xaa Ser Tyr Thr Xaa Tyr Xaa Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 191

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> X1=Y or H

<400> 191

Ser Gly Gly Xaa Ser Trp Ser
1 5

<210> 192

<211> 16

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> X1=any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> X2=I or L

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> X3=S or N

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> X4=Y or D

<400> 192

Xaa Xaa Tyr His Ser Gly Xaa Thr Tyr Xaa Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 193
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> X1=F or I

<400> 193

Ser Ser Tyr Asp Xaa Leu Thr Asp
1 5

<210> 194
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> X1=S or N

<400> 194

Xaa Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 195
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> X1=A or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> X2=N or Y

<400> 195

Trp Ile Ser Xaa Tyr Asn Gly Xaa Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 196
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> X1=A or N

<400> 196

Asp Leu Arg Gly Thr Xaa Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 197
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> X1=N or S

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> X2=F or Y

<400> 197

Xaa Xaa Gly Ile Ser
 1 5

<210> 198
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> X1=F or Y

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> X2=H or N

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (10)..(10)
 <223> X3=D or N

<220>

<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> X4=S or A

<220>
<221> VARIANT
<222> (15)..(15)
<223> X5=V or L

<400> 198

Trp Ile Ser Ala Xaa Asn Gly Xaa Thr Xaa Tyr Xaa Gln Lys Xaa Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 199
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> X1=R or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> X2=H or Y

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> X3=T or S

<400> 199

Xaa Xaa Gly Ile Xaa
1 5

<210> 200
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> X1=D or Y

<220>
<221> VARIANT
<222> (15)..(15)
<223> X2=F or L

<220>
<221> VARIANT
<222> (17)..(17)
<223> X3=D or G

<400> 200

Trp Ile Ser Ala Xaa Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Xaa Gln
 1 5 10 15

Xaa

<210> 201
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> X1=F or L

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (10)..(10)
 <223> X2=P or no aa

<400> 201

Val Xaa Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Xaa Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 202
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> X1=Y or F

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> X2=P or W

<400> 202

Gln Gln Tyr Asn Ser Xaa Pro Xaa Thr
 1 5

<210> 203
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> X1=D, V or A

<400> 203

Xaa Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5

<210> 204
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> X1=R, I, L, W or MY

<400> 204

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Xaa Thr
1 5 10

<210> 205
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> X1=Q or E

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> X2=A or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> X3=N or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> X4=P or T

<400> 205

Gln Xaa Xaa Xaa Ser Phe Xaa Trp Thr
1 5

<210> 206
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> X1=I or no aa

<400> 206

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Xaa Thr
1 5

<210> 207
<211> 10
<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> X1=T or N

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> X2=Q or no aa

<400> 207

Gln Gln Phe Xaa Ser Tyr Pro Xaa Ile Thr
1 5 10

<210> 208

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> X1=G or S

<400> 208

Gln Gln Ala Asn Xaa Phe Pro Ile Thr
1 5

<210> 209

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> X1=S or N

<400> 209

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Xaa Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 210

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> X1=Q or L

<400> 210

Ala Ala Ser Ser Leu Xaa Ser
1 5

<210> 211
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> X1=H or Q

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> X2=K or N

<400> 211

Xaa Gln Tyr Xaa Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 212
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> X1=V or A

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> X2=F or S

<400> 212

Gly Xaa Xaa Ser Arg Ala Thr
1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело, которое связывает человеческий c-Met.

2. Антитело по п. 1, которое конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с иммобилизованным антителом, где указанное иммобилизованное антитело содержит область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:33, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:37 **(024)**, предпочтительно, где антитело конкурирует более чем на 50%, как например, более чем на 75% с указанным иммобилизованным антителом, при определении, методом, приведенном в примере 17.

3. Антитело по п. 2, которое не конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с антителом, выбранным из группы, состоящей из:

а) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:1, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:5 **(005)**

б) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:17, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:21 **(008)**

с) иммобилизованного антитела, содержащего область VH и область VL антитела **5D5**, и

д) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:49, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:53 **(045)**,

предпочтительно, где антитело конкурирует менее чем на 25%, например, менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, при определении, методом, приведенном в примере 17.

4. Антитело по п. 2, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело, выбранное из группы, состоящей из:

а) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:33, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:37 **(024)**

б) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:65, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:69 **(061)**

с) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:73, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:77 **(062)**

д) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:81, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:85 **(064)**

е) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:89, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:93 **(068)**

ф) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:97, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:101 **(069)**

г) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:113, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:117 **(098)**

h) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:121, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:125 **(101)** и

i) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:129, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:133 **(181)**.

5. Антитело по любому из п.п. 2 или 4, которое включает область VH CDR3, имеющую последовательность, представленную в

а) SEQ ID NO:36 **(024)**

б) SEQ ID NO:193, как например, область VH CDR3, представленная в SEQ ID NO:68, 76, 84 или 92 **(061, 062, 064, 068)**

с) SEQ ID NO:196, как например, область VH CDR3, представленная в SEQ ID NO:100 или 132 **(069, 181)**

д) SEQ ID NO:116 **(098)**, или

е) SEQ ID NO:201, как например, область VH CDR3, представленная в SEQ ID NO:124 **(101)**.

6. Антитело по п. 2 или 4, которое содержит:

а) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:33, 185 и 36, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:37, 39 и 206, как например, антитело, содержащее область VH, включающую последовательности SEQ ID NO:34, 35 и 36, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:38, 39 и 40, **(024)**

б) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:191, 192 и 193, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:78, 79 и 208, как например, антитело, содержащее

а. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:66, 67 и 68, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:70, 71 и 72,

(061)

b. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:74, 75 и 76, и область VL, включающую последовательности CDR1, 3 и 3, SEQ ID NO:78, 79 и 80

(062)

c. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:82, 83 и 84, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:86, 87 и 88

(064)

d. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:90, 91 и 92, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:94, 95 и 96

(068)

c) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:194, 195 и 196, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:209, 210 и 104, как например, антитело, содержащее

a. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:98, 99 и 100, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:102, 103 и 104, **(069)**, или

b. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:130, 131 и 132, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:134, 135 и 136, **(181)**

d) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:197, 198 и 116, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:118, 119 и 211, как например, антитело, содержащее область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO:114, 115 и 116, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:118, 119 и 120, **(098)**, или

e) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:199, 200 и 201, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:126, 212 и 128, как например, антитело, содержащее область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO:122, 123 и 124, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:126, 127 и 128 **(101)**.

7. Антитело по п. 2, содержащее:

a) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:33, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:37 **(024)**

b) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:65, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:69 **(061)**

c) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:73, и,

предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:77 **(062)**

d) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:81, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:85 **(064)**

e) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:89, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:93 **(068)**

f) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:97, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:101 **(069)**

g) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:113, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:117 **(098)**

h) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:121, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:125 **(101)**

i) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:129, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:133 **(181)**

j) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:159 и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:160 **(078)**

k) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:161 и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:162 **(084)**

l) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:163 и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:164 **(063)**

m) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:165 и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:166 **(087)**

n) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:137 и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:138 **(066)**

o) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:139 и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:140 **(065)**

p) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:141 и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:142 **(082)**

q) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:143 и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:144 **(089)**, или

г) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант, предпочтительно, содержит, по большей мере, 1, 2 или 3 аминокислотных модификации, более предпочтительно, аминокислотные замены, такие как консервативные аминокислотные замены в указанных последовательностях.

8. Антитело по п. 1, которое:

- конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с иммобилизованным антителом, где указанное иммобилизованное антитело содержит область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:9, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:13 **(006)**, предпочтительно, где антитело конкурирует более чем на 50%, как например, более чем на 75% с указанным иммобилизованным антителом, при определении, методом, приведенном в примере 17, и

- не конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с иммобилизованным антителом, содержащим область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:49, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:53 **(045)**, предпочтительно, где антитело конкурирует менее чем на 50%, например, менее чем на 25%, как например, менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, при определении, методом, приведенном в примере 17,

и

- антитело связывает домен SEMA в c-Met, предпочтительно, где антитело способно ингибировать связывание HGF с доменом SEMA с IC50, составляющим менее чем 10 мкг/мл, например, менее чем 2 мкг/мл, как описано в примере 9.

9. Антитело по п. 8, которое не конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с иммобилизованным антителом, содержащим область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:33, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:37 **(024)**, предпочтительно, где антитело конкурирует менее чем на 25%, как например, менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, при определении, методом, приведенном в примере 17.

10. Антитело по п. 8, которое связывает тот же эпитоп, что и антитело, выбранное из группы, состоящей из:

а) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:1, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:5 **(005)**

б) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:9, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:13 **(006)**

с) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:25, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:29 **(022)**

и

д) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:57, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:61 **(058)**.

11. Антитело по любому из п.п. 8 или 10, которое содержит область VH CDR3,

имеющую последовательность, представленную в

а) SEQ ID NO:181, как например, область VH CDR3, представленная в SEQ ID NO:4 или 12 **(005, 006)**

б) SEQ ID NO:28 **(022)**, или

с) SEQ ID NO:60 **(058)**.

12. Антитело по п. 8 или 10, которое содержит:

а) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:179, 180 и 181, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:6, 7 и 202, как например, антитело, содержащее

а. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:2, 3 и 4, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:6, 7 и 8, **(005)**, или

б. область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:10, 11 и 12, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:14, 15 и 16, **(006)**

б) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:26, 184 и 28, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:30, 31 и 205, как например, антитело, содержащее область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:26, 27 и 28, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:30, 31 и 32, **(022)**, или

с) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 30, SEQ ID NO:189, 190 и 60, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:62, 63 и 207, как например, антитело, содержащее область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:58, 59 и 60, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:62, 63 и 64 **(058)**.

13. Антитело по п. 8 или 10, содержащее:

а) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:1, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:5 **(005)**

б) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:9, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:13 **(006)**

с) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:25, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:29 **(022)**

д) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:57, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:61 **(058)**

е) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:145, и,

предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:146 **(031)**

f) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:147, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:148 **(007)**

g) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:149, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:150 **(011)**

h) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:151, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:152 **(017)**

i) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:153, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:154 **(025)**, или

j) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант содержит, по большей мере, 1, 2 или 3 аминокислотных модификации, более предпочтительно, аминокислотные замены, такие как консервативные аминокислотные замены в указанных последовательностях.

14. Антитело по п. 1, которое:

- конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с иммобилизованным антителом, где указанное иммобилизованное антитело включает область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:49, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:53 **(045)**, предпочтительно, где антитело конкурирует более чем на 50%, например, более чем на 75% с указанным иммобилизованным антителом, при определении, методом, приведенном в примере 17,

и

- не конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с иммобилизованным антителом, где указанное иммобилизованное антитело включает область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:9, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:13 **(006)**, предпочтительно, где антитело конкурирует менее чем на 25%, как например, менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, при определении, методом, приведенном в примере 17.

15. Антитело по п. 14, где антитело не конкурирует за связывание с растворимым cMetECDHis с антителом, выбранным из группы, состоящей из:

a) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:17, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:21 **(008)**, и

b) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:33, и содержащего область VL, включающую

последовательность SEQ ID NO:37 **(024)**,

предпочтительно, где антитело конкурирует менее чем на 25%, например, менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, при определении, методом, приведенном в примере 17.

16. Антитело по п. 14, которое связывает такой же эпитоп, что и антитело, содержащее область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:49, и содержащее область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:53 **(045)**.

17. Антитело по любому из п.п. 14 или 16, которое содержит область VH CDR3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO:188, например, область VH CDR3, представленную в SEQ ID NO:52 **(045)**.

18. Антитело по любому из п.п. 14 или 16, которое содержит область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:186, 187 и 188, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:54, 55 и 56, как например, антитело, содержащее область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:50, 51 и 52, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:54, 55 и 56, **(045)**.

19. Антитело по любому из п.п. 14 или 16, которое содержит:

a) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:49, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:53 **(045)**

b) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:155, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:156 **(040)**

c) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:157, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:158 **(039)**, или

d) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант, предпочтительно, содержит, по большей мере, 1, 2 или 3 аминокислотных модификации, более предпочтительно, аминокислотных замены, таких как консервативные аминокислотные замены в указанных последовательностях.

20. Антитело по п. 1, которое связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:17, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:21 **(008)** или связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:41, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:45 **(035)**, или связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:105, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:109 **(096)**.

21. Антитело по п. 20, которое содержит область VH CDR3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO:183, как например, область VH CDR3, представленную в SEQ ID NO:20, 44 или 108 **(008, 035, 096)**.

22. Антитело по п. 20, которое содержит область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:18, 182 и 183, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:22, 203 и 204, как например, антитело, которое содержит

а) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:18, 19 и 20, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:22, 23 и 24, **(008)**,

б) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:42, 43 и 44, и область VL, включающую последовательности CDR1, 1 и 3, SEQ ID NO:46, 47 и 48, **(035)**,

в) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:106, 107 и 108, и область VL, включающую последовательности CDR1, 32 и 3, SEQ ID NO:110, 111 и 112, **(096)**.

23. Антитело по любому из п.п. 20 или 22, которое содержит:

а) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:17, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:21 **(008)**

б) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:41, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:45 **(035)**

в) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:105, и, предпочтительно, область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:109 **(096)**, или

д) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант, предпочтительно, содержит, по большей мере, 1, 2 или 3 аминокислотных модификации, более предпочтительно, аминокислотных замены, таких как консервативные аминокислотные замены в указанных последовательностях.

24. Антитело по любому из предшествующих п.п. 1-19, которое связывает домен SEMA из с-Met, предпочтительно, которое способно ингибировать связывание HGF с доменом SEMA с IC50, составляющим менее чем 10 мкг/мл, как например, менее чем 2 мкг/мл, как описано в примере 9.

25. Антитело по любому из предшествующих п.п., которое связывает клетки A431 с EC50, составляющим 10 нМ или менее, как например, с EC50 равным 2 нМ или менее, предпочтительно, при определении, методом, приведенном в примере 13.

26. Антитело по п. 25, которое является бивалентным антителом.

27. Антитело по любому из предшествующих п.п., которое связывает клетки с-Met с константой аффинности (K_D), составляющей 20 нМ или менее, например, 5 нМ или менее, предпочтительно, при определении, методом, приведенном в примере 14.

28. Антитело по любому из предшествующих п.п., которое связывает с-Met макаки-резус, предпочтительно, для которого сигнал связывания антитела с с-Met макаки-резус, по меньшей мере, в 5 раз превышает сигнал для антитела отрицательного контроля, как определено согласно примеру 15.

29. Антитело по любому из предшествующих п.п., которое ингибирует связывание HGF с внеклеточным доменом с-Met, предпочтительно, которое ингибирует связывание более чем на 40%, как например, более чем на 50%, например, более чем на 60%, например, более чем на 70%, например, более чем на 80%, например, более чем на 90%, как определено согласно примеру 16.

30. Антитело по любому из предшествующих п.п., которое способно ингибировать жизнеспособность клеток KP4, предпочтительно, которое способно ингибировать жизнеспособность более чем на 10%, например, более чем на 25%, например, более чем на 40%, предпочтительно, как описано в примере 19.

31. Антитело по любому из предшествующих п.п., которое является полноразмерным антителом, предпочтительно, IgG1-антителом, в частности, антителом IgG1,κ.

32. Антитело по любому из предшествующих п.п., которое конъюгировано с другим компонентом, таким как цитотоксичный компонент, радиоактивный изотоп или лекарственное средство.

33. Антитело по любому из предшествующих п.п., которое представляет собой антитело с дефицитной эффекторной функцией, например, стабилизированное человеческое антитело IgG4, как например, антитело, где аргинин в положении 409 в константном участке тяжелой цепи человеческого IgG4 заменяют на лизин, треонин, метионин или лейцин, предпочтительно, лизин, и/или где шарнирная область включает последовательность Cys-Pro-Pro-Cys.

34. Антитело по любому из предшествующих п.п., которое представляет собой моновалентное антитело.

35. Антитело по п. 34, где моновалентное антитело содержит:

(i) вариабельную область антитела по любому из п.п. 1-23 или антигенсвязывающую часть указанной области, и

(ii) область C_H иммуноглобулина или ее фрагмент, включающий участки C_{H2} и

C_H3, где область C_H или ее фрагмент модифицированы так, что область, соответствующая шарнирной области, и, если иммуноглобулин не относится к изотипу IgG4, то и другие области C_H, такие как C_H3, не содержат никаких аминокислотных остатков, которые были бы способны к образованию дисульфидных связей с идентичной областью C_H или способны к образованию других ковалентных или стабильных нековалентных связей между тяжелыми цепями с идентичным участком C_H в присутствии поликлонального человеческого IgG.

36. Антитело по п. 35, где иммуноглобулин, представленный в стадии (ii), относится к подтипу IgG4.

37. Антитело по любому из п.п. 35 или 36, в котором тяжелая цепь модифицирована так, что шарнир удален полностью.

38. Антитело по любому из предшествующих п.п., которое модифицировано так, что оно становится менее гибким, например, путем мутации шарнирного участка.

39. Антитело по п. 38, которое относится к подтипу IgG1, и в котором шарнирная область модифицирована путем:

(i) удаления шарнирной области с последовательностью EPKSCDKTHTCPPCP и его замены на шарнирную область IgG2 с последовательностью: ERKCCVECP (IgG1 Шарнир-IgG2);

(ii) делеции в положении 220 так, что модифицированная шарнирная область содержит последовательность EPKSDKTHTCPPCP (IgG1 ΔC220);

(iii) замены цистеина в положении 220 на любую другую природную аминокислоту (X) так, что модифицированная шарнирная область содержит последовательность EPKSXDKTHTCPPCP (IgG1 C220X);

(iv) удаления шарнирной области с последовательностью EPKSCDKTHTCPPCP (UniBody IgG1);

(v) удаления шарнирной области с последовательностью EPKSCDKTHTCPPCP и ее замены на шарнирную область из IgG3 с последовательностью

ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP (IgG1 Шарнир-IgG3); или

(vi) замены треонина в положении 223 на цистеин и удаления лизина в положении 222 и треонина в положении 225, так что модифицированная шарнирная область содержит последовательность EPKSCDCHCPPCP (IgG1 TH7Δ6-9).

40. Антитело по п. 39, в котором шарнирная область модифицирована путем замены цистеина в положении 220 на серин так, что модифицированная шарнирная область содержит последовательность EPKSSDKTHTCPPCP (IgG1 C220S).

41. Антитело по п. 38, которое относится к подтипу IgG2.

42. Антитело по любому из предшествующих п.п., которое модифицировано с уменьшением корового фукозилирования до менее 10%, как например, менее 5%, определенного с помощью анионообменной хроматографии вместе с импульсным амперометрическим детектированием (HPLC-PAD).

43. Антитело по любому из предшествующих п.п., которое представляет собой биспецифичное антитело, включающее сайт связывания с с-Met, определенное по любому из предшествующих п.п., и второй антигенсвязывающий сайт, обладающий отличающейся специфичностью, такой как специфичность связывания с человеческой эффекторной клеткой, человеческим рецептором Fc, В-клеточным рецептором или с неперекрывающимся эпитопом с-Met.

44. Нуклеотидная последовательность, кодирующая одну или несколько аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177 и 178.

45. Экспрессирующий вектор, включающий нуклеотидную последовательность по п. 44, который дополнительно кодирует функционально связанный константную область легкой цепи, константную область тяжелой цепи или обе цепи антитела, легкую и тяжелую.

46. Рекомбинантная эукариотическая или прокариотическая клетка-хозяин, которая продуцирует антитело, определенное по любому из п.п. 1-43.

47. Фармацевтическая композиция, включающая антитело, определенное по любому из п.п. 1-43, и фармацевтически приемлемый носитель.

48. Антитело по любому из п.п. 1-43 для применения в качестве лекарственного средства.

49. Антитело по любому из п.п. 1-43 для применения при лечении злокачественного новообразования, такого как HGF-зависимое злокачественное новообразование или HGF-независимое злокачественное новообразование.

50. Антитело по любому из п.п. 1-43 для применения при лечении злокачественного новообразования, которое выбрано из группы, состоящей из: рака мочевого пузыря, рака груди, рака шейки матки, холангиокарциномы, колоректального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, рака головы и шеи, рака почки, рака печени, рака легкого, рака носоглотки, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака

желчного пузыря, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, остеосаркомы, рабдомиосаркомы, синовиальной саркомы, саркомы Капоши, лейомиосаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитоксантомы, фибросаркомы, острого миелогенного лейкоза, Т-клеточного лейкоза взрослых, хронического миелоидного лейкоза, лимфомы, множественной миеломы, глиобластомы, астроцитомы, меланомы, мезотелиомы, опухоли Вилмса, и опухолей MiT, включающих светлоклеточную саркому (CCS), альвеолярную саркому мягких тканей (ASPS) и ассоциированную с транслокацией почечно-клеточную карциному.

51. Антитело по любому из п.п. 49 или 50, которое предназначено для лечения злокачественного новообразования в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, такими как химиотерапевтический агент.

52. Применение антитела по любому из предшествующих п.п. 1-43 для производства лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, необязательно включающего дополнительные признаки п.п. 49 и 50.

53. Способ ингибирования роста и/или пролиферации опухолевой клетки, экспрессирующей с-Met, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму антитела по любому из п.п. 1-43.

54. Способ получения антитела по любому из п.п. 1-43, который включает стадии

- а) культивирования клетки-хозяина по п. 46, и
- б) очистки антитела из культуральной среды.

55. Способ обнаружения наличия с-Met в образце, включающий:

- контакт образца с антителом по любому из п.п. 1-43 в условиях, которые дают возможность образования комплекса между антителом и с-Met; и
- анализ того, образовался ли комплекс.

56. Набор реактивов для обнаружения наличия с-Met в образце, который содержит:

- антитело по любому из п.п. 1-43; и
- инструкции по применению набора реактивов.

57. Идиотипическое антитело, связывающее антитело по любому из п.п. 1-43.

1 сравнение VH :

IgHV1-18-1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
VH1016-181 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
 VH1016-066 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
 VH1016-065 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
VH1016-069 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
 VH1016-082 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
 VH1016-089 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
 консенсусная QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
 последовательность

IgHV1-18-1 KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]
VH1016-181 KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]
 VH1016-066 KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]
 VH1016-065 KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]
VH1016-069 KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]
 VH1016-082 KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]
 VH1016-089 KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]
 консенсусная KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]
 последовательность

2 сравнение VH :

IgHV1-69-4 QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSS[REDACTED]WVRQAPGQGLEWMGR[REDACTED]PILG[REDACTED]NYAQ
VH1016-005 QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSS[REDACTED]WVRQAPGQGLEWMGR[REDACTED]PILG[REDACTED]NYAQ
 VH1016-031 QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSS[REDACTED]WVRQAPGQGLEWMGR[REDACTED]PILG[REDACTED]NYAQ
VH1016-006 QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSS[REDACTED]WVRQAPGQGLEWMGR[REDACTED]PILG[REDACTED]NYAQ
 VH1016-007 QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSS[REDACTED]WVRQAPGQGLEWMGR[REDACTED]PILG[REDACTED]NYAQ
 VH1016-011 QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSS[REDACTED]WVRQAPGQGLEWMGR[REDACTED]PILG[REDACTED]NYAQ
 консенсусная QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSS[REDACTED]WVRQAPGQGLEWMGR[REDACTED]PILG[REDACTED]NYAQ
 последовательность

IgHV1-69-4 FQGRVTITADKSTSTAY[REDACTED]EL[REDACTED]SLRSED[REDACTED]TAVYYCAR[REDACTED]
VH1016-005 FQGRVTITADKSTSTAY[REDACTED]EL[REDACTED]SLRSED[REDACTED]TAVYYCAR[REDACTED]
 VH1016-031 FQGRVTITADKSTSTAY[REDACTED]EL[REDACTED]SLRSED[REDACTED]TAVYYCAR[REDACTED]
VH1016-006 FQGRVTITADKSTSTAY[REDACTED]EL[REDACTED]SLRSED[REDACTED]TAVYYCAR[REDACTED]
 VH1016-007 FQGRVTITADKSTSTAY[REDACTED]EL[REDACTED]SLRSED[REDACTED]TAVYYCAR[REDACTED]
 VH1016-011 FQGRVTITADKSTSTAY[REDACTED]EL[REDACTED]SLRSED[REDACTED]TAVYYCAR[REDACTED]
 консенсусная FQGRVTITADKSTSTAY[REDACTED]EL[REDACTED]SLRSED[REDACTED]TAVYYCAR[REDACTED]
 последовательность

3 сравнение VH :

IgHV3-30-3-1 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA[REDACTED]ISYDGS[REDACTED]K[REDACTED]AD
 VH1016-017 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA[REDACTED]ISYDGS[REDACTED]K[REDACTED]AD
 VH1016-025 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA[REDACTED]ISYDGS[REDACTED]K[REDACTED]AD
VH1016-022 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA[REDACTED]ISYDGS[REDACTED]K[REDACTED]AD
 консенсусная QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA[REDACTED]ISYDGS[REDACTED]K[REDACTED]AD
 последовательность

IgHV3-30-3-1 SVKGRFTI[REDACTED]RDNSKNTLYLQM[REDACTED]SLRA[REDACTED]DTAVYYCAR[REDACTED]
 VH1016-017 SVKGRFTI[REDACTED]RDNSKNTLYLQM[REDACTED]SLRA[REDACTED]DTAVYYCAR[REDACTED]
 VH1016-025 SVKGRFTI[REDACTED]RDNSKNTLYLQM[REDACTED]SLRA[REDACTED]DTAVYYCAR[REDACTED]
VH1016-022 SVKGRFTI[REDACTED]RDNSKNTLYLQM[REDACTED]SLRA[REDACTED]DTAVYYCAR[REDACTED]
 консенсусная SVKGRFTI[REDACTED]RDNSKNTLYLQM[REDACTED]SLRA[REDACTED]DTAVYYCAR[REDACTED]
 последовательность

4 сравнение VH :

IgHV3-23-1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF[REDACTED]YAM[REDACTED]WVRQAPGKGLEWVS[REDACTED]ISGSGG[REDACTED]TYYAD
 VH1016-040 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF[REDACTED]YAM[REDACTED]WVRQAPGKGLEWVS[REDACTED]ISGSGG[REDACTED]TYYAD
VH1016-045 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF[REDACTED]YAM[REDACTED]WVRQAPGKGLEWVS[REDACTED]ISGSGG[REDACTED]TYYAD
 VH1016-039 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF[REDACTED]YAM[REDACTED]WVRQAPGKGLEWVS[REDACTED]ISGSGG[REDACTED]TYYAD
 консенсусная EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF[REDACTED]YAM[REDACTED]WVRQAPGKGLEWVS[REDACTED]ISGSGG[REDACTED]TYYAD
 последовательность

Фиг. 1

IgHV3-23-1 S KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA -----
 VH1016-040 S KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA -----
VH1016-045 S KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA -----
 VH1016-039 S KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA -----
 консенсусная SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA KDRGWGSDYWGQGT LVTVSS
 последовательность

5 сравнение VH :

IgHV4-30-2-1 QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGG SWSWIRQPPGKGLEWIG YHSG TY
VH1016-068 QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGG SWSWIRQPPGKGLEWIG YHSG TY
 VH1016-078 QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGG SWSWIRQPPGKGLEWIG YHSG TY
 VH1016-084 QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGG SWSWIRQPPGKGLEWIG YHSG TY
VH1016-061 QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGG SWSWIRQPPGKGLEWIG YHSG TY
VH1016-062 QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGG SWSWIRQPPGKGLEWIG YHSG TY
 VH1016-063 QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGG SWSWIRQPPGKGLEWIG YHSG TY
VH1016-064 QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGG SWSWIRQPPGKGLEWIG YHSG TY
 VH1016-087 QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGG SWSWIRQPPGKGLEWIG YHSG TY
 консенсусная QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGGH SWSWIRQPPGKGLEWIG CIYHSGNTYD
 последовательность

IgHV4-30-2-1 NPSLKSRVTI VDRSKNQ SLKLS TAADTAVYYCAR -----
VH1016-068 NPSLKSRVTI VDRSKNQ SLKLS TAADTAVYYCAR -----
 VH1016-078 NPSLKSRVTI VDRSKNQ SLKLS TAADTAVYYCAR -----
 VH1016-084 NPSLKSRVTI VDRSKNQ SLKLS TAADTAVYYCAR -----
VH1016-061 NPSLKSRVTI VDRSKNQ SLKLS TAADTAVYYCAR -----
VH1016-062 NPSLKSRVTI VDRSKNQ SLKLS TAADTAVYYCAR -----
 VH1016-063 NPSLKSRVTI VDRSKNQ SLKLS TAADTAVYYCAR -----
VH1016-064 NPSLKSRVTI VDRSKNQ SLKLS TAADTAVYYCAR -----
 VH1016-087 NPSLKSRVTI VDRSKNQ SLKLS TAADTAVYYCAR -----
 консенсусная NPSLKSRVTI SVDRSKNQ SLKLS SVTAADTAVYYCAR SSYDI LT DWGQGT LVTVSS
 последовательность

6 сравнение VH :

IgHV5-51-1 EVQLVQSGAEVKKKPGESLKI SCKGSGY FSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 VH1016-016 EVQLVQSGAEVKKKPGESLKI SCKGSGY FSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 VH1016-028 EVQLVQSGAEVKKKPGESLKI SCKGSGY FSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
VH1016-008 EVQLVQSGAEVKKKPGESLKI SCKGSGY FSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 VH1016-012 EVQLVQSGAEVKKKPGESLKI SCKGSGY FSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
VH1016-035 EVQLVQSGAEVKKKPGESLKI SCKGSGY FSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 VH1016-095 EVQLVQSGAEVKKKPGESLKI SCKGSGY FSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 VH1016-093 EVQLVQSGAEVKKKPGESLKI SCKGSGY FSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
VH1016-096 EVQLVQSGAEVKKKPGESLKI SCKGSGY FSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 VH1016-104 EVQLVQSGAEVKKKPGESLKI SCKGSGY FSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 консенсусная EVQLVQSGAEVKKKPGESLKI SCKGSGY FSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 последовательность

IgHV5-51-1 TRYSPSFQGGVTTISADKSI STAYLQW SSLKASDTAMYYCAR -----
 VH1016-016 TRYSPSFQGGVTTISADKSI STAYLQW SSLKASDTAMYYCAR -----
 VH1016-028 TRYSPSFQGGVTTISADKSI STAYLQW SSLKASDTAMYYCAR -----
VH1016-008 TRYSPSFQGGVTTISADKSI STAYLQW SSLKASDTAMYYCAR -----
 VH1016-012 TRYSPSFQGGVTTISADKSI STAYLQW SSLKASDTAMYYCAR -----
VH1016-035 TRYSPSFQGGVTTISADKSI STAYLQW SSLKASDTAMYYCAR -----
 VH1016-095 TRYSPSFQGGVTTISADKSI STAYLQW SSLKASDTAMYYCAR -----
 VH1016-093 TRYSPSFQGGVTTISADKSI STAYLQW SSLKASDTAMYYCAR -----
VH1016-096 TRYSPSFQGGVTTISADKSI STAYLQW SSLKASDTAMYYCAR -----
 VH1016-104 TRYSPSFQGGVTTISADKSI STAYLQW SSLKASDTAMYYCAR -----
 консенсусная TRYSPSFQGGVTTISADKSI STAYLQW SSLKASDTAMYYCAR QEITGDFDYWGQGT LVTVSS
 последовательность

Фиг. 1 (продолжение)

IGKV1-12*01 DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQHKP
 VL1016-065 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQHKP
 VL1016-066 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQHKP
VL1016-069 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQHKP
 VL1016-089 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQHKP
 VL1016-082 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQHKP
VL1016-181 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQHKP
 консенсусная MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQHKP
 последовательность

IGKV1-12*01 GKAPKLLIYAASSLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTREIK
 VL1016-065 GKAPKLLIYAASSLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTREIK
 VL1016-066 GKAPKLLIYAASSLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTREIK
VL1016-069 GKAPKLLIYAASSLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTREIK
 VL1016-089 GKAPKLLIYAASSLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTREIK
 VL1016-082 GKAPKLLIYAASSLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTREIK
VL1016-181 GKAPKLLIYAASSLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTREIK
 консенсусная GKAPKLLIYAASSLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTREIK
 последовательность

IGKV1D-16*01 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPE
VL1016-005 MDMRVLAQLLGLLLLCPFGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPE
 VL1016-031 MDMRVLAQLLGLLLLCPFGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPE
VL1016-006 MDMRVLAQLLGLLLLCPFGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPE
 VL1016-007 MDMRVLAQLLGLLLLCPFGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPE
 VL1016-011 MDMRVLAQLLGLLLLCPFGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPE
 консенсусная MDMRVLAQLLGLLLLCPFGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPE
 последовательность

IGKV1D-16*01 KAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPTFGQGTKVEIK
VL1016-005 KAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPTFGQGTKVEIK
 VL1016-031 KAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPTFGQGTKVEIK
VL1016-006 KAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPTFGQGTKVEIK
 VL1016-007 KAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPTFGQGTKVEIK
 VL1016-011 KAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPTFGQGTKVEIK
 консенсусная KAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPTFGQGTKVEIK
 последовательность

IGKV1-12*01 DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPG
 VL1016-017 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQHKPG
VL1016-022 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQHKPG
 VL1016-025 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQHKPG
 консенсусная MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQHKPG
 последовательность

IGKV1-12*01 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQANSFTWTFGQGTKVEIK
 VL1016-017 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQANSFTWTFGQGTKVEIK
VL1016-022 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQANSFTWTFGQGTKVEIK
 VL1016-025 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQANSFTWTFGQGTKVEIK
 консенсусная KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQANSFTWTFGQGTKVEIK
 последовательность

IGKV3-11*01 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ
 VL1016-039 MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ
 VL1016-040 MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ
VL1016-045 MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ
 консенсусная MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ
 последовательность

IGKV3-11*01 APRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPFTFGPGTKVDIK
 VL1016-039 APRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPFTFGPGTKVDIK
 VL1016-040 APRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPFTFGPGTKVDIK
VL1016-045 APRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPFTFGPGTKVDIK
 консенсусная APRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPFTFGPGTKVDIK
 последовательность

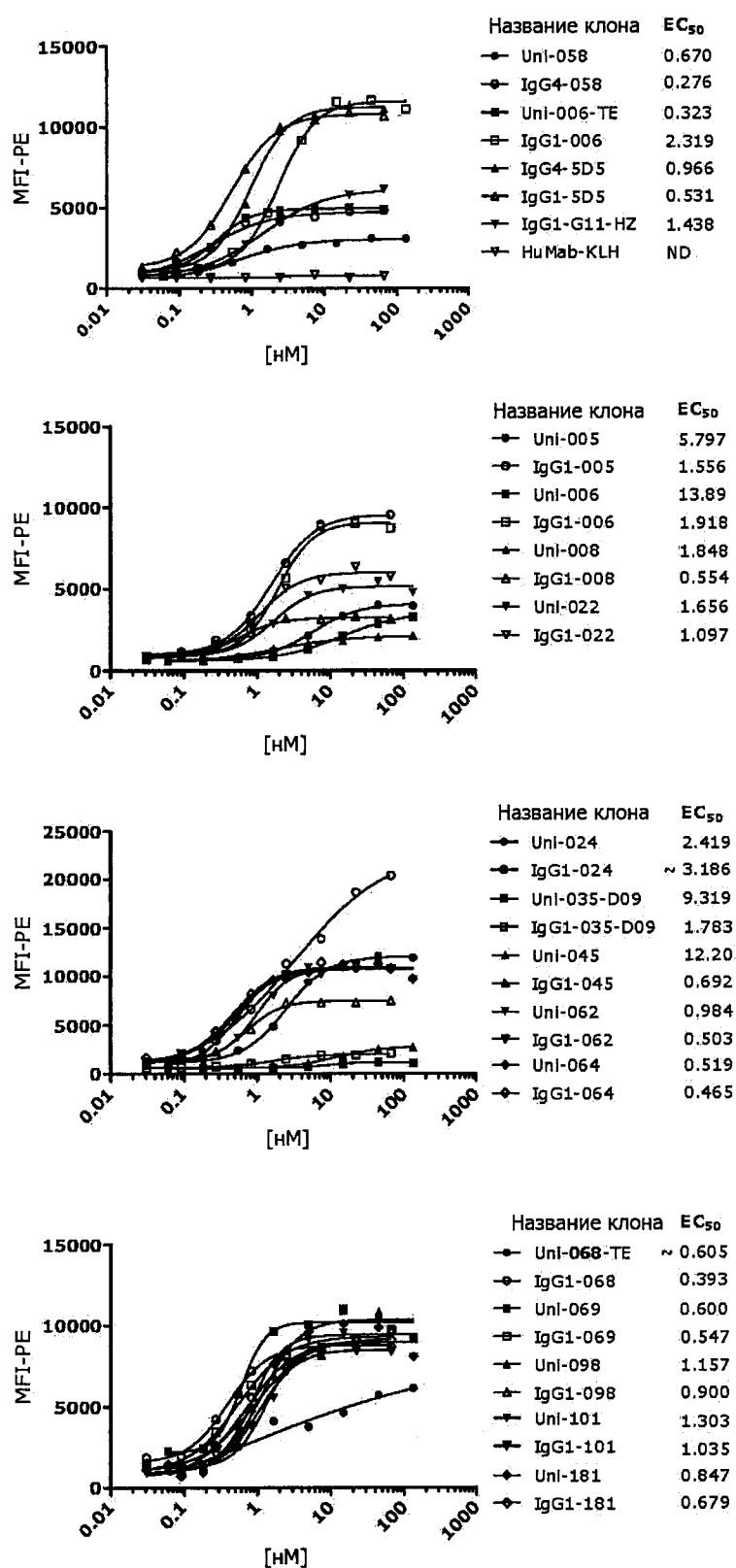
IGKV1-12*01 DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQH KPG
VL1016-061 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQH KPG
VL1016-062 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQH KPG
 VL1016-063 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQH KPG
VL1016-064 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQH KPG
VL1016-068 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQH KPG
 VL1016-084 MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQH KPG
 консенсусная
 последовательность MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQH KPG

IGKV1-12*01 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANFPITFGQGTREIK
VL1016-061 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANGFPITFGQGTREIK
VL1016-062 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANGFPITFGQGTREIK
 VL1016-063 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANGFPITFGQGTREIK
VL1016-064 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANGFPITFGQGTREIK
VL1016-068 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANGFPITFGQGTREIK
 VL1016-084 KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANGFPITFGQGTREIK
 консенсусная
 последовательность KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANGFPITFGQGTREIK

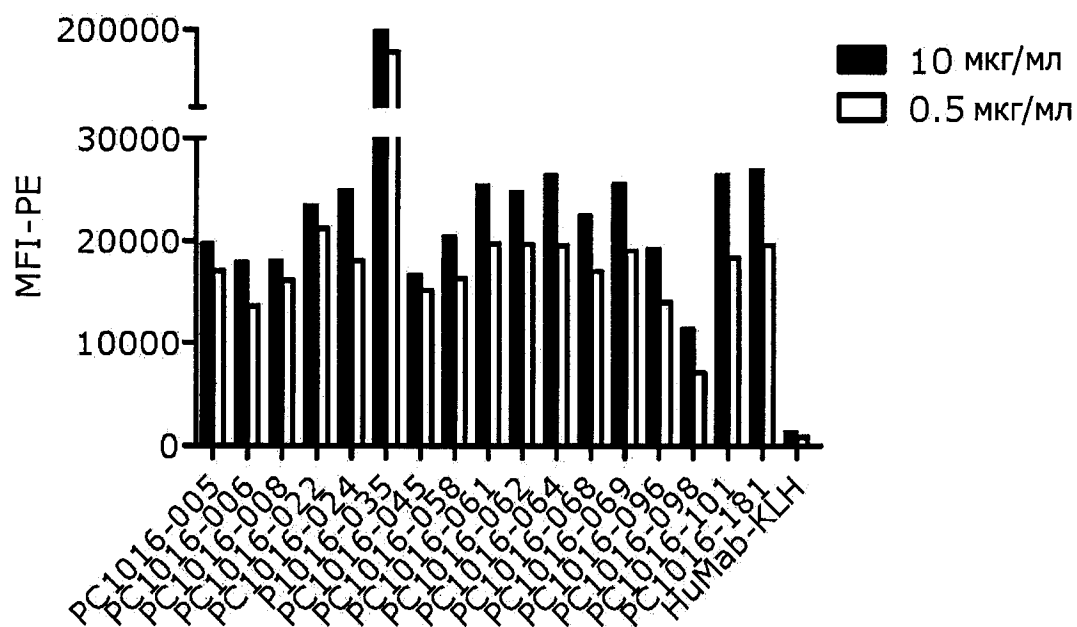
IGKV1-13*02 AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPG
VL1016-008 MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPG
 VL1016-012 MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPG
VL1016-035 MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPG
 VL1016-104 MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPG
 VL1016-093 MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPG
VL1016-096 MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPG
 VL1016-016 MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPG
 VL1016-028 MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPG
 VL1016-095 MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPG
 консенсусная
 последовательность MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPG

IGKV1-13*02 KAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIK
VL1016-008 KAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIK
 VL1016-012 KAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIK
VL1016-035 KAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIK
 VL1016-104 KAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIK
 VL1016-093 KAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIK
VL1016-096 KAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIK
 VL1016-016 KAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIK
 VL1016-028 KAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIK
 VL1016-095 KAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIK
 консенсусная
 последовательность KAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKEIK

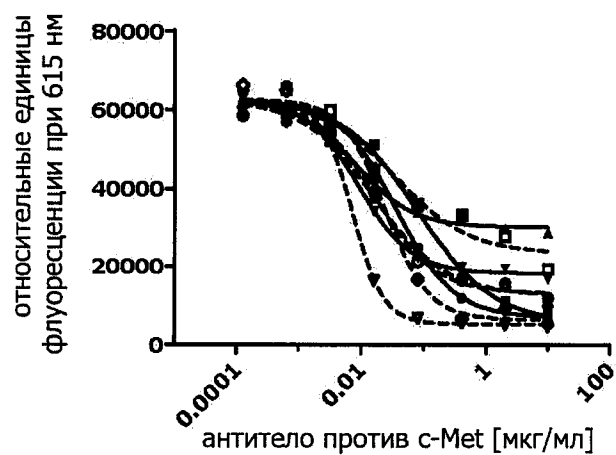
Фиг. 2 (продолжение)



Фиг. 3



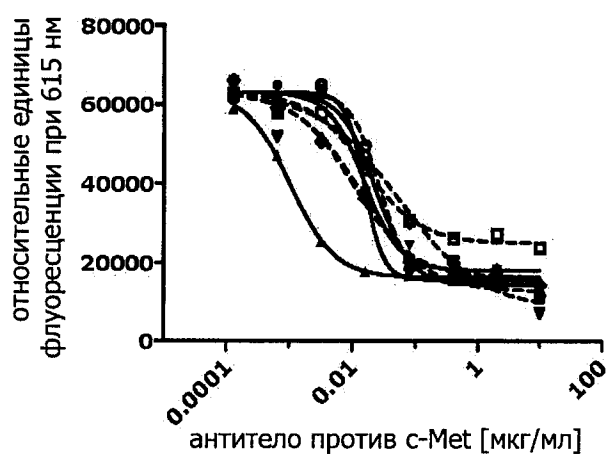
Фиг. 4



	EC ₅₀	нижнее значение
005	0.03616	6944
006	0.07994	5628
008	0.007878	30087
022	0.009265	18227
024	0.01684	13062
035	0.03484	23287
045	0.01646	12563
058	0.007270	5201
5D5	0.02435	6347

без HGF-европия³⁺ ~600

без конкурирующего антитела ~6600

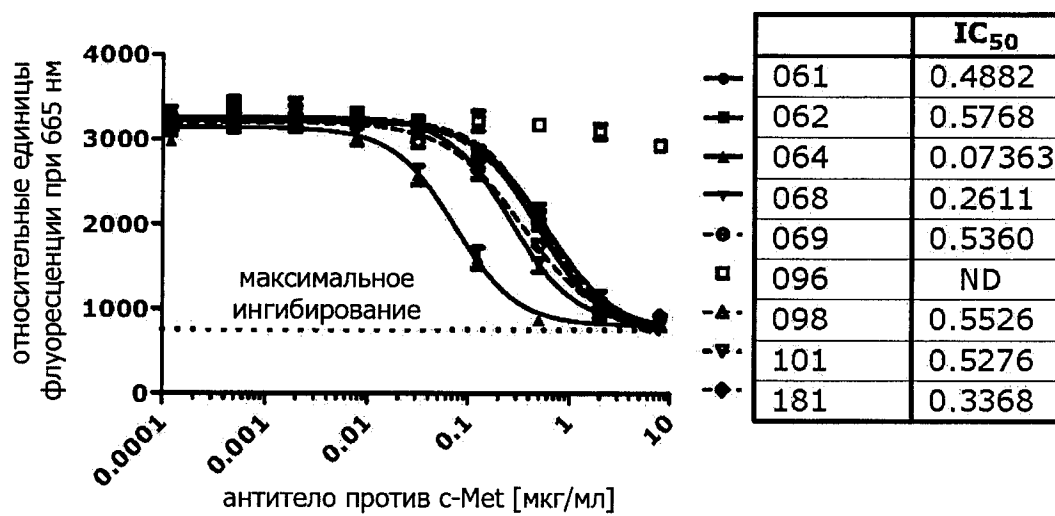
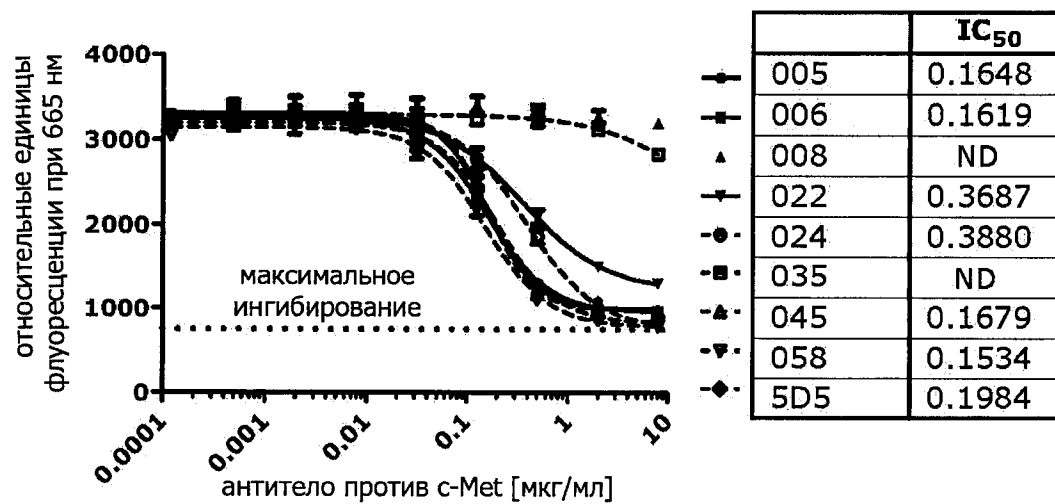


	EC ₅₀	нижнее значение
061	0.01552	15583
062	0.02299	14276
064	0.001039	16172
068	0.01529	17943
069	0.02671	15028
096	0.01523	24849
098	0.01349	12699
101	0.05580	8380
181	0.01030	16255

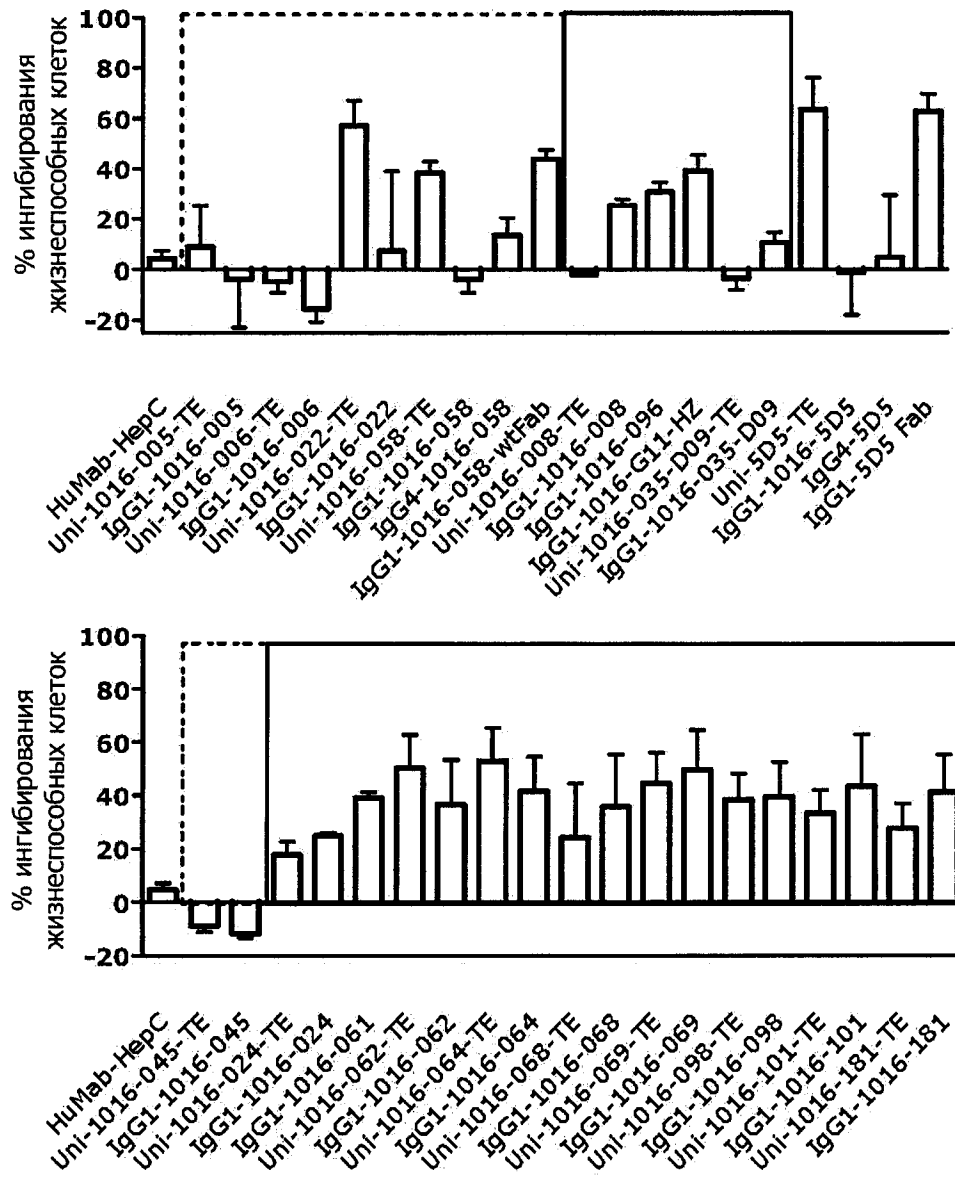
без HGF-европия³⁺ ~600

без конкурирующего антитела ~6600

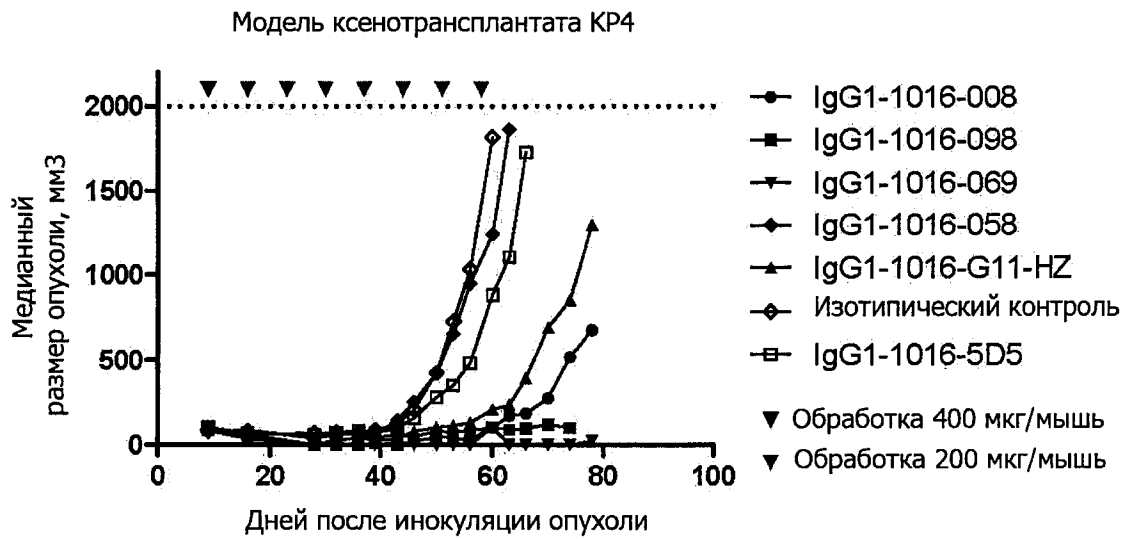
Фиг. 5



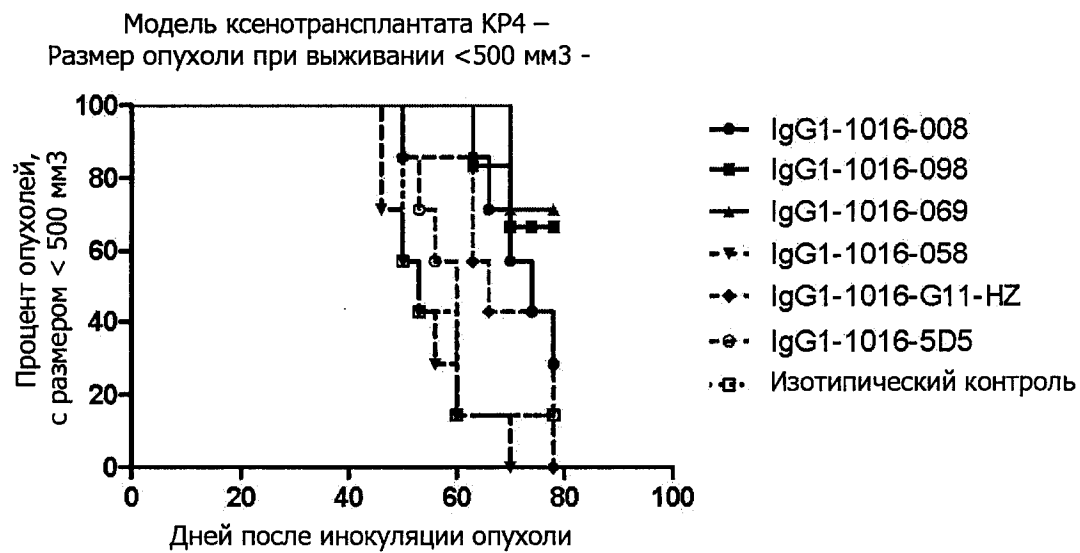
Фиг. 6



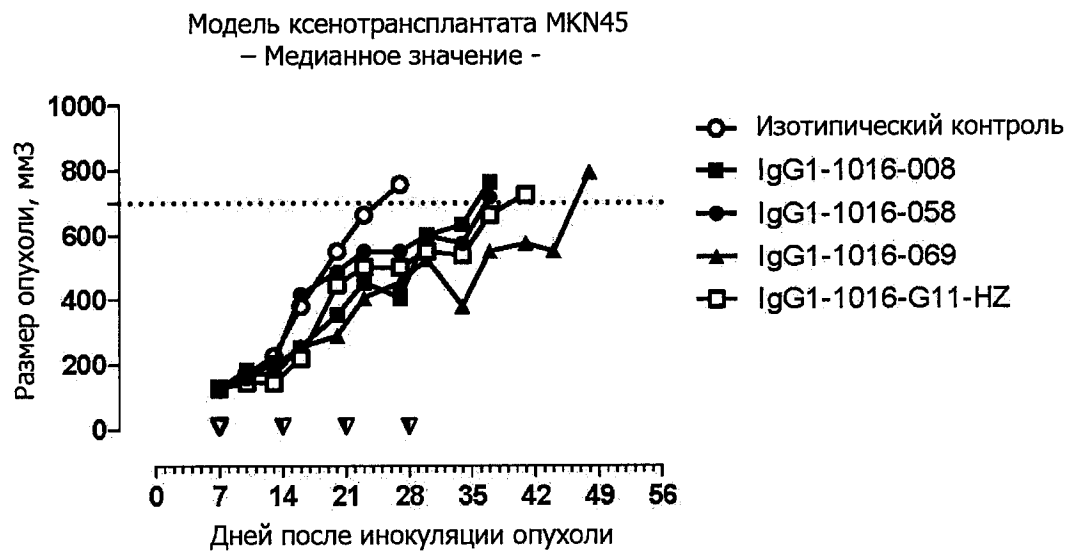
Фиг. 7



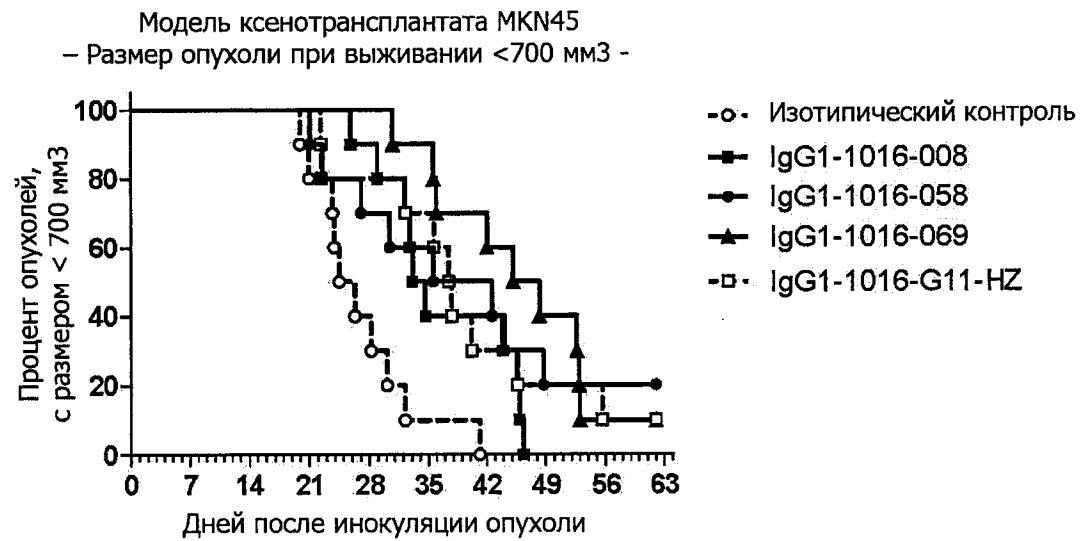
Фиг. 8



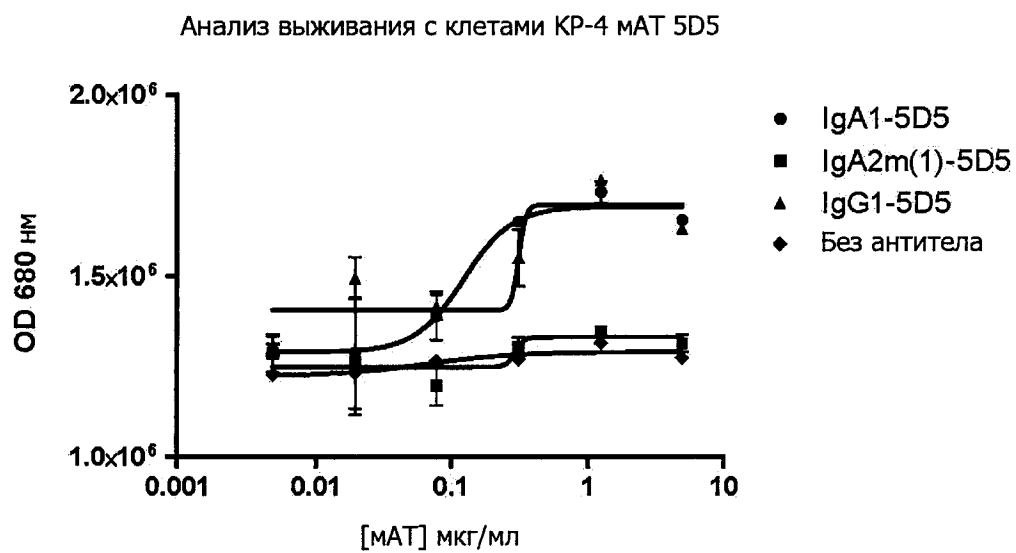
Фиг. 9



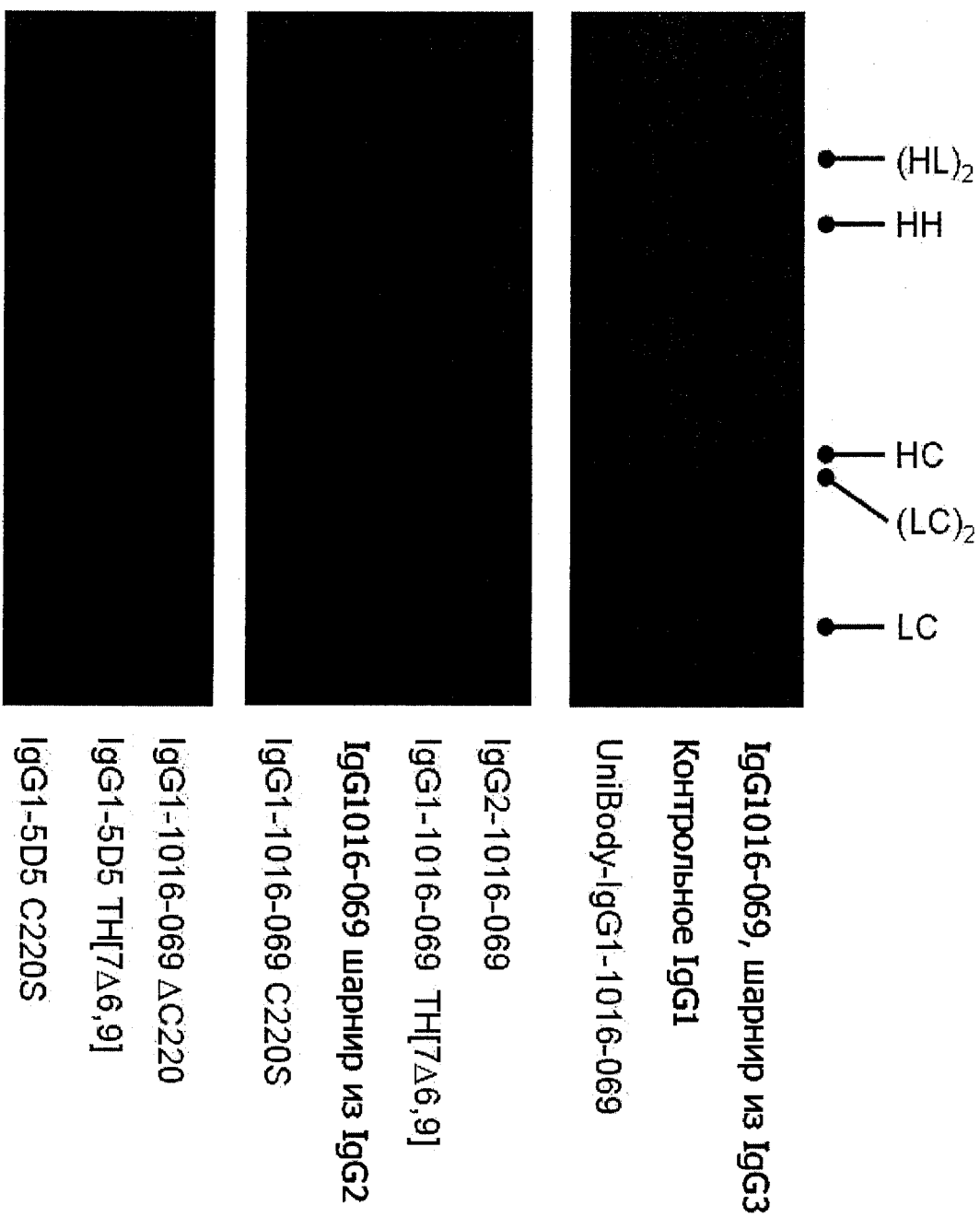
Фиг. 10



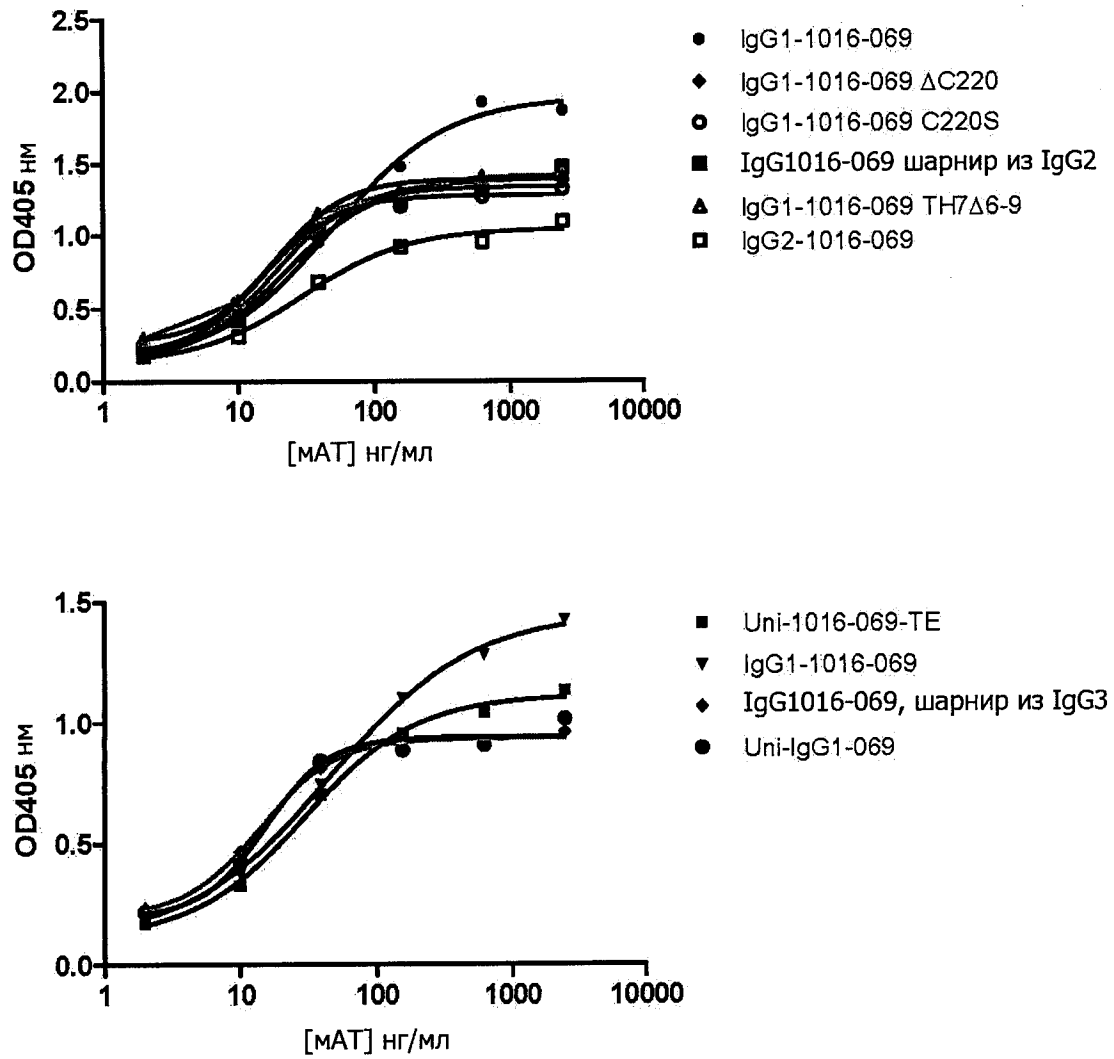
Фиг. 11



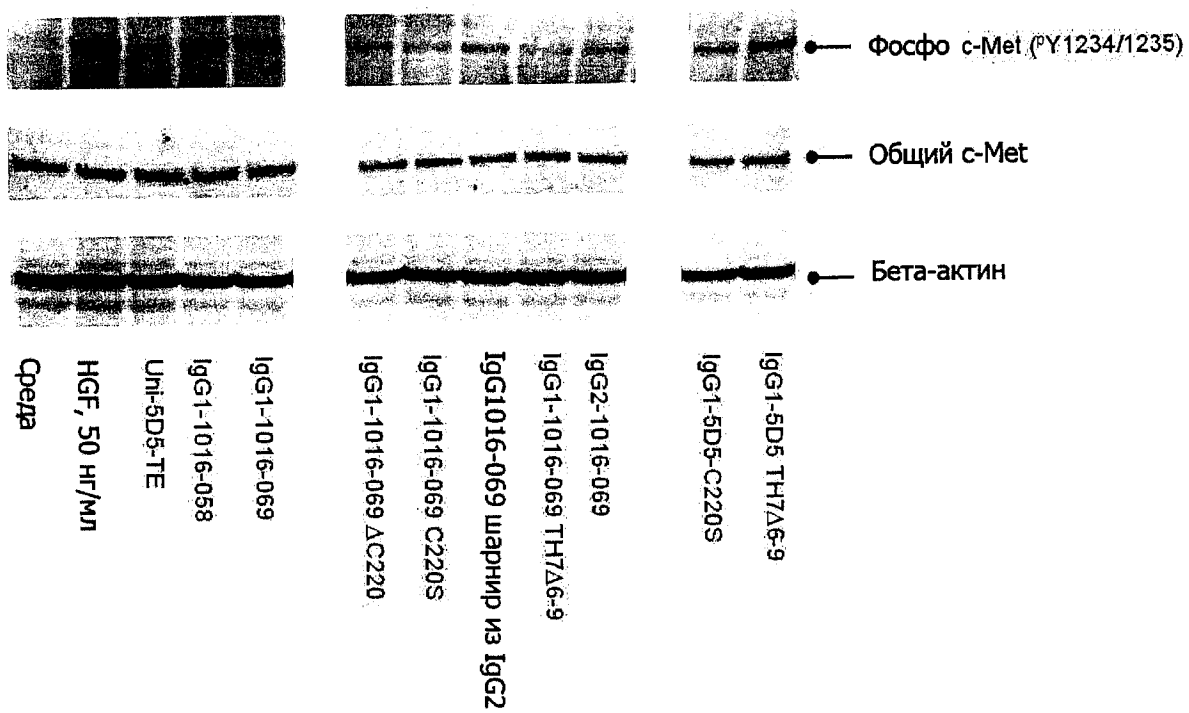
Фиг. 12



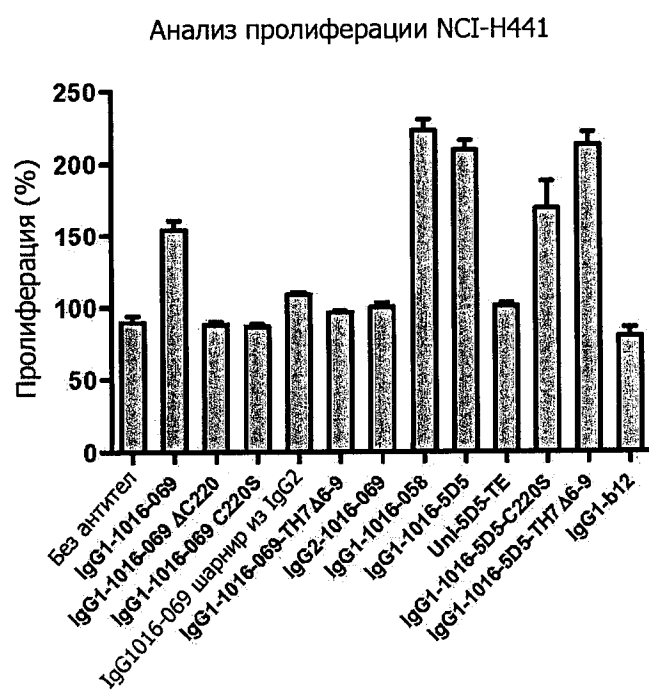
Фиг. 13



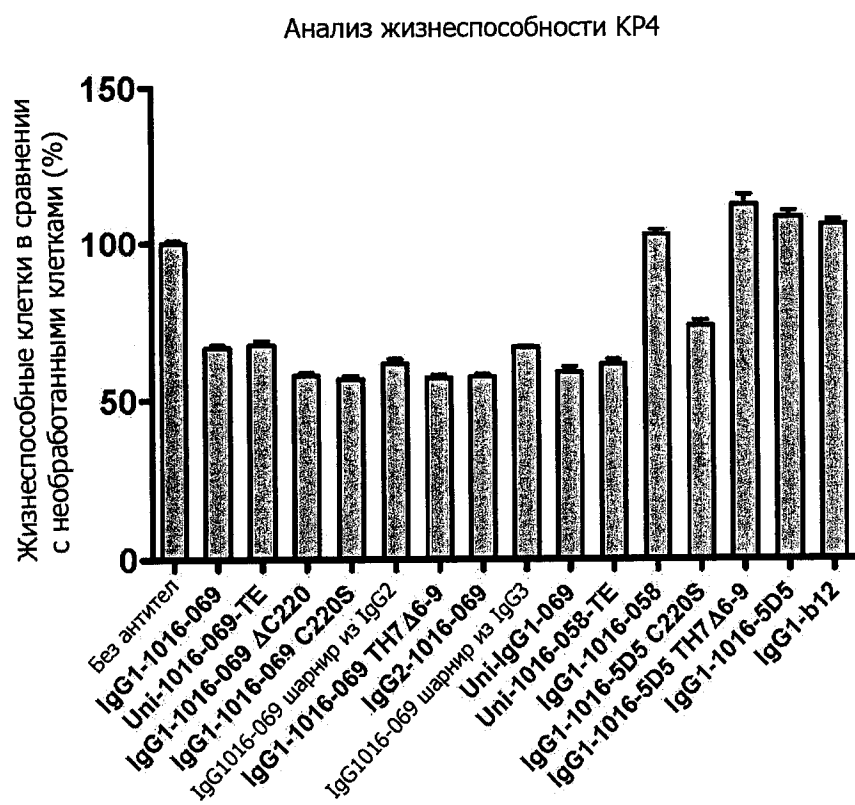
Фиг. 14



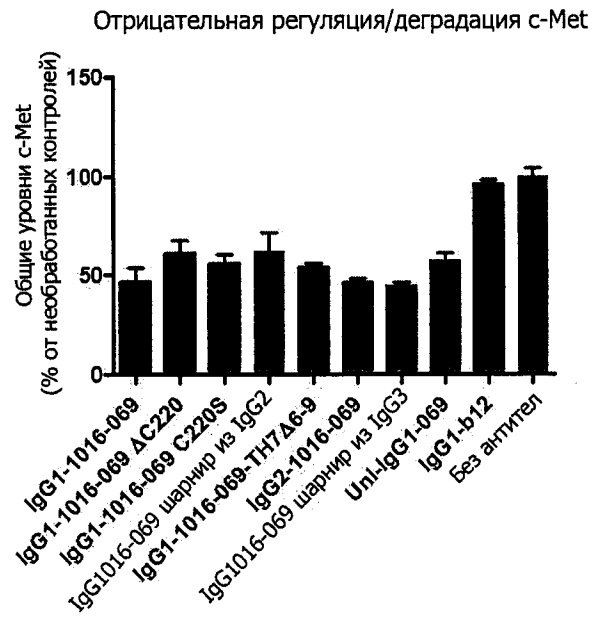
Фиг. 15



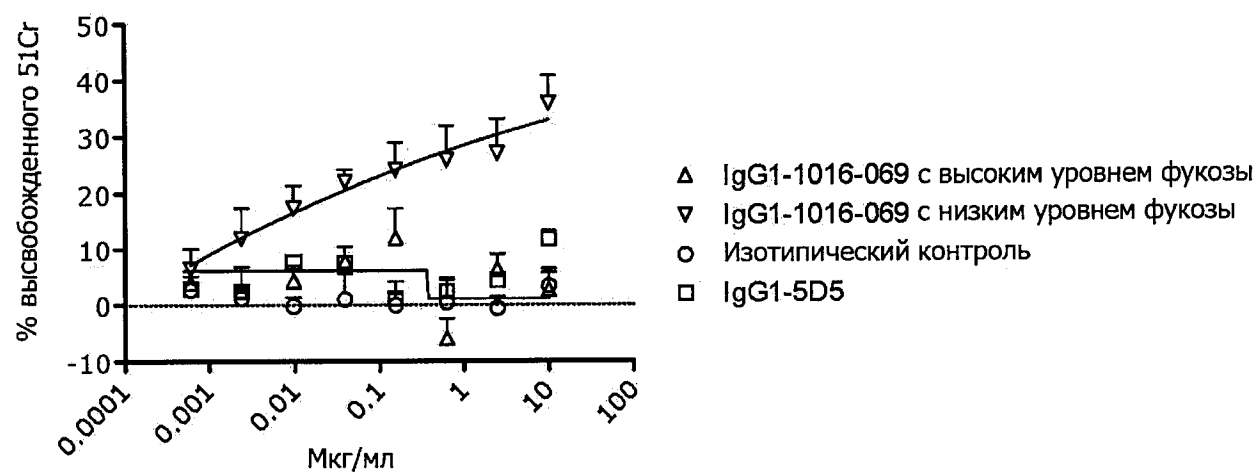
Фиг. 16



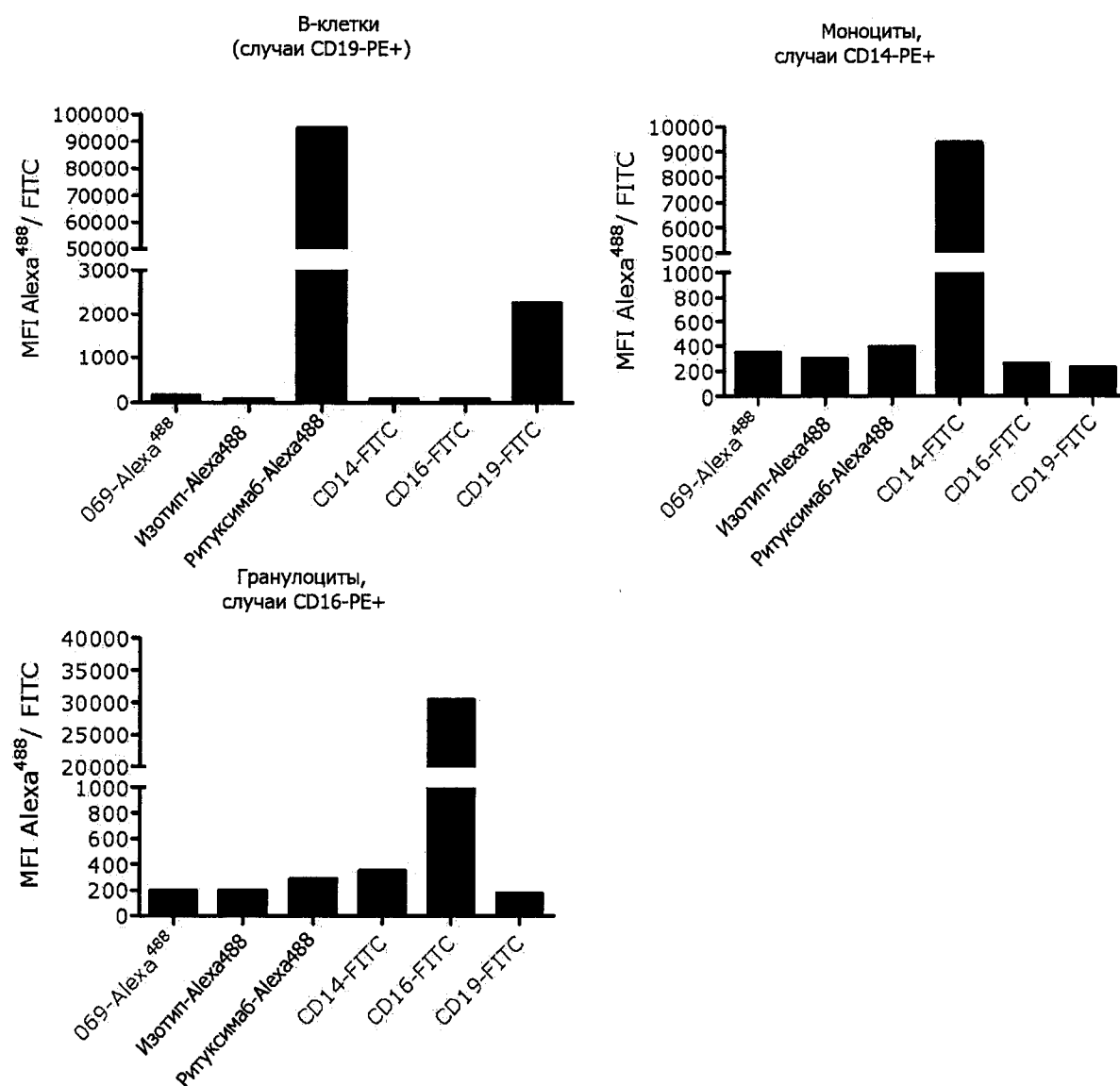
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20