

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201692042 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.01.30

(22) Дата подачи заявки
2012.11.21

(51) Int. Cl. C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛО ПРОТИВ TROP-2 ЧЕЛОВЕКА, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ IN VIVO

(31) 61/562,672

(32) 2011.11.22

(33) US

(62) 201491006; 2012.11.21

(71) Заявитель:
ЛИВТЕХ, ИНК. (JP)

(72) Изобретатель:
Накамура Кодзи, Окамура Кентаро,
Тамура Маки, Янаи Хироюки, Канке
Тору (JP), Цурусита Наоя, Кумар
Шанкар (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к антителу, которое специфично взаимодействует с hTROP-2 и обладает противоопухолевой активностью in vivo (в частности, гуманизированному антителу); гибридоме, которая продуцирует указанное выше антитело; конъюгату указанного выше антитела и лекарственного средства; фармацевтической композиции для диагностики или лечения опухоли; способу выявления опухоли и набору для выявления или диагностики опухоли.

A1

201692042

201692042

A1

**АНТИТЕЛО ПРОТИВ TROP-2 ЧЕЛОВЕКА, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ
АКТИВНОСТЬЮ *IN VIVO***

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к антителу против TROP-2 человека, обладающему противоопухолевой активностью, и в частности, к антителу против TROP-2 человека, обладающему противоопухолевой активностью *in vivo*. Кроме того, настоящее изобретение относится к гибридоме, которая продуцирует указанной выше антитело, и к применению указанного выше антитела.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

TROP-2 человека (Tacstd2, GA733-1 и EGP-1) (далее также называемый «hTROP-2») является белком клеточной мембраны типа 1 с одним трансмембранным доменом, состоящим из 323 аминокислотных остатков (см. SEQ ID NO:2), и было известно, что такой белок сверхэкспрессируется в разных типах карцином эпидермальных клеток. Присутствие белка клеточной мембраны, связанного с иммунологической резистентностью, который обычно экспрессируется и в трофобластах человека и в злокачественных клетках, предполагалось давно (непатентный документ 1). Была идентифицирована молекула антигена, распознаваемая моноклональными антителами мыши (162-25.3, 162-46.2), взаимодействующими с белком клеточной мембраны линии клеток хориокарциномы человека BeWo. Такую молекулу антигена считали одной из молекул, экспрессируемых в трофобластах человека, и она была названа Trop-2 (непатентный документ 2). Впоследствии такая же молекула была открыта другими исследователями. Другими словами, опухолевый антиген, распознаваемый моноклональным антителом мыши GA733, которое получено путем иммунизации клетками рака желудка SW948, назван GA733-1 (непатентный документ 3), и эпителиальный гликопротеин, распознаваемый моноклональным антителом мыши RS7-3G11, которое получено иммунизацией клетками немелкоклеточного рака легкого, назван эпителиальным/антигеном карциномы, EGP-1 (непатентный документ 4). В 1995 году клонировали ген Trop-2, и в результате было

подтверждено, что такие молекулы представляют собой одинаковые молекулы (непатентный документ 5). Кроме того, было выяснено, что молекула обладает функцией усиления внутриклеточных сигналов кальция в злокачественных клетках (непатентный документ 6), и поэтому ее также называли ассоциированной с опухолью трансдуктор сигнала кальция 2 (TACSTD2).

Ген hTROP-2 картирован в хромосоме 1p32 и составляет семейство генов TACSTD вместе с GA733-2, имеющим с ним гомологию примерно 50% (который был известен как «TACSTD1», «эпителиальный гликопротеин EGP-2», «ErCAM» или «Trop-1») (непатентный документ 7). Белок hTROP-2 (323 аминокислотных остатка; SEQ ID NO:2) имеет молекулярную массу примерно 36 кД, и такой белок состоит из гидрофильного сигнального пептида (с 1-ой по 26-ю аминокислоту), внеклеточного домена (с 27-ой по 274-ю аминокислоту), трансмембранного домена (с 275-ой по 297-ю аминокислоту) и внутриклеточного домена (с 298-ой по 323-ю аминокислоту). Внеклеточный домен имеет четыре участка гетерогенного N-связанного гликозилирования, и его кажущаяся молекулярная масса возрастает на 11-13 кД из-за добавления цепей сахара (непатентный документ 5). Считается, что семейство генов TACSTD имеет характерную последовательность тиреоглобулина (TY) во внеклеточном домене и связано с пролиферацией, инвазией и метастазированием злокачественных клеток.

До настоящего времени физиологический лиганд hTROP-2 не был идентифицирован, и его молекулярная функция не была выяснена. Однако было описано, что hTROP-2 передает кальциевый сигнал в опухолевых клетках (непатентный документ 6). Кроме того, на основании таких фактов, что внутриклеточный серин 303 фосфорилируется протеинкиназой C (PKC), которая является Ca^{2+} -зависимой киназой (непатентный документ 4), и что hTROP-2 имеет PIP2-связывающую последовательность в своем внутриклеточном домене, предположили, что hTROP-2 выполняет сигнальную функцию в опухолевых клетках (непатентный документ 8).

В результате анализов, таких как иммуногистохимический (IHC) и проточно-цитометрический анализы, сообщалось о

сверхэкспрессии hTROP-2 во многих типах, происходящих из эпителия карцином, таких как рак желудка, рак легкого, рак прямой и ободочной кишки, рак яичника, рак молочной железы, рак простаты, рак поджелудочной железы, рак печени и рак пищевода. Напротив, экспрессия hTROP-2 в нормальных тканях ограничена клетками в эпителиальной области, и уровень экспрессии hTROP-2 в нормальных клетках ниже, чем в злокачественных клетках. Таким образом, предполагается ассоциация TROP-2 с образованием опухолей (патентные документы 1-3 и 9).

Кроме того, было показано, что экспрессия hTROP-2, используемая в качестве биомаркера в клинических образцах, коррелирует со злокачественностью в случае рака прямой и ободочной кишки (непатентные документы 10 и 11), рака поджелудочной железы (непатентный документ 12) или рака полости рта (непатентный документ 13), и что в том случае, когда hTROP-2 сверхэкспрессируется, возможность метастазов или рецидива такой злокачественной опухоли очень высока. Кроме того, в крупномасштабном анализе экспрессии генов с использованием методики, основанной на микроматрицах кДНК, hTROP-2 был идентифицирован в виде генного кластера, который сверхэкспрессируется на наиболее высоком уровне в случае тяжелой папиллярной аденокарциномы яичника, по сравнению с нормальным эпителием яичника (непатентный документ 14).

Кроме того, в последние годы важная роль hTROP-2 в образовании опухолей была показана в моделях с использованием злокачественных клеток ободочной кишки (непатентный документ 15). Так как экспрессия hTROP-2 стимулирует независимую от заякоривания пролиферацию опухолевых клеток и необходима для образования опухолей и пролиферации злокачественных клеток, подкожно трансплантированных мышам с иммунодефицитом, то появляется вероятность того, что hTROP-2 может действовать как функциональный опухолевый антиген и может быть использован в качестве новой терапевтической мишени.

В настоящее время имеются сообщения об исследованиях, имеющих отношение к противоопухолевым эффектам нескольких анти-hTROP-2-антител. Антитело RS7 (патентный документ 1) было

исследовано с применением моделей *in vivo*, в которых использовали меченые радиоактивными веществами антитела, и была показана противоопухолевая активность в моделях ксенотрансплантатов у мышей *nude*. Однако о противоопухолевых эффектах отдельного антитела («голового» антитела) не сообщалось.

Кроме того, сообщалось о цитотоксичности связанного с цитотоксином моноклонального анти-hTROP-2-антитела BR110 (патентный документ 2) по отношению к линиям злокачественных клеток человека H3619, H2987, MCF-7, H3396 и H2981 в экспериментах *in vitro*. Однако цитотоксичность «голового» антитела или иммуноконъюгата BR110 *in vivo* не была описана.

В последние годы сообщалось, что изолированное моноклональное антитело, которое было получено из линии клеток гибридомы AR47A6.4.2 или AR52A301.5, полученных в результате иммунизации мышей тканями злокачественных опухолей яичника человека, связывается с hTROP-2, и что, во-первых, он проявляет в виде «голового» антитела противоопухолевую активность в моделях на основе ксенотрансплантатов у мышей *nude*, а также цитотоксичность *in vitro* (патентные документы 3 и 4). В указанных патентных документах указанное выше антитело проявляло противоопухолевые эффекты при обработке только антителом в моделях ксенотрансплантатов у мышей, которым трансплантировали линии злокачественных клеток поджелудочной железы ВхРС-3 и PL45, линию злокачественных клеток простаты РС-3, линию злокачественных клеток молочной железы MCF-7 и линию злокачественных клеток ободочной кишки Colo205. Терапевтические эффекты антитела проявлялись в моделях, в которых были трансплантированы клетки ВхРС-3. Помимо этого образование опухолей и пролиферация были только частично (примерно от 40% до 60%) подавлены в результате профилактического введения антитела, и было необходимо чрезвычайно большое количество (примерно 20 мг/кг) антитела для такого подавления образования опухоли и пролиферации.

На основании описанных выше предыдущих данных было высказано предположение о возможном применении анти-hTROP-2-антитела в качестве противоопухолевого антитела. Однако не все

анти-hTROP-2-антитела проявляют противоопухолевые эффекты при лечении только антителом в виде «голового» антитела *in vivo*. Антитела оказывают разное действие на hTROP-2, в зависимости от участка связывания, аффинности и свойств моноклонального антитела.

Патентный документ 1: патент США № 6653104

Патентный документ 2: патент США № 5840854

Патентный документ 3: патент США № 7420040

Патентный документ 4: патент США № 7420041

Непатентный документ 1: Faulk WP, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75(4), pp. 1947-1951 (1978)

Непатентный документ 2: Lipinski M, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78(8), pp. 5147-5150 (1981)

Непатентный документ 3: Linnenbach AJ, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86(1), pp. 27-31 (1989)

Непатентный документ 4: Basu A, et al., Int. J. Cancer, 62(4), pp. 472-479 (1995)

Непатентный документ 5: Fornaro M, et al., Int. J. Cancer, 62(5), pp. 610-618 (1995)

Непатентный документ 6: Ripani E, et al., Int. J. Cancer, 76(5), pp. 671-676 (1998)

Непатентный документ 7: Calabrese G, et al., Cell Genet., 92(1-2), pp. 164-165 (2001)

Непатентный документ 8: El Sewedy T et al., Int. J. Cancer, 75(2), pp. 324-330 (1998)

Непатентный документ 9: Cubas R, et al., Biochim. Biophys. Acta., 1796(2), pp. 309-314 (2009)

Непатентный документ 10: Ohmachi T et al., Clin. Cancer Res., 12(10), pp. 3057-3063 (2006)

Непатентный документ 11: Fang YJ, et al., Int. J. Colorectal Dis., 24(8), pp. 875-884 (2009)

Непатентный документ 12: Fong D, et al., Br. J. Cancer, 99(8), pp. 1290-1295 (2008)

Непатентный документ 13: Fong D, et al., Mod. Pathol., 21(2), pp. 186-191 (2008)

Непатентный документ 14: Santin AD, et al., Int. J.

Cancer, 112(1), pp. 14-25 (2004)

Непатентный документ 15: Wang J, et al., Mol. Cancer Ther., 7(2), pp. 280-285 (2008)

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЕ

В указанных выше случаях было желательно разработать анти-hTROP-2-антитело (моноклональное анти-hTROP-2-антитело), обладающее высокой противоопухолевой активностью *in vivo*, и в частности, анти-hTROP-2-антитело или тому подобное, которое оказывает противоопухолевое действие в виде «голового» антитела отдельно *in vivo*, и кроме того, которое оказывает противоопухолевое действие в низкой дозе, и в частности, такое анти-hTROP-2-антитело, которое является гуманизированным антителом.

Настоящее изобретение было осуществлено с учетом вышеуказанных обстоятельств. Настоящее изобретение относится к анти-hTROP-2-антителу (моноклональному анти-hTROP-2-антителу), гибридоме, которая продуцирует антитело, фрагменту антитела, конъюгату (иммуноконъюгату) антитела или тому подобному и лекарственному средству, фармацевтической композиции для диагностики или лечения опухоли, способу выявления опухоли, набору для выявления или диагностики опухоли, и тому подобному, которые описаны ниже.

(1) Антитело против TROP-2 человека, в котором V-область H-цепи антитела состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:92 или 98, и V-область L-цепи антитела состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:93.

В антителе по п. (1), указанному выше, аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области H-цепи антитела показаны в SEQ ID NO:36-38, соответственно, и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи антитела показаны в SEQ ID NO:41-43, соответственно.

(2) Антитело против TROP-2 человека, в котором V-область H-цепи антитела состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:94 или 95, и V-область L-цепи антитела состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ

ID NO:96.

В антителе по п. (2), указанному выше, аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи антитела показаны в SEQ ID NO:66-68, соответственно, и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи антитела показаны в SEQ ID NO:71-73, соответственно.

Примером антитела по пп. (1) и (2), указанным выше, является гуманизированное антитело.

Примером антитела по пп. (1) и (2), указанным выше, является антитело, обладающее противоопухолевой активностью *in vivo*.

Примером антитела по пп. (1) и (2), указанным выше, является антитело, проявляющее 50% или больше ингибирующей опухолевой рост активности в дозе от 5 до 20 мг/кг массы тела. При этом частота введения для проявления ингибирующей опухолевой рост активности составляет, например, не более одного раза в неделю.

Примером антитела по пп. (1) и (2), указанным выше, является антитело, проявляющее 50% или больше ингибирующей опухолевой рост активности при однократном введении антитела в дозе 10 мг/кг массы тела.

Примером антитела по пп. (1) и (2), указанным выше, является антитело, обладающее противоопухолевой активностью по отношению к двум или больше типам линий опухолевых клеток человека.

Примером антитела по пп. (1) и (2), указанным выше, является антитело, имеющее константу диссоциации (значение K_d) $1,0 \times 10^{-10}$ М или меньше.

Примером антитела по пп. (1) и (2), указанным выше, является моноклональное антитело.

При этом опухоль относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака яичника человека, рака легкого человека и рака желчных протоков человека.

Предпочтительно, опухоль относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака легкого человека и рака яичника человека.

Кроме того, опухоль представляет собой, например, рецидивирующую злокачественную опухоль или метастатическую злокачественную опухоль.

Кроме того, линии опухолевых клеток относятся, например, по меньшей мере к двум типам, выбранным из группы, состоящей из линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека VxPC-3, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека KP-3L, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека KP-2, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-1, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-45H, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-45P, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека TCC-PAN2, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека SUI-2, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека CACO-2, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека DLD-1, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека HCT 116, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека JIMT-1, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека HCC1143, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MCF-7, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MDA-MB-468, линии клеток злокачественной опухоли простаты человека DU145, линии клеток злокачественной опухоли простаты человека PC-3, линии клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3, линии клеток злокачественной опухоли яичника человека SK-OV-3 и линии клеток злокачественной опухоли желчных

протоков человека TFK-1. Среди прочих предпочтительными линиями опухолевых клеток являются, по меньшей мере, два типа, выбранные из группы, состоящей из линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека BxPC-3, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480, линии клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MDA-MB-468 и линии клеток злокачественной опухоли яичника человека SK-OV-3.

(3) Фрагмент антитела, полученный из антитела по пп. (1) и (2), указанным выше.

Примеры фрагмента антитела по п. (3), указанному выше, включают фрагмент антитела, содержащий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 92 или 98, и/или аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 93, или фрагмент антитела, содержащий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 94 или 95, и/или аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 96.

(4) Конъюгат антитело-лекарственное средство, который содержит антитело по п. (1) и (2), указанным выше, и вещество, обладающее противоопухолевой активностью и/или вызывающей гибель клеток активностью.

(5) Конъюгат фрагмент антитела-лекарственное средство, который содержит фрагмент антитела по п. (3), указанному выше, и вещество, обладающее противоопухолевой активностью и/или вызывающей гибель клеток активностью.

В конъюгате по п. (4) и (5), указанному выше, опухоль относится, например, по меньшей мере, к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака яичника человека, рака легкого человека и рака желчных протоков человека. Среди прочих предпочтительно, опухоль относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака

молочной железы человека, рака легкого человека и рака яичника человека. Кроме того, опухоль представляет собой, например, рецидивирующую злокачественную опухоль или метастатическую злокачественную опухоль.

(6) Фармацевтическая композиция, которая содержит по меньшей мере один тип средства, выбранного из группы, состоящей из антитела по п. (1) и (2), указанному выше, фрагмента антитела по п. (3), указанному выше, и конъюгата по п. (4) и (5), указанному выше.

Примеры композиции по п. (6), указанному выше, включают композицию, которую применяют для лечения опухоли, композицию, которая не вызывает снижения массы в качестве побочного эффекта, и композицию, которую применяют для диагностики опухоли. В данном случае опухоль относится, например, по меньшей мере, к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака яичника человека, рака легкого человека и рака желчных протоков человека. Среди прочих опухоль, предпочтительно, относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака легкого человека и рака яичника человека. Кроме того, опухоль представляет собой, например, рецидивирующую злокачественную опухоль или метастатическую злокачественную опухоль.

(7) Средство для терапии опухоли, которое содержит по меньшей мере один тип средства, выбранный из группы, состоящей из антитела по п. (1) и (2), указанному выше, фрагмента антитела по п. (3), указанному выше, и конъюгата по п. (4) и (5), указанному выше.

Примером средства для терапии опухоли по п. (7), указанному выше, является средство для терапии опухоли, которое не вызывает снижения массы в качестве побочного эффекта. В данном случае опухоль относится, например, по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака

поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака яичника человека, рака легкого человека и рака желчных протоков человека. Среди прочих, опухоль предпочтительно представляет собой, по меньшей мере, одну опухоль, выбранную из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака легкого человека и рака яичника человека.

(8) Средство для диагностики опухоли, которое содержит по меньшей мере один тип средства, выбранного из группы, состоящей из антитела по п. (1) и (2), указанному выше, фрагмента антитела по п. (3), указанному выше, и конъюгата по п. (4) и (5), указанному выше.

В случае средства для диагностики опухоли по п. (8), указанному выше, опухоль относится, например, по меньшей мере, к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака яичника человека, рака легкого человека и рака желчных протоков человека. Среди прочих опухоль, предпочтительно, представляет собой по меньшей мере одну опухоль, выбранную из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака легкого человека и рак яичника человека.

(9) Способ выявления опухоли, который включает: обеспечение возможности для по меньшей мере одного типа средства, выбранного из группы, состоящей из антитела по п. (1) и (2), указанному выше, фрагмента антитела по п. (3), указанному выше, и конъюгата по п. (4) и (5), указанному выше, взаимодействовать с образцом, полученным из живого организма; и затем регистрацию сигнала(ов) вступившего во взаимодействие антитела и/или фрагмента антитела.

В способе выявления опухоли по п. (9), указанному выше, опухоль относится, например, по меньшей мере к одному типу,

выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака яичника человека, рака легкого человека и рака желчных протоков человека. Среди прочих опухоль, предпочтительно, представляет собой по меньшей мере одну опухоль, выбранную из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака легкого человека и рака яичника человека.

(10) Набор для лечения, диагностики или выявления опухоли, который содержит по меньшей мере один тип средства, выбранного из группы, состоящей из антитела по п. (1) и (2), указанному выше, фрагмента антитела по п. (3), указанному выше, и конъюгата по п. (4) и (5), указанному выше.

В случае набора для лечения, диагностики или выявления опухоли по п. (10), указанному выше, опухоль относится, например, по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака яичника человека, рака легкого человека и рака желчных протоков человека. Среди прочих, опухоль, предпочтительно, представляет собой по меньшей мере одну опухоль, выбранную из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака легкого человека и рака яичника человека.

(11) Полинуклеотид, кодирующий антитело по п. (1) и (2), указанному выше.

(12) Полинуклеотид, кодирующий фрагмент антитела по п. (3), указанному выше.

(13) Рекомбинантный вектор, содержащий полинуклеотид по п. (11) или (12), указанному выше.

(14) Трансформант, содержащий рекомбинантный вектор по п. (13), указанному выше.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На фигуре 1 показано измерение аффинности связывания

антигена (K_d : константа диссоциации) моноклонального анти-hTROP-2-антитела (K5-70). $At_{\text{сум}}$: антитело (суммарное); $Ag_{\text{св}}$: антиген (свободный).

На фигуре 2 показана реактивность надосадка культуры гибридомы, продуцирующей моноклональное анти-hTROP-2-антитело, по отношению к клеткам NuH-7 (hTROP-2-негативные) и клеткам NuH-7-hTROP-2. Заштрихованная гистограмма показывает клетки NuH-7, и незаштрихованная гистограмма показывает клетки NuH-7-hTROP-2.

На фигуре 3 показана реактивность моноклонального анти-hTROP-2-антитела по отношению к линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека (клетки PK-59), которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на клеточной поверхности. Заштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии только со вторым антителом (PE-меченое антитело против IgG мыши), и незаштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии с каждым моноклональным анти-hTROP-2-антителом.

На фигуре 4 показана реактивность моноклонального анти-hTROP-2-антитела по отношению к линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека (клетки BxPC-3), которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на клеточной поверхности. Заштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии только со вторым антителом (PE-меченое антитело против IgG мыши), и незаштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии с каждым моноклональным анти-hTROP-2-антителом.

На фигуре 5 показана реактивность моноклонального анти-hTROP-2-антитела (K5-70) по отношению к линиям клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека. Заштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии только со вторым антителом (PE-меченое антитело против IgG мыши), и незаштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии с каждым моноклональным анти-hTROP-2-антителом.

На фигуре 6 показана реактивность моноклонального анти-

hTROP-2-антитела (K5-70) по отношению к линиям клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека (Colo320, CACO2, SW480, DLD1, CW2 и НСТ 116), линиям клеток злокачественной опухоли молочной железы человека (JIMT-1 и HCC1143) и линиям клеток злокачественной опухоли простаты человека (PC-3 и DU145). Заштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии только со вторым антителом (РЕ-меченое антитело против IgG мыши), и незаштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеточной линии с моноклональным анти-hTROP-2-антителом.

На фигуре 7 показана перекрестная реактивность моноклональных анти-hTROP-2-антител с TROP-2 мыши. Использовали клетки, полученные благодаря обеспечению возможности временной экспрессии гена TROP-2 мыши в клетках CHO-K1, и антитело T2-102 (IgG1 мыши), проявляющие перекрестную реактивность с TROP-2 мыши, использовали в качестве позитивного контрольного антитела. Заштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеток только со вторым антителом (РЕ-меченое антитело против IgG мыши), и незаштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеток с каждым моноклональным анти-hTROP-2-антителом.

На фигуре 8 показана перекрестная реактивность моноклональных анти-hTROP-2-антител по отношению к EpCAM/TROP-1 человека. Использовали клетки, полученные благодаря обеспечению возможности временной экспрессии гена EpCAM/TROP-1 человека в клетках CHO-K1, и РЕ-меченое моноклональное антитело против EpCAM человека (Becton, Dickinson and Company) использовали в качестве позитивного контрольного антитела. Заштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеток только со вторым антителом (РЕ-меченое антитело против IgG мыши), и незаштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеток с каждым моноклональным анти-hTROP-2-антителом.

На фигуре 9 показана ингибирующая рост клеток активность анти-hTROP-2-антител (T6-16, T5-86, K5-70 и K5-107) в отношении линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека (клетки PK-59). mIgG означает контрольное антитело

(IgG мыши), и YY01 означает коммерчески доступное анти-hTROP-2-антитело (Santa Cruz). Белая колонка: 0 мкг/мл; серая колонка: 0,1 мкг/мл; черная колонка: 1 мкг/мл. Уровень активности выражали в виде отношения реального значения к значению, получаемому, когда антитело не было добавлено (0 мкг/мл). Столбик ошибки показывает стандартное отклонение. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 10 показан анализ способом исследования зарастания царапины линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека (клетки PK-59) в присутствии анти-hTROP-2-антител (T6-16 и K5-70).

На фигуре 10А показаны типичные примеры фотографий области царапины в клетках PK-59. День 0 относится к типичному примеру ситуации сразу после нанесения царапины. Обозначением mIgG (день 1) показана фотография, сделанная через 1 день (24 часа) после нанесения царапины и затем добавления контрольного антитела (IgG мыши, 1 мкг/мл) в среду. Обозначением K5-70 (день 1) показана фотография, сделанная через 1 день (24 часа) после нанесения царапины и затем добавления антитела K5-70 (1 мкг/мл) в среду. Обозначением T6-16 (день 1) показана фотография, сделанная через 1 день (24 часа) после нанесения царапины и затем добавления антитела T6-16 (1 мкг/мл) в среду. Каждая стрелка на каждой фотографии указывает ширину области царапины.

Фигура 10В. Область нанесения царапины анализировали, используя компьютерную программу для анализа изображений (Scion Image), и на основании полученного значения вычисляли значение для каждого тестируемого антитела с использованием значения, полученного в 0 день для группы с добавлением контрольного антитела (mIgG) в качестве стандартного значения, равного 1.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 11 представлено изображение, иллюстрирующее FACS-анализ, показывающий экспрессию маркера стволовых клеток в линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59. На фигуре 11А представлено изображение, иллюстрирующее FACS-анализ, показывающий экспрессию EpCAM в клетках PK-59. Заштрихованная гистограмма показывает

взаимодействие клеток только со вторым антителом (РЕ-меченое антитело против IgG мыши), и незаштрихованная гистограмма показывает взаимодействие клеток с антителом против ЕрсАМ человека (Becton, Dickinson and Company). На фигурах 11В и С представлены изображения, иллюстрирующие FACS-анализ, показывающий экспрессию Р-гликопротеина/MCR1 человека в клетках РК-59 (фигура 11В) и экспрессию ABCG2 в клетках РК-59 (фигура 11С). Синяя гистограмма показывает взаимодействие клеток только со вторым антителом, и красная гистограмма показывает взаимодействие клеток с антителом против Р-гликопротеин/MDR1 человека (BD Biosciences Pharmingen) (фигура 11В) или с антителом против ABCG2 человека (BD Biosciences Pharmingen) (фигура 11С). На фигуре 11D показан FACS-анализ, в котором клетки РК-59 дважды красили маркерами стволовых клеток рака поджелудочной железы, ФИТЦ-меченым антителом против CD24 человека (BD Biosciences Pharmingen) и РЕ-меченым антителом против CD44 человека (BD Biosciences Pharmingen). Каждое число на фигуре 11D показывает существующую долю клеток в каждой фракции.

На фигуре 12 показана оценка противоопухолевой активности нового клона моноклонального анти-hTROP-2-антитела K5-70 (IgG2a мыши) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток РК-59.

На фигуре 12А показан временной ход роста опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка указывает период введения антитела. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 12В показана нанесенная на графике масса опухолей каждой мыши на 21-ый день (день 21) (последний день эксперимента) проведения теста, показанного на фигуре 12А. Числовое значение на каждом графике показывает среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 13 показана оценка противоопухолевой активности клона K5-107 (А), клона Т6-16 (В) и клона K5-116-2-1 (С) в

моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток РК-59. Символ «●» показывает контрольную группу (IgG мыши), и символ «○» показывает группу введения анти-hTROP-2-антитела (10 мг/кг массы тела). Стрелка на графике показывает период введения антитела, и числовое значение на каждом графике показывает среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. $*P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 14 показана оценка противоопухолевой активности клона K5-70 (фигура 14А), клона Т6-16 (фигура 14В) и клона K5-116-2-1 (фигура 14С) в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием клеток РК-59. Символ «●» показывает контрольную группу (IgG мыши), и символ «○» показывает группу введения анти-hTROP-2-антитела (10 мг/кг массы тела). Стрелка на графике показывает период введения антитела, и числовое значение на каждом графике показывает среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. $**P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 15 показана оценка противоопухолевой активности клона K5-70 в моделях профилактики и лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток ВхРС-3. На фигуре 15А показан временной ход роста опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) в моделях профилактики (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. $**P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента). На фигуре 15В показан временной ход роста опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) в моделях лечения (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. $*P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 16 показана зависимость от дозы противоопухолевая активность клона K5-70 в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием клеток РК-59. Объем опухоли выражен в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

На фигуре 16А показан временной ход роста опухолей в

контрольной группе (●: IgG мыши) и в группах введения антитела K5-70 (□: 1 мг/кг массы тела, Δ: 5 мг/кг массы тела) в разных дозах (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента), ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 16B показана нанесенная на график масса опухолей каждой мыши во временной точке 17-ый день (день 17) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фигуре 16A. Числовое значение на каждом графике показывает среднее значение ± стандартное отклонение. ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

Фигура 17 представляет собой схематичное изображение химерного белка TROP-2 человека/мыши, используемого в эксперименте. SP: сигнальная последовательность; домен TY: область тиреоглобулина типа 1; TM: трансмембранная область; C: внутриклеточная область, при этом заштрихованная область представляет полипептид, полученный из hTROP-2, тогда как незаштрихованная область представляет полипептид, полученный из TROP-2 мыши. Число, указанное на схематичном изображении химерного белка сверху, показывает количество аминокислот белка TROP-2 мыши, и число, указанное снизу, показывает количество аминокислот белка hTROP-2.

На фигуре 18 показаны результаты, полученные при идентификации области связывания моноклонального анти-hTROP-2-антитела с использованием химерного TROP-2 человека/мыши. С использованием клеток HEK293, которые постоянно экспрессируют либо химерный белок TROP-2-C человека/мыши (hmTROP-2-C), либо химерный белок TROP-2-D мыши/человека (mhTROP-2-D), исследовали реактивность моноклональных анти-hTROP-2-антител, показанных на фигуре. В качестве негативного контроля использовали IgG2b мыши.

На фигуре 19 показаны результаты, полученные при идентификации области связывания антитела моноклонального анти-hTROP-2-антитела.

Ген hTROP-2 и каждый ген химерного TROP-2 человека/мыши вводили в клетки HEK293 и затем осуществляли FACS-анализ,

используя клетки, в которых гены были временно экспрессированы. На фигуре 19(A) показано исследование реактивности антител K5-70, K5-107, T5-86 и K5-116-2-1 по отношению к hTROP-2 (верхний ряд), по отношению к hmTROP-2-A (средний ряд) и по отношению к hmTROP-2-B (нижний ряд). В качестве негативного контроля использовали IgG2b мыши. На фигуре 19(B) показано исследование реактивности антител T6-4 и T6-16 по отношению к hTROP-2 (верхний ряд), по отношению к mhTROP-2-E (средний ряд) и по отношению к mhTROP-2-F (нижний ряд). В качестве негативного контроля использовали IgG2b мыши.

На фигуре 20 показана экспрессия hTROP-2 в нормальных тканях человека. Матрицы нормальных тканей человека иммунологически красили, используя моноклональное анти-hTROP-2-антитело клона K5-63-17. (A) кожа, (B) пищевод, (C) почка (корковое вещество), (D) почка (мозговое вещество), (E) поджелудочная железа, (F) простата, (G) мочевого пузыря, (H) миндалина, (I) сердце, (J) печень (увеличение: $\times 200$)

На фигуре 21 показана экспрессия hTROP-2 в тканях злокачественных опухолей. Матрицы злокачественных тканей человека иммунологически красили, используя моноклональное анти-hTROP-2-антитело клона K5-63-17. (A) рак молочной железы, (B) рак легкого, (C) рак пищевода, (D) рак желудка, (E) рак поджелудочной железы, (F) рак прямой и ободочной кишки, (G) рак мочевого пузыря, (H) рак простаты, (I) рак яичника (увеличение: $\times 100$)

На фигуре 22 показана противоопухолевая активность клона K5-70 при однократном введении в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием клеток PK-59.

На фигуре 22A показан временной ход образования опухолей в контрольной группе ($\bullet$: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) ($\circ$), (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелкой показано введение антитела. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента), ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 22B показана нанесенная на графике масса

опухолей каждой мыши во временной точке на 28-ой день (день 28) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фигуре 22А. $**P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 22С показан временной ход образования опухолей у каждой мыши в контрольной группе (●:IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○). Стрелкой указано введение антитела.

На фигуре 23 показана противоопухолевая активность клона K5-70 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием злокачественных клеток ободочной кишки человека SW480.

На фигуре 23А показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●:IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. $**P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 23В показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 44-й день (день 44) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фигуре 23А. $**P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 24 показана противоопухолевая активность клона K5-116-2-1 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток SW480.

На фигуре 24А показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●:IgG мыши) и в группе введения антитела K5-116-2-1 (10 мг/кг массы тела) (○) (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. $**P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 24В показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 42-ой день (день 42) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фигуре 24А. $**P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 25 показана противоопухолевая активность клона T6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток SW480.

На фигуре 25А показан временной ход образования опухолей в

контрольной группе (●:IgG мыши) и в группе введения антитела T6-16 (10 мг/кг массы тела) (○) (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 25В показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 42-ой день (день 42) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фигуре 25А. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 26 показана зависимость от дозы противоопухолевая активность клона K5-70 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток SW480.

На фигуре 26А показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●:IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (○: 1 мг/кг массы тела, Δ: 5 мг/кг массы тела, □: 10 мг/кг массы тела) (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 26В показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 42-ой день (день 42) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фигуре 26А. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 27 показана противоопухолевая активность клона K5-70 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток SW480.

На фигуре 27А показана противоопухолевая активность антитела K5-70 при введении с интервалами в одну неделю. Показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●:IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○: 10 мг/кг) (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Головки стрелок (дни 10, 17, 24, 31 и 38) указывают введение антитела K5-70. * $P < 0,05$, t-критерий Стьюдента.

Фигура 27В представляет собой изображение, показывающее противоопухолевую активность антитела K5-70 при введении с интервалами один раз каждые десять дней (q10d) или один раз

каждые две недели (q14d). На фигуре показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши, 10 мг/кг) и в группе введения антитела K5-70 (○: q10d, 10 мг/кг, Δ: q14d, 10 мг/кг) (среднее значение ± стандартное отклонение). Заштрихованными головками стрелок (▼: дни 9, 19 и 29) и незаштрихованными головками стрелок (▽: дни 9, 23 и 37) указано введение антитела K5-70. *P<0,05, **P<0,01, t-критерий Стьюдента.

На фигуре 28 показана зависимость от дозы противоопухолевая активность клона T6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток SW480.

На фигуре 28А показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела T6-16 (○: 1 мг/кг массы тела, Δ: 5 мг/кг массы тела, □: 10 мг/кг массы тела) (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 28В показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 43-ий день (день 43) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фигуре 28А. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 29 показана противоопухолевая активность клона T6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток SW480. Показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: IgG мыши, 10 мг/кг массы тела) и в группе введения антитела T6-16 антитело (10 мг/кг массы тела) (○: q7d, Δ: q10d) (среднее значение ± стандартное отклонение). Головки стрелок (дни 10, 17, 24, 31 и 38) и стрелки (дни 10, 20, 30 и 40) показывают введение антитела T6-16. Введение осуществляли один раз каждые три дня в контрольной группе. *P<0,05, **P<0,01, t-критерий Стьюдента.

На фигуре 30 показана противоопухолевая активность клона K5-70 в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием клеток простаты человека DU-145.

На фигуре 30А показан временной ход образования опухолей в

контрольной группе (●: IgG мыши) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента). На фигуре 30В показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 40-ой день (день 40) (последний день эксперимента) в тесте, показанном на фигуре 30А. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 31 показана ингибирующая метастазы активность клона K5-70 в модели метастазов в печени с использованием клеток РК-59.

На фигурах 31А и 31В показана фотография вырезанной печени в контрольной группе (●: IgG мыши) (А) и группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (В), которые были сделаны через 6 недель после трансплантации клеток. Стрелками показаны очаги метастазов в печени.

На фигуре 32 показана противоопухолевая активность K5-70 в моделях ксенотрансплантатов с использованием клеток SW480, которые являются моделями рецидивирующих злокачественных опухолей, после введения гидрохлорида иринотекана. На данной фигуре показан временной ход образования опухолей в группе без обработки (◆), в группе введения гидрохлорида иринотекана (40 мг/кг массы тела) + антитело K5-70 (○: 10 мг/кг массы тела) и в группе введения гидрохлорида иринотекана (40 мг/кг массы тела) + IgG мыши (●: 10 мг/кг массы тела) (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Головки стрелок (дни 11, 14, и 17) показывают введение гидрохлорида иринотекана. Антитело K-70 или IgG мыши вводили один раз каждые три дня, начиная с 20 дня. Стрелка показывает период введения антитела. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента.

На фигуре 33 показана нуклеотидная последовательность кДНК вариабельной области Н-цепи клона K5-70 (VH) (SEQ ID NO:34) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:35). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутый двумя чертами глутамин (Q) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *IYWIN*,

NIYPSDSYTNYNQKFKD и *TSMADY*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VH клона K5-70 показаны в SEQ ID NO:36-38, соответственно.

На фигуре 34 показана нуклеотидная последовательность кДНК вариабельной области L-цепи клона K5-70 (VL) (SEQ ID NO:39) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:40). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутая двумя чертами аспарагиновая кислота (D) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *RASQSIGTSH*, *YASESIS* и *QQSNSWPFT*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VL клона K5-70 показаны в SEQ ID NO:41-43, соответственно.

На фигуре 35 показана нуклеотидная последовательность кДНК вариабельной области H-цепи клона K5-107 (VH) (SEQ ID NO:44) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:45). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутый двумя чертами глутамин (Q) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *SYWMH*, *NIYPGGGYTNYDEKFKS* и *SSVFDY*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VH клона K5-107 показаны в SEQ ID NO:46-48, соответственно.

На фигуре 36 показана нуклеотидная последовательность кДНК вариабельной области L-цепи клона K5-107 (VL) (SEQ ID NO:49) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:50). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутая двумя чертами аспарагиновая кислота (D) показывает N-концевой аминокислотный остаток зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *RASQNIGTSH*, *YASESIS* и *QQSNSWPFT*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S.

Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VL клона K5-107 показаны в SEQ ID NO:51-53, соответственно.

На фигуре 37 показана нуклеотидная последовательность кДНК вариабельной области Н-цепи клона K5-116-2-1 (VH) (SEQ ID NO:54) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:55). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутый двумя чертами глутамин (Q) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *SYWIT*, *NIYPSDSYTNYNQKFRD* и *LFDY*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VH клона K5-116-2-1 показаны в SEQ ID NO:56-58, соответственно.

На фигуре 38 показана нуклеотидная последовательность кДНК вариабельной области L-цепи клона K5-116-2-1 (VL) (SEQ ID NO:59) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:60). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутая двумя чертами аспарагиновая кислота (D) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *RASQSIGTSH*, *YASESIS*, и *QQSNSWPFT*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VL клона K5-116-2-1 показаны в SEQ ID NO:61-63, соответственно.

На фигуре 39 показана нуклеотидная последовательность кДНК вариабельной области Н-цепи клона T6-16 (VH) (SEQ ID NO:64) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:65). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутая двумя чертами глутаминовая кислота (E) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *DYNMH*, *YIYPYNGGTGYNQRFKS* и *EDYGSSPSYAMDY*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VH клона T6-16 показаны в SEQ ID NO:66-68, соответственно.

На фигуре 40 показана нуклеотидная последовательность кДНК вариабельной области L-цепи клона T6-16 (VL) (SEQ ID NO:69) и рассчитанная аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:70). Сигнальный пептид показан курсивом. Подчеркнутая двумя чертами аспарагиновая кислота (D) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *RSSQSLVHGNGNTYLH*, *KVSNRFS* и *SQTTHVPT*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VL клона T6-16 показаны в SEQ ID NO:71-73, соответственно.

На фигуре 41 показано выравнивание аминокислотной последовательности (SEQ ID NO:35) вариабельной области H-цепи клона K5-70 (K5-70 VH), аминокислотной последовательности (SEQ ID NO:75) вариабельной области H-цепи гуманизированного K5-70 (HuK5-70 VH) и аминокислотной последовательности (SEQ ID NO:85) вариабельной области H-цепи акцептора (номер доступа в Genbank DA980102; SEQ ID NO:84), используемого для получения гуманизированного антитела (DA980102 VH). (Следует отметить, что каждая из аминокислотных последовательностей, показанных на фигуре, соответствует части аминокислотной последовательности каждой вариабельной области H-цепи (в частности, аминокислотной последовательности части зрелого белка, из которой удален сигнальный пептид)).

Аминокислотная последовательность, подчеркнутая в K5-70 VH, соответствует последовательности CDR, определенной согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Кроме того, число над аминокислотной последовательностью указывает номер положения аминокислоты, определенный согласно указанным выше определениям Кабата и соавторов. Каждая последовательность CDR в DA980102 VH указана символом «---», и при этом описание пропущено. Так как полагают, что аминокислота, подчеркнутая в HuK5-70 VH, важна для поддержания структуры CDR, последовательность K5-70 VH сохраняли. Кроме того, что касается аминокислоты, подчеркнутой двойной чертой в HuK5-70 VH, то

аминокислота соответствующей области DA980102 VH (метионин (M)) редко встречается в данном положении. Поэтому в целях снижения антигенности аминокислоту, подчеркнутую двойной чертой в HuK5-70 VH заменяли лейцином (L), как типичной аминокислотой, относящейся к той же подгруппе.

На фигуре 42 показано выравнивание аминокислотной последовательности (SEQ ID NO:40) вариабельной области L-цепи клона K5-70 (K5-70 VL), аминокислотной последовательности (SEQ ID NO:77) вариабельной области L-цепи гуманизированного K5-70 (HuK5-70 VL) и аминокислотной последовательности (SEQ ID NO:87; номер доступа в Genbank AAA64877) вариабельной области L-цепи акцептора (номер доступа в Genbank L41174; SEQ ID NO:86), используемого для получения гуманизированного антитела (L41174 VL). (Следует отметить, что каждая из аминокислотных последовательностей, показанных на фигуре, соответствует части аминокислотной последовательности каждой вариабельной области L-цепи (в частности, аминокислотной последовательности части зрелого белка, из которой удален сигнальный пептид)).

Аминокислотная последовательность, подчеркнутая в K5-70 VL, соответствует последовательности CDR, определенной согласно определениям Кабата и соавторов (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Кроме того, числа над аминокислотной последовательностью указывают номер положения аминокислоты, определенный согласно определениям Кабата и соавторов. Каждая последовательность CDR в L41174 VL указана символом «---», и при этом описание пропущено. Так как полагают, что аминокислота, подчеркнутая в HuK5-70 VL важная для поддержания структуры CDR, последовательность K5-70 VL сохраняли.

На фигуре 43 показано выравнивание аминокислотной последовательности (SEQ ID NO:65) вариабельной области H-цепи клона T6-16 (T6-16 VH), аминокислотных последовательностей (SEQ ID NO:79 и 81, соответственно) вариабельных областей H-цепи двух типов гуманизированного антитела T6-16 (HuT6-16 VH1 и HuT6-16 VH2) и аминокислотной последовательности (SEQ ID NO:89) вариабельной области H-цепи акцептора (номер доступа в Genbank

DA935238; SEQ ID NO:88), используемого для получения гуманизированного антитела (DA935238 VH). (Следует отметить, что каждая из аминокислотных последовательностей, показанных на фигуре, соответствует части аминокислотной последовательности каждой вариабельной области Н-цепи (в частности, аминокислотной последовательности части зрелого белка, из которой удален сигнальный пептид)).

Аминокислотная последовательность, подчеркнутая в HuT6-16 VH, соответствует последовательности CDR, определенной согласно определениям Кабата и соавторов (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Кроме того, число над аминокислотной последовательностью указывает номер положения аминокислоты, определенный согласно вышеуказанным определениям Кабата и соавторов. Каждая последовательность CDR в DA935238 VH указана символом «---», и при этом описание пропущено. Так как полагают, что аминокислоты, подчеркнуты в HuT6-16 VH1 и HuT6-16 VH2, важны для поддержания структуры CDR, последовательность T6-16 VH сохраняли. Кроме того, лизин (K) в положении 73 в HuT6-16 VH1 заменяли треонином (T), полученным из DA935238 в качестве акцепторной последовательности в HuT6-16 VH2.

На фигуре 44 показано выравнивание аминокислотной последовательности (SEQ ID NO:70) вариабельной области L-цепи клона T6-16 (T6-16 VL), аминокислотной последовательности (SEQ ID NO:83) вариабельной области L-цепи гуманизированного T6-16 (HuT6-16 VL) и аминокислотной последовательности (SEQ ID NO:91; номер доступа в Genbank AAA60341) вариабельной области L-цепи акцептора (номер доступа в Genbank M99608; SEQ ID NO:90), используемого для получения гуманизированного антитела (M99608 VL). (Следует отметить, что каждая из аминокислотных последовательностей, показанных на фигуре, соответствует части аминокислотной последовательности каждой вариабельной области L-цепи (в частности, аминокислотной последовательности части зрелого белка, из которой удален сигнальный пептид)).

Аминокислотная последовательность, подчеркнутая в T6-16 VL, соответствует последовательности CDR, определенной согласно

определениям Кабата и соавторов (как описано выше; U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Кроме того, число над аминокислотной последовательностью указывает номер положения аминокислоты, определенный согласно вышеуказанным определениям Кабата и соавторов. Каждая последовательность CDR в M99608 VL указана символом «---», и при этом описание пропущено.

На фигуре 45 показана последовательность гена (SEQ ID NO:74) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:75) HuK5-70 VH.

В верхнем ряду каждой линии показана последовательность гена (последовательность кДНК) и в нижнем ряду показана аминокислотная последовательность. В аминокислотной последовательности часть, представленная сигнальным пептидом, подчеркнута пунктирной линией, и каждая последовательность CDR (CDR 1-3) подчеркнута сплошной линией (аминокислотная последовательность только части зрелого белка, из которой удалена часть сигнального пептида, показана в SEQ ID NO:92). Сайт EcoRI (GAA TTC) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу гена HuK5-70 VH, и сайт NheI (GCT AGC) добавляли к его 3'-концу.

На фигуре 46 показана последовательность гена (SEQ ID NO:76) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:77) HuK5-70 VL.

В верхнем ряду каждой линии показана последовательность гена (последовательность кДНК) и в нижнем ряду показана аминокислотная последовательность. В аминокислотной последовательности часть, представленная сигнальным пептидом, подчеркнута пунктирной линией и каждая последовательность CDR (CDR 1-3) подчеркнута сплошной линией (аминокислотная последовательность только части зрелого белка, из которого удалена часть сигнального пептида, показана в SEQ ID NO:93). Сайт AgeI (ACC GGT) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу гена HuK5-70 VL, и сайт BsiWI (CGT ACG) добавляли к его 3'-концу.

На фигуре 47 показана последовательность гена (SEQ ID

NO:78) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:79) HuT6-16 VH1.

В верхнем ряду каждой линии показана последовательность гена (последовательность кДНК) и в нижнем ряду показана аминокислотная последовательность. В аминокислотной последовательности часть, представленная сигнальным пептидом, подчеркнута пунктирной линией, и каждая последовательность CDR (CDR 1-3) подчеркнута сплошной линией (аминокислотная последовательность только части зрелого белка, из которого удален сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO:94). Сайт EcoRI (GAA TTC) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу гена HuT6-16 VH1, и сайт NheI (GCT AGC) добавляли к его 3'-концу.

На фигуре 48 показана последовательность гена (SEQ ID NO:80) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:81) HuT6-16 VH2.

В верхнем ряду каждой линии показана последовательность гена (последовательность кДНК) и в нижнем ряду показана аминокислотная последовательность. В аминокислотной последовательности часть, представленная сигнальным пептидом, подчеркнута пунктирной линией, и каждая последовательность CDR (CDR 1-3) подчеркнута сплошной линией (аминокислотная последовательность только части зрелого белка, из которого удален сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO:95). Сайт EcoRI (GAA TTC) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу гена HuT6-16 VH2, и сайт NheI (GCT AGC) добавляли к его 3'-концу.

На фигуре 49 показана последовательность гена (SEQ ID NO:82) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:83) HuT6-16 VL.

В верхнем ряду каждой линии показана последовательность гена (последовательность кДНК) и в нижнем ряду показана аминокислотная последовательность. В аминокислотной последовательности часть, представленная сигнальным пептидом, подчеркнута пунктирной линией, и каждая последовательность CDR (CDR 1-3) подчеркнута сплошной линией (аминокислотная

последовательность только части зрелого белка, из которого удален сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO:96). Сайт AgeI (ACC GGT) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу гена HuT6-16 VL, и сайт BsiWI (CGT ACG) добавляли к его 3'-концу.

На фигуре 50 показаны результаты, полученные при подтверждении экспрессии антитела HuK5-70, антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2.

Фигура 50(A). Векторы экспрессии pFUSE-CHlg-HuK5-70 и pFUSE2-CLlg-HuK5-70 вводили в клетки 293F, и анализировали экспрессию антитела HuK5-70 в надосадке культуры, используя Вестерн-блоттинг. На дорожке 1 показан надосадок культуры клеток 293F, в которые не были введены гены (негативный контроль), и на дорожке 2 показан надосадок культуры клеток 293F, в которые были введены вышеуказанные векторы экспрессии. Белки тяжелой цепи и легкой цепи антитела HuK5-70 выявляли с использованием меченого биотином антитела против $F(ab')^2$ IgG человека.

Фигура 50(B). Векторы экспрессии pFUSE-CHlg-HuT6-16-1 и pFUSE2-CLlg-HuT6-16 (дорожка 3) и векторы экспрессии pFUSE-CHlg-HuT6-16-2 и pFUSE2-CLlg-HuT6-16 (дорожка 4) вводили в клетки 293F в таких сочетаниях. Затем анализировали экспрессию антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2, используя Вестерн-блоттинг. Белки тяжелой цепи антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 выявляли с использованием меченого биотином антитела против Fc IgG человека, и белки легкой цепи антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 выявляли с использованием меченого биотином антитела против $F(ab')^2$ IgG человека.

На фигуре 51 показаны результаты, полученные при окрашивании очищенного антитела HuK5-70, антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 красителем Кумасси.

Очищенное антитело HuK5-70 (дорожка 1), антитело HuT6-16-1 (дорожка 2) и антитело HuT6-16-2 (дорожка 3) загружали в количестве 1 мкг каждого на SDS-ПААГ, и затем красили Кумасси.

На фигуре 52 показаны результаты, полученные при анализе антигенсвязывающей способности антитела HuK5-70, антитела HuT6-

16-1 и антитела NuT6-16-2 с использованием проточного цитометра.

Реактивность каждого антитела, показанного на фигуре, по отношению к клеткам HEK293-hTROP-2 (фигура 52A) и клеткам PK-59 (фигура 52B) анализировали, используя FACS. Второе антитело отдельно использовали в качестве негативного контроля (заштриховано), и реактивность каждого антитела указывали серой линией.

На фигуре 53 показаны результаты, полученные при измерении антигенсвязывающей способности антитела NuK5-70 способом ELISA.

Антигенсвязывающую способность антитела K5-70 и антитела NuK5-70 анализировали согласно способу ELISA с использованием покрытия антигеном. Символ ▲ указывает результаты измерения антитела K5-70, и символ ● указывает результаты измерения антитела NuK5-70.

На фигуре 54 показаны результаты, полученные при измерении антигенсвязывающей способности антитела NuT6-16-1 и антитела NuT6-16-2 способом ELISA.

Антигенсвязывающую способность антитела T6-16, антитела NuT6-16-1 и NuT6-16-2 анализировали согласно способу ELISA с использованием покрытия антигеном. Символом ▲ показаны результаты измерения антитела T6-16, символом ● показаны результаты измерения антитела NuT6-16-1, и символом ■ показаны результаты измерения антитела NuT6-16-2.

На фигуре 55 показана противоопухолевая активность гуманизированного анти-hTROP-2-антитела (антитело NuK5-70) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480.

На фигуре 55A показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: PBS) и в группе введения антитела NuK5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 55B показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 39-ый день (день 39)

(последний день эксперимента) в тесте, показанном на фигуре 55А. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 56 показана зависимость от дозы противоопухолевая активность гуманизированного анти-hTROP-2-антитела (HuK5-70) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480.

На фигуре 56А показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: PBS) и в группах введения антитела HuK5-70 (○: 1 мг/кг массы тела, Δ: 5 мг/кг массы тела, □: 10 мг/кг массы тела) (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 56В показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 48-ой день (день 48) (последний день эксперимента) после трансплантации злокачественных клеток в тесте, показанном на фигуре 56А. ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 57 показана зависимость от дозы противоопухолевая активность гуманизированного анти-hTROP-2-антитела (HuT6-16-2) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480.

На фигуре 57А показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: PBS) и в группах введения антитела HuT6-16-2 (○: 1 мг/кг массы тела, Δ: 5 мг/кг массы тела, □: 10 мг/кг массы тела) (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. ** $P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 57В показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 48-ой день (день 48) (последний день эксперимента) после трансплантации злокачественных клеток в тесте, показанном на фигуре 57А. * $P < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 58 показана противоопухолевая активность анти-hTROP-2-антител мыши (K5-70 и T6-16) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток злокачественной

опухоли яичника человека SK-OV-3.

На фигуре 58А показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: PBS), в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) и в группе введения антитела T6-16 (10 мг/кг массы тела) (Δ) (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. *P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 58В показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 56-ой день (день 56) (последний день эксперимента) после трансплантации злокачественных клеток в тесте, показанном на фигуре 58А. *P<0,05 (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 59 показана противоопухолевая активность мышинных анти-hTROP-2-антител (K5-70 и T6-16) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MDA-MB-468.

На фигуре 59А показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: PBS), в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) и в группе введения антитела T6-16 (10 мг/кг массы тела) (Δ) (среднее значение ± стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 59В показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 54-ый день (день 54) (последний день эксперимента) после трансплантации злокачественных клеток в тесте, показанном на фигуре 59А. *P<0,05, **P<0,01 (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 60 показана противоопухолевая активность мышинных анти-hTROP-2-антител (K5-70 и T6-16) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3.

На фигуре 60А показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: PBS), в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) и в группе введения антитела T6-16 (10 мг/кг массы тела) (Δ) (среднее значение ± стандартное

отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. $*P<0,05$, $**P<0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 60B показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 41-ый день (день 41) (последний день эксперимента) после трансплантации злокачественных клеток в тесте, показанном на фигуре 60A. $*P<0,05$, $**P<0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 61 показана противоопухолевая активность мышинового анти-hTROP-2-антитела K5-70 в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием клеток злокачественной опухоли желчных протоков человека TFK-1.

На фигуре 61A показан временной ход образования опухолей в контрольной группе (●: PBS) и в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) (○) (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Стрелка показывает период введения антитела. $**P<0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 61B показана нанесенная на график масса опухолей для каждой мыши во временной точке 31-ый день (день 31) (последний день эксперимента) после трансплантации злокачественных клеток в тесте, показанном на фигуре 61A. $**P<0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 62 показаны результаты, полученные при анализе активности связывания антител HuK5-70 и HuT6-16-2 согласно способу ELISA с использованием покрывания антигеном с низкой плотностью. 96-луночный планшет покрывали 0,1 мкг/мл рекомбинантного белка hTACSTD2-Fc-His, и затем тестируемыми антителами (антитела K5-70, HuK5-70, T6-16 и HuT6-16-2), которые были получены в концентрациях от 20 мкг/мл до серий двукратных разведений, давали возможность взаимодействовать с белком. На фигуре 62(A) в качестве тестируемых антител использовали антитела K5-70 (▲) и HuK5-70 (●), и на фигуре 62(B) в качестве тестируемых антител использовали антитела T6-16 (▲) и HuT6-16-2 (●).

На фигуре 63 показаны результаты, полученные при анализе активности связывания hTROP-2 с антителами K5-70 и HuK5-70 в

ELISA. 96-луночный планшет покрывали антителами K5-70 и HuK5-70 через антитело против IgG мыши (специфичного к γ -цепи) и антитела против IgG1 человека (специфичного к Fc γ), и затем таким антителам давали возможность взаимодействовать с белками hTROP-2-EC-His, которые были получены в концентрациях от 5 мкг/мл до серии двукратных разведений. Связывание такого белка hTROP-2-EC-His выявляли, используя антитело против His-метки.

(▲) антитело K5-70 и (●) антитело HuK5-70.

На фигуре 64 показана нуклеотидная последовательность (верхний ряд; SEQ ID NO:99) и аминокислотная последовательность (нижний ряд; SEQ ID NO:35) гена K5-70 VH, который был получен синтезом гена. Что касается такой нуклеотидной последовательности, то сайт EcoRI (GAA TTC) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу, и сайт NheI (GCT AGC) добавляли к 3'-концу. Аминокислотная последовательность показана однобуквенным кодом. Сигнальный пептид с N-концевой стороны показан курсивом. Подчеркнутый двумя чертами глутамин (Q) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида. Последовательности CDR (подчеркнуты; *IYWIN*, *NIYPSDSYTNYNQKFKD* и *TSMADY*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VH клона K5-70 показаны в SEQ ID NO:36-38, соответственно.

На фигуре 65 показана нуклеотидная последовательность (верхний ряд; SEQ ID NO:100) и аминокислотная последовательность (нижний ряд; SEQ ID NO:40) гена K5-70 VL, который был получен синтезом гена. Что касается такой нуклеотидной последовательности, то сайт AgeI (ACC GGT) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу, и сайт BsiWI (CGT ACG) добавляли к 3'-концу. Аминокислотная последовательность показана однобуквенным кодом. Сигнальный пептид с N-концевой стороны показан курсивом. Подчеркнутая двумя чертами аспарагиновая кислота (D) соответствует N-концевому аминокислотному остатку зрелого пептида.

Последовательности CDR (подчеркнуты; *RASQSIGTSIH*, *YASESIS* и *QQSNSWPFT*) определяли согласно определениям Кабата с соавторами (как описано выше, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Аминокислотные последовательности CDR 1-3 VL клона K5-70 показаны в SEQ ID NO:41-43, соответственно.

На фигуре 66 показана активность связывания антител ChK5-70, HuK5-70, HuVH/MuVL (в котором VL антитела HuK5-70 заменена VL антитела K5-70) и MuVH/HuVL (в котором VH антитела HuK5-70 заменена VH антитела K5-70) с hTROP-2. 96-луночный планшет покрывали 0,1 мкг/мл рекомбинантного белка hTACSTD2-Fc-His. Надосадов культуры клеток, в которых тестируемые антитела (антитела ChK5-70, HuK5-70, HuVH/MuVL и MuVH/HuVL) были временно экспрессированы, разбавляли, получая концентрации антител 1, 0,1, 0,01 и 0,001 мкг/мл. Разбавленным таким образом тестируемым антителам давали возможность взаимодействовать с антигеном. (▲) антитело ChK5-70, (Δ) антитело MuVH/HuVL, (○) антитело HuVH/MuVL и (●) антитело HuK5-70.

На фигуре 67 показаны аминокислотные последовательности VH HuK5-70 и мутанты с заменами аминокислот. Аминокислоты показаны однобуквенным кодом. Аминокислота в каждом мутанте с аминокислотной заменой, которая остается такой же, как аминокислота в VH HuK5-70, указана символом «-», и только аминокислоты в случае замены показаны однобуквенным кодом. Число над последовательностью показывает номер аминокислоты (Kabat с соавторами, 1991).

На фигуре 68 показана активность связывания антител ChK5-70, HuK5-70, HuK5-70 VH A40R (мутанта, в котором аланин в положении 40 VH антитела HuK5-70 заменен аргинином) и HuK5-70 VH R44G (мутанта, в котором аргинин в положении 44 VH антитела HuK5-70 заменен глицином) с hTROP-2. 96-луночный планшет покрывали 0,1 мкг/мл рекомбинантного белка hTACSTD2-Fc-His. Надосадов культуры клеток, в которые тестируемые антитела (антитела ChK5-70, HuK5-70, HuK5-70 VH A40R и HuK5-70 VH R44G) были временно экспрессированы, разбавляли, получая концентрации от 0,5 мкг/мл до серии двукратных разведений (шесть образцов).

Разбавленным таким образом тестируемым антителам давали возможность взаимодействовать с антигеном. (▲) антитело ChK5-70, (Δ) антитело HuK5-70 VH R44G, (○) антитело HuK5-70 VH A40R и (●) антитело HuK5-70.

На фигуре 69 показана нуклеотидная последовательность (верхний ряд) и аминокислотная последовательность (нижний ряд) гена HuK5-70 VH R44G, который получали синтезом генов. Что касается такой нуклеотидной последовательности, то сайт EcoRI (GAA TTC) и последовательность Козака (ACC ACC) добавляли к 5'-концу, и сайт NheI (GCT AGC) добавляли к 3'-концу. Аминокислотная последовательность показана однобуквенным кодом. Сигнальный пептид с N-концевой стороны показан курсивом. Аминокислота (Q: глутамин) на N-концевой стороне зрелой VH подчеркнута двумя чертами, и последовательность CDR (Kabat с соавторами, 1991) подчеркнута.

На фигуре 70 показан SDS-ПААГ-анализ, осуществленный для очищенного антитела HuK5-70-2. Антитело HuK5-70-2 (1 мкг) загружали на 11% SDS-ПААГ-гель в восстанавливающих условиях. Дорожка 1: маркер молекулярной массы (Precision Plus Dual Standard (BIO-RAD)), дорожка 2: антитело HuK5-70-2. Числовое значение на фигуре слева указывает молекулярную массу.

На фигуре 71 показана активность связывания антител K5-70, HuK5-70 и HuK5-70-2 с hTROP-2. 96-луночный планшет покрывали 0,1 мкг/мл рекомбинантного белка hTACSTD2-Fc-His. Очищенные тестируемые антитела (антитела K5-70, HuK5-70 и HuK5-70-2) разбавляли, получая концентрации от 1 мкг/мл до серии двукратных разведений (десять образцов). Разбавленным таким образом тестируемым антителам давали возможность взаимодействовать с антигеном. (■) антитело K5-70, (Δ) антитело HuK5-70-2 и (●) антитело HuK5-70.

На фигуре 72A показана ADCC-активность гуманизированных анти-hTROP-2-антител (незаштрихованная колонка: HuK5-70, и заштрихованная колонка: HuT6-16-2). Более конкретно, антитело HuK5-70 и антитело HuT6-16-2 (оба в концентрациях 0, 0,1, 0,3, 1, 3 и 10 мкг/мл) и моноциты периферической крови здорового

человека добавляли к линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480 и затем культивировали их в течение 6 часов. Затем измеряли активность LDH, высвобождаемой в надосадов культуры, так чтобы можно было измерить ADCC-активность (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($N=3$), эффектор/мишень (Е/Т) = 40). Концентрация антитела, равная 0, указывает, что антитело не добавляли. $*P<0,05$, $**P<0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 72В показана ADCC-активность гуманизированных анти-hTROP-2-антител (незаштрихованная колонка: HuK5-70, серая колонка: HuK5-70-2, и заштрихованная колонка: HuT6-16-2). Более конкретно, антитело HuK5-70, антитело HuK5-70-2 и антитело HuT6-16-2 (все в концентрациях 0, 0,3, 1, 3, 10 и 30 мкг/мл) и моноциты периферической крови здорового человека добавляли к линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека (PK-59), и затем их культивировали в течение 6 часов. Затем измеряли активность LDH, высвобождаемой в надосадов культуры, для того, чтобы можно было измерить ADCC-активность (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($N=3$), эффектор/мишень (Е/Т) = 40). Концентрация антитела, равная 0, указывает, что антитело не добавляли. $**P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

На фигуре 72С показана ADCC-активность гуманизированных анти-hTROP-2-антител (незаштрихованная колонка: HuK5-70, серая колонка: HuK5-70-2, и заштрихованная колонка: HuT6-16-2). Более конкретно, антитело HuK5-70, антитело HuK5-70-2 и антитело HuT6-16-2 (все в концентрациях 0, 0,3, 1, 3, 10 и 30 мкг/мл) и моноциты периферической крови здорового человека добавляли к линии клеток злокачественной опухоли простаты человека (РС-3) и затем их культивировали в течение 6 часов. Затем измеряли активность LDH, высвобождаемой в надосадов культуры для того, чтобы можно было измерить ADCC-активность (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($N=3$), эффектор/мишень (Е/Т) = 40). Концентрация антитела, равная 0, указывает, что антитело не добавляли. $**P < 0,01$ (t-критерий Стьюдента).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее настоящее изобретение будет описано подробно. Следующее описание не предназначено для ограничения объема настоящего изобретения. Помимо следующих далее примеров настоящее изобретение может быть модифицировано и может быть осуществлено в соответствующих случаях в рамках, которые не порочат настоящее изобретение.

Настоящее описание включает содержание в полном объеме, раскрытое в описании предварительной заявки на выдачу патента США № 61/562672 (поданной 22 ноября 2011), которая является приоритетным документом для настоящей заявки.

Кроме того, все публикации, цитированные в настоящем описании, которые включают документы известного уровня техники и патентные документы, такие как выложенные публикации заявок и публикации патентов, включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

1. Сущность настоящего изобретения

Как указано выше, TROP-2 человека (hTROP-2) является мембранным белком типа 1 с одним трансмембранным доменом, имеющим полную длину, составляющую 323 аминокислотных остатка. Было известно, что ген hTROP-2 и его генный продукт экспрессируются в разных типах злокачественных клеток.

Как указано выше, требовалась разработка анти-hTROP-2-антитела (моноклонального анти-hTROP-2-антитела) или тому подобного, обладающего противоопухолевой активностью *in vivo*. При таких обстоятельствах автор настоящего изобретения осуществил скрининг чрезвычайно большого количества клонов, и в результате автор изобретения успешно получил клон, обладающий высокой противоопухолевой активностью *in vivo*. В частности, настоящее изобретение относится к моноклональному антителу, которое специфично распознает внеклеточную область hTROP-2 *in vivo*, и в частности, моноклональному антителу, имеющему высокую аффинность пикомолярного (пМ) порядка. Антитело согласно настоящему изобретению чрезвычайно полезно, так как оно является моноклональным анти-hTROP-2-антителом (в частности, гуманизированным антителом), которое проявляет значимую

ингибирующую рост опухолей активность в более низкой дозе, чем существующее анти-hTROP-2-антитело (например, в дозе 1/20), при его введении отдельно в виде «голового» антитела, и которое также проявляет значимую ингибирующую рост опухолей активность в моделях лечения мышей, несущих опухоли, в которых использованы различные типы злокачественных клеток человека.

2. Получение анти-hTROP-2-антитела

(1) Получение антигена

Информация, имеющая отношение к аминокислотной последовательности (SEQ ID NO:2) hTROP-2, раскрыта под номером доступа NP_002344, например, на веб-сайте NCBI (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Информация, имеющая отношение к нуклеотидной последовательности (SEQ ID NO:1), кодирующей аминокислотную последовательность hTROP-2, раскрыта под номером доступа NM_002353 на том же веб-сайте, который указан выше.

Можно использовать антиген, полипептид или пептид (который также просто называют пептидом), содержащий по меньшей мере часть (полную или часть) аминокислотной последовательности hTROP-2, и предпочтительно пептид, содержащий по меньшей мере часть (полную или часть) аминокислотной последовательности внеклеточной области hTROP-2. Внеклеточная область (включая сигнальный пептид) hTROP-2 представляет собой область, содержащую аминокислоты в положениях 1-274 аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:2 (сигнальный пептид: аминокислоты в положениях 1-26). В настоящем описании в отношении пептида, используемого в качестве антигена, приведенное выше выражение «по меньшей мере часть аминокислотной последовательности», специально не ограничена длиной. Например, предпочтительными являются область, содержащая аминокислоты в положениях 1-145 из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:2, область, содержащая аминокислоты в положениях 146-274 из той же аминокислотной последовательности, которая описана выше.

Пептид, используемый в качестве антигена может быть получен либо химическим синтезом, либо синтезом согласно способу генетической инженерии с использованием *Escherichia*

coli или тому подобного. Можно применять способ, хорошо известный специалистам в данной области.

В том случае, когда пептид получают химическим синтезом, он может быть синтезирован хорошо известным способом синтеза пептидов. Кроме того, можно применять либо способ твердофазного синтеза, либо способ синтеза в жидкой фазе для синтеза пептидов. Также можно использовать коммерчески доступный синтезатор пептидов (например, PSSM-8 производства Shimadzu Corporation, и др.).

В том случае, когда пептид синтезируют способом генетической инженерии, сначала конструируют и синтезируют ДНК, кодирующую пептид. Конструирование и синтез такой ДНК может быть осуществлен согласно способу ПЦР с использованием вектора, содержащего полноразмерный ген hTROP-2 или тому подобный в качестве матрицы, а также с использованием праймеров, сконструированных так, чтобы можно было синтезировать требуемую область ДНК. Затем ДНК лигируют в подходящий вектор, чтобы получить рекомбинантный вектор, используемый для экспрессии белка, и затем такой рекомбинантный вектор вводят в хозяина так, чтобы представляющий интерес ген мог экспрессироваться в хозяине, получая таким образом трансформант (Sambrook J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

В качестве вектора используют фаг или плазмиду, способную автономно реплицироваться в микроорганизме-хозяине. Кроме того, также можно использовать вирус животных или вирус насекомых. Чтобы получить рекомбинантный вектор, очищенную ДНК можно расщепить подходящими ферментами рестрикции, и затем расщепленную таким образом часть ДНК можно встроить в сайт такого фермента рестрикции или тому подобного в подходящей векторной ДНК, так, чтобы лигировать ее с вектором. Тип хозяина, используемого для трансформации особым образом не ограничен, при условии, что он способен экспрессировать представляющий интерес ген. Примеры такого хозяина включают бактерии (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и т.д.), дрожжи, клетки животных (клетки COS, клетки CHO и т.д.), клетки

насекомых и насекомых. В качестве такого хозяина можно использовать млекопитающее, такое как коза. Способ введения рекомбинантного вектора в хозяина общеизвестен.

Описанный выше трансформант культивируют, и затем пептид, используемый в качестве антигена, собирают из культуры. Термин «культура» используют в настоящем описании для обозначения как (а) надосадка культуры, так и (b) культивируемых клеток, массы культивируемых клеток или продукты их разрушения.

После окончания культивирования, когда представляющий интерес пептид продуцируется в клеточной массе или в клетках, пептид экстрагируют разрушением клеточной массы или клеток. С другой стороны, когда представляющий интерес пептид продуцируется вне клеточной массы или вне клеток, непосредственно используют культуральный раствор, или клеточную массу или клетки удаляют из культурального раствора центрифугированием или тому подобным способом. Затем представляющий интерес пептид можно выделить и очистить, используя биохимические способы, обычно используемые для выделения и очистки пептидов, такие как преципитация сульфатом аммония, гель-фильтрация, ионообменная хроматография и аффинная хроматография, или в результате объединения указанных выше биохимических способов.

В настоящем изобретении пептид, используемый в качестве антигена, также можно получить в результате трансляции *in vitro* в случае использования бесклеточной системы синтеза. В данном случае могут быть применимы два способа, а именно, способ на основе использования РНК в качестве матрицы и способ с использованием ДНК в качестве матрицы (транскрипция/трансляция). В качестве такой бесклеточной системы синтеза можно использовать коммерчески доступную систему, такую как система Expressway™ (Invitrogen), система PURESYSTEM (зарегистрированное торговое название; Post Genome Institute) или система TNT (зарегистрированное торговое название; Promega).

Полученный таким образом пептид может связываться с подходящим белком-носителем, таким как бычий сывороточный

альбумин (BSA), гемоцианин морского блюдечка «замочная скважина» (KLN), тиреоглобулин человека или γ -глобулин цыплят.

Кроме того, антиген может представлять собой пептид, состоящий из аминокислотной последовательности, содержащей делецию, замену или добавление одной или нескольких аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью hTROP-2 (SEQ ID NO:2) или ее неполной последовательностью, которая описана выше. Можно использовать, например, пептид, состоящий из аминокислотной последовательности, в которой одна или несколько (предпочтительно, одна или несколько (например, 1-10 и более предпочтительно, 1-5)) аминокислот deletированы, или одна или несколько (предпочтительно, одна или несколько (например, 1-10 и, более предпочтительно, 1-5)) аминокислот заменены другими аминокислотами, или одна или несколько (предпочтительно, одна или несколько (например, 1-10 и, более предпочтительно, 1-5)) других аминокислот добавлена по сравнению с аминокислотной последовательностью hTROP-2 или ее неполной последовательностью.

В настоящем изобретении ген, который необходимо ввести в клетку, или тому подобное, представляет собой ген, кодирующий белок hTROP-2 или его неполный фрагмент, или его мутантный белок или его фрагмент. В качестве такого гена можно использовать, например, ген, имеющий нуклеотидную последовательность, показанную в SEQ ID NO:1, или ее неполную последовательность.

Кроме того, в качестве гена, который необходимо ввести в клетку или тому подобное, также можно использовать нуклеотидную последовательность, гибридизующуюся в жестких условиях с последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO:1, и кодирующей белок, обладающий активностью hTROP-2, или ее неполной последовательности.

Выражение «жесткие условия», используемое в настоящем описании, означает условия промывки после завершения гибридизации. В качестве таких жестких условий используют

концентрацию соли (натрия) в буфере от 10 до 500 мМ и температуру от 42°C до 72°C, и предпочтительно указанное выше условие по концентрации соли составляет от 50 до 300 мМ, и температура составляет от 55°C до 68°C.

Мутация может быть введена в ген известным способом, таким как способ Кункеля или способ образования дуплекса с пробелами, с использованием, например, набора для введения мутаций, который основан на использовании сайт-специфичного мутагенеза, такого как система для сайт-специфичного мутагенеза GeneTailor™ (производства Invitrogen) или система для сайт-специфичного мутагенеза TaKaRa (Mutan-K, Mutan-Super Express Km, и т.д.; производства Takara Bio Inc.).

(2) Получение поликлонального антитела

Полученный антиген вводят млекопитающему для иммунизации. Тип такого млекопитающего особым образом не ограничен. Например, можно использовать крысу, мышь и кролика, и среди прочих предпочтительной является мышь.

Доза антигена на животное может быть определена соответствующим образом в зависимости от присутствия или отсутствия адъюванта. Примеры такого адъюванта включают полный адъювант Фрейнда (FCA), неполный адъювант Фрейнда (FIA) и адъювант на основе гидроксида алюминия. Иммунизация может быть осуществлена, главным образом, посредством инъекции антигена в вену, подушечку лапы, подкожно или в брюшную полость животного. Кроме того, интервал иммунизации особым образом не ограничен, и иммунизацию осуществляют с интервалами от нескольких дней до нескольких недель, предпочтительно, с интервалами в 1 неделю от 1 до 10 раз и, предпочтительно, 2 или 3 раза. От трех до семи дней после последнего дня иммунизации измеряют титр антител в ферментном иммуноанализе (ELISA или EIA), радиоиммуноанализе (РИА) или другими способами. В день, когда получают требуемый титр антител, может быть собрана кровь для получения антисыворотки. В описанном выше способе сбора антител в том случае, если необходимо очистить антитело, такое антитело можно очистить, выбрав подходящий способ из известных способов, таких

как преципитация сульфатом аммония, ионообменная хроматография, хроматография на основе гель-фильтрации и аффинная хроматография, или в подходящем случае сочетание указанных выше способов. Затем измеряют реактивность поликлонального антитела в сыворотке способом ELISA или тому подобным.

(3) Получение моноклонального антитела

(3-1) Сбор продуцирующих антитела клеток

Анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению не ограничено, но, предпочтительно, является моноклональным антителом.

Приготовленный антиген вводят млекопитающему, такому как крыса, мышь или кролик, для иммунизации. Доза антигена на животное может быть определена в соответствующем случае в зависимости от присутствия или отсутствия адъюванта. В настоящем изобретении можно использовать такие же адъюванты, которые описаны выше. Также в изобретении можно применять такие же способы иммунизации, которые описаны выше. Через один-шестьдесят дней и предпочтительно через один-четырнадцать дней после дня последней иммунизации собирают клетки, продуцирующие антитела. Примеры таких продуцирующих антитела клеток включают клетки селезенки, клетки лимфатических узлов и клетки периферической крови. Из них предпочтительными являются клетки лимфатических узлов и клетки селезенки.

(3-2) Слияние клеток

Чтобы получить гибридомы (линию клеток, продуцирующих антитела), осуществляли слияние продуцирующих антитела клеток с клетками миеломы. В качестве клеток миеломы, необходимых для слияния с продуцирующими антитела клетками, можно использовать общедоступные стабильные клетки животных, таких как мыши. Линией клеток, используемой в изобретении, предпочтительно, является линия клеток, которая обладает избирательностью к лекарственному средству, не может жить в неслитом состоянии в селективной среде НАТ (содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин) и может выживать только в состоянии слияния с клетками, продуцирующими антитела.

Примеры клеток миеломы включают линии клеток миеломы

мышей, такие как P3-X63-Ag8.653, P3-X63-Ag8(X63), P3-X63-Ag8.U1(P3U1), P3/NS I/1-Ag4-1(NS1) и Sp2/0-Ag14(Sp2/0). Клетки миеломы могут быть выбраны соответствующим образом с учетом совместимости с клетками, продуцирующими антитела.

Затем клетки миеломы сливают с клетками, продуцирующими антитела. Для такого слияния клеток продуцирующие антитела клетки (от 1×10^6 до 1×10^7 клеток/мл) смешивают с клетками миеломы (от 2×10^5 до 2×10^6 клеток/мл) в среде для клеток животных, такой как среда DMEM или RPMI-1640, не содержащая сыворотки. Соотношение между продуцирующими антитела клетками и клетками миеломы (продуцирующие антитела клетки:клетки миеломы) не ограничено. В общем, соотношение клеток, предпочтительно, составляет от 1:1 до 10:1, и более предпочтительно 3:1. Затем осуществляют реакцию слияния в присутствии стимулятора слияния клеток. В качестве такого стимулятора слияния клеток можно использовать полиэтиленгликоль, имеющий среднюю молекулярную массу от 1000 до 6000 Дальтон (Д), или тому подобное. Кроме того, также можно сливать продуцирующие антитела клетки с клетками миеломы, используя коммерчески доступное устройство для слияния клеток, в котором применяют электрическую стимуляцию (например, электропорацию).

(3-3) Селекция и клонирование гибридом

Представляющие интерес гибридомы выбирают из клеток после обработки для слияния клеток. В качестве способа отбора гибридом суспензию клеток соответствующим образом разбавляют, например, средой RPMI-1640, содержащей фетальную сыворотку теленка, и затем разбавленный раствор разносят в планшете для микротитрования. Затем в каждую лунку добавляют селективную среду. При замене соответствующим образом селективной среды свежей селективной средой осуществляют культивирование. В результате примерно через 14 дней после начала культивирования на селективной среде могут быть получены клетки, растущие на селективной среде, в качестве гибридом.

Затем осуществляют скрининг, чтобы исследовать присутствует ли или нет антитело, взаимодействующее с hTROP-2,

в надосадке культуры выросших гибридом. Скрининг гибридом может быть осуществлен согласно обычному способу, и таким образом, способ скрининга особым образом не ограничен. Например, отбирают аликвоту из надосадка культуры растущих гибридом, находящихся в лунке, и затем осуществляют скрининг с использованием ELISA, EIA, РИА или тому подобного.

Клонирование слитых клеток может быть осуществлено способом лимитирующего разведения или тому подобным. Антитело, проявляющее высокую реакционную способность по отношению к hTROP-2, определяют с помощью проточной цитометрии или тому подобного способа, и затем отбирают гибридому, продуцирующую такое антитело. Из отобранной гибридомы получают клон.

(3-4) Сбор моноклонального антитела

В качестве способа культивирования созданной гибридомы и затем сбора моноклонального антитела из полученной культуры можно адаптировать обычный способ культивирования клеток, способ образования асцитов или тому подобный. Термин «культура», используемый в настоящем описании, означает обеспечение возможности роста гибридом в культуральных чашках или культуральном флаконе или обеспечение возможности роста гибридома в брюшной полости животного, как описано ниже.

В случае применения способа на основе культивирования клеток гибридомы культивируют в среде для клеток животных, такой как среда RPMI-1640, такой как содержащая 10% фетальной сыворотки теленка среда RPMI-1640, среда MEM или бессывороточная среда, в обычных условиях культивирования (например, 37°C, CO₂-концентрация 5%) в течение 7-14 дней, и затем антитело может быть получено из надосадка культуры.

В случае способа на основе образования асцитов примерно 1×10^7 гибридом вводят в брюшную полость животного того же вида, что и млекопитающее, из которого получают клетки миеломы, так чтобы обеспечить возможность для пролиферации больших количеств гибридом. Затем, предпочтительно, спустя 2-3 недели, собирают асциты.

В описанных способах сбора антител в том случае, если

необходимо очистить антитело, антитело можно очистить, выбрав соответствующим образом подходящий способ из известных способов, таких как преципитация сульфатом аммония, ионообменная хроматография, гель-фильтрация и аффинная хроматография, или сочетанием указанных выше способов.

(3-5) Выбор клона, обладающего противоопухолевой активностью

Анти-hTROP-2-антителом согласно настоящему изобретению является антитело, обладающее противоопухолевой активностью *in vivo*.

Термин «противоопухолевая активность», используют в настоящем описании для обозначения средней активности, приводящей к гибели опухолевых клеток (злокачественных клеток), или активности в ингибировании опухолевого роста. Предпочтительные примеры такой противоопухолевой активности включают активность в ингибировании роста злокачественных клеток и активность в ингибировании ангиогенеза опухолей. Тип опухоли человека (опухолевых клеток), по отношению к которой антитело согласно настоящему изобретению способно проявлять противоопухолевую активность, включает разные типы известных опухолей человека, в которых экспрессия hTROP-2 была подтверждена. Тип такой опухоли человека особым образом не ограничен. Предпочтительными являются, например, один или два или больше типов, выбранных из разных опухолей человека, таких как рак поджелудочной железы человека, рак простаты человека, рак прямой и ободочной кишки человека, рак молочной железы человека, рак яичника человека, рак легкого человека и рак желчных протоков человека; и более предпочтительны один или два или больше типов, выбранных из рака поджелудочной железы человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака яичника человека и рака легкого человека. Еще более предпочтительны рак поджелудочной железы человека и/или рак прямой и ободочной кишки человека.

Кроме того, описанная выше опухоль может представлять собой рецидивирующую злокачественную опухоль или

метастатическую злокачественную опухоль. Антитело согласно настоящему изобретению также способно проявлять превосходную противоопухолевую активность на таких типах опухолей.

Наличие противоопухолевой активности *in vivo* можно подтвердить, например, используя мышь, несущую опухоль (модель ксенотрансплантатов у мышей), которой подкожно были трансплантированы требуемые опухолевые клетки, и затем вводя мыши антитело, которое получено, как описано выше. В данном случае антитело можно вводить сразу после трансплантации опухолевых клеток (модели профилактики). Альтернативно его можно вводить после подтверждения того, что трансплантированная опухоль достигла предварительно определяемого объема (модели лечения). Способ введения не ограничен. Например, антитело можно вводить один раз каждые три дня, каждую неделю, каждую десять дней или каждые две недели, или посредством однократного введения (только один раз) в дозе от 5 до 20 мг/кг массы тела с использованием внутрибрюшинного введения или тому подобного. В случае моделей профилактики присутствие или отсутствие противоопухолевой активности и ее уровень можно оценить на основе частоты образования опухолей и объема опухолей. В случае моделей лечения присутствие или отсутствие противоопухолевой активности и ее уровень можно оценить на основе объема опухолей.

В настоящем изобретении предпочтительным примером анти-hTROP-2-антитела, обладающего противоопухолевой активностью *in vivo*, является антитело, аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи которого показаны в SEQ ID NO:36-38, соответственно, и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи которого показаны в SEQ ID NO:41-43, соответственно. Предпочтительным примером V-области Н-цепи является V-область Н-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:35. Предпочтительным примером V-области L-цепи является V-область L-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:40.

В качестве другого варианта анти-hTROP-2-антитела согласно

настоящему изобретению предпочтительным примером является антитело, аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи которого показаны в SEQ ID NO:46-48, соответственно, и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи которого показаны в SEQ ID NO:51-53, соответственно. Предпочтительным примером V-области Н-цепи является V-область Н-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:45. Предпочтительным примером V-области L-цепи является V-область L-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:50.

Подобным образом в качестве следующего варианта анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению предпочтительным примером является антитело, аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи которого показаны в SEQ ID NO:56-58, соответственно, и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи которого показаны в SEQ ID NO:61-63, соответственно. Предпочтительным примером V-области Н-цепи является V-область Н-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:55. Предпочтительным примером V-области L-цепи является V-область L-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:60.

Подобным образом, в качестве следующего варианта анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению предпочтительным примером является антитело, аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи которого показаны в SEQ ID NO:66-68, соответственно, и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи которого показаны в SEQ ID NO:71-73, соответственно. Предпочтительным примером V-области Н-цепи является V-область Н-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:65. Предпочтительным примером V-области L-цепи является V-область L-цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:70.

Более конкретно, в настоящем изобретении предпочтительные примеры анти-hTROP-2-антитела, обладающего противоопухолевой

активностью *in vivo* включают: моноклональное анти-hTROP-2-антитело (название клона: K5-70), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11251; моноклональное анти-hTROP-2-антитело (название клона: K5-107), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11252; моноклональное анти-hTROP-2-антитело (название клона: K5-116-2-1), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11253; моноклональное анти-hTROP-2-антитело (название клона: T6-16), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11346; и моноклональное анти-hTROP-2-антитело (название клона: T5-86), продуцируемое гибридомой с номером доступа FERM BP-11254.

В данном случае гибридома с номером доступа FERM BP-11251 была названа «гибридомой мышь-мышь K5-70» и была депонирована 12 мая 2010 года; гибридома с номером доступа FERM BP-11252 была названа «гибридомой мышь-мышь K5-107» и была депонирована 12 мая 2010 года; гибридома с номером доступа FERM BP-11253 была названа «гибридомой мышь-мышь K5-116-2-1» и была депонирована 12 мая 2010 года; гибридома с номером доступа FERM BP-11346 была названа «гибридомой мышь-мышь T6-16» и была депонирована 1 марта 2011 года; и гибридома с номером доступа FERM BP-11254 была названа «гибридомой мышь-мышь T5-86» и была депонирована 12 мая 2010 года. Все указанные гибридомы депонировали в международном депозитарии патентуемых организмов (IPOD), Национальном институте передовой промышленной науки и технологии, Независимом институте управления Министерства экономики, торговли и промышленности (the AIST, Tsukuba Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Japan, почтовый индекс: 305-8566).

Кроме того, другим предпочтительным примером анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению является анти-hTROP-2-антитело, которое связывается с участком (например, эпитопом), с которым связывается (которое распознает) моноклональное антитело, продуцируемое гибридомой, имеющей номер доступа FERM BP-11251, FERM BP-11252, FERM BP-11253, FERM BP-11346 или FERM BP-11254.

Предпочтительные примеры такого эпитопа будут приведены в

пункте (3-6) ниже.

(3-6) Эпитоп анти-hTROP-2-антитела

Тип эпитопа (антигенной детерминанты) анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению не ограничен, при условии, что он составляет, по меньшей мере часть hTROP-2 в качестве антигена. Например, таким эпитопом, предпочтительно, является по меньшей мере часть области, образованной удалением области, состоящей из аминокислот в положениях 252-260, из аминокислотной последовательности hTROP-2, показанной в SEQ ID NO:2, более предпочтительно, по меньшей мере часть области, состоящей из аминокислот в положениях 1-69, или по меньшей мере часть области, состоящей из аминокислот в положениях 100-274 (за исключением области, состоящей из аминокислот в положении 252-260), и кроме того, предпочтительно, по меньшей мере часть области, состоящей из аминокислот в положениях 27-69, или области, состоящей из аминокислот в положениях 109-206. В частности, предпочтительные примеры описанного выше эпитопа включают область, состоящую из аминокислот в положениях 43-65, область, состоящую из аминокислот в положениях 152-165, область, состоящую из аминокислот в положениях 171-183, область, состоящую из аминокислот в положениях 109-120, область, состоящую из аминокислот в положениях 193-206, область, состоящую из аминокислот в положениях 43-56, и часть, входящую в такую область, в аминокислотной последовательности hTROP-2, показанной в SEQ ID NO:2. Кроме того, особенно предпочтительные примеры включают область, состоящую из аминокислот в положениях 43-65, область, состоящую из аминокислот в положениях 152-165, область, состоящую из аминокислот в положениях 171-183, область, состоящую из аминокислот в положениях 109-120 и часть, составляющую такую область. Анти-hTROP-2-антитело, которое распознает описанные выше области (связывается с описанными выше областями или частями, содержащими такие области), обладает, например, высокой активностью интернализации в опухолевые клетки, чрезвычайно полезно в качестве иммуноконъюгата, который описан далее.

(3-7) Характеристики анти-hTROP-2-антитела

Как описано выше, анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, обладающее высокой противоопухолевой активностью *in vivo* в низкой дозе. В частности, предпочтительно, чтобы данное анти-hTROP-2-антитело проявляло ингибирующую рост опухолей активность, составляющую 50% или больше (предпочтительно, 80% или больше, более предпочтительно, 90% или больше, еще более предпочтительно, 95% или больше, и в частности предпочтительно почти 100% (например, 98% или больше, или 99% или больше)) в дозе (в виде «голового» антитела) 20 мг/кг массы тела или меньше (предпочтительно, 10 мг/кг массы тела или меньше, более предпочтительно, 5 мг/кг массы тела или меньше, и еще более предпочтительно 1 мг/кг массы тела или меньше) в модели на животных, несущих опухоли.

В данном случае ингибирующую рост опухолей активность (%) можно вычислить, например, используя следующую формулу:

Ингибирующая рост опухолей активность (%) = $100 - \left[\frac{\text{объем опухоли или масса опухоли в группе введения антитела}}{\text{объем опухоли или масса опухоли в контрольной группе}} \right] \times 100$

Кроме того, анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению, предпочтительно, обладает противоопухолевой активностью по отношению к двум или большему количеству типов линий опухолевых клеток человека. Тип такой линии опухолевых клеток человека не ограничен. Например, такие линии опухолевых клеток человека представляют собой, по меньшей мере, два типа, выбранных из группы, состоящей из различных типов линий клеток злокачественных опухолей поджелудочной железы человека, линий клеток злокачественных опухолей простаты человека, линий клеток злокачественных опухолей прямой и ободочной кишки человека, линий клеток злокачественных опухолей молочной железы человека, линий клеток злокачественных опухолей яичника, линий клеток злокачественных опухолей легкого человека и линий клеток злокачественных опухолей желчных протоков человека. В частности, предпочтительные примеры таких линий опухолевых клеток человека включают по меньшей мере два типа, выбранных из

группы, состоящей из линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека VxPC-3, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека KP-3L, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека KP-2, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-1, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-45H, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-45P, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека TCC-PAN2, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека SUIT-2, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека CACO-2, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека DLD-1, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека HCT 116, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека JIMT-1, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека HCC1143, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MCF-7, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MDA-MB-468, линии клеток злокачественной опухоли простаты человека DU145, линии клеток злокачественной опухоли простаты человека PC-3, линии клеток злокачественной опухоли яичника человека SK-OV-3, линии клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3 и линии клеток злокачественной опухоли желчных протоков человека TFK-1. Из описанных выше двух или более типов линий опухолевых клеток человека, более предпочтительными являются по меньшей мере два типа, выбранных из группы, состоящей из линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека VxPC-3, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480, линии клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MDA-MB-468 и линии клеток злокачественной опухоли

яичника человека SK-OV-3.

Кроме того, анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению имеет константу диссоциации (значение K_d), составляющую, предпочтительно, $1,0 \times 10^{-10}$ М или меньше, более предпочтительно, $1,0 \times 10^{-11}$ М или меньше и, еще более предпочтительно, $1,0 \times 10^{-12}$ М или меньше. В данном случае способность связывания (аффинность) антитела можно измерить в форме константы диссоциации (значение K_d), константы скорости диссоциации ($K_{\text{дис.}}$ [1/сек]) или константы скорости ассоциации ($K_{\text{асс.}}$ [1/М.сек]), например, с использованием анализа Скотчарда или сенсора резонанса поверхностного плазмона, называемого Biacore. В качестве таких устройств Biacore можно использовать, например, Biacore 3000, Biacore 2000, Biacore X, Biacore J и Biacore Q (все производства Biacore). Предпочтительно, чтобы антитело имело значение константы диссоциации (значение K_d) низкое, насколько это возможно, поскольку оно может иметь высокую способность связывания (аффинность). Значение K_d определяют на основе двух параметров $K_{\text{дис.}}$ и $K_{\text{асс.}}$, и оно может быть выражено формулой: $K_d[\text{М}] = K_{\text{дис.}}/K_{\text{асс.}}$. В качестве способа вычисления значения K_d , предпочтительно, может быть выбран способ, описанный в примерах, которые приведены далее (в частности, в примере 10).

(4) Генетически рекомбинантное антитело и фрагмент антитела

(4-1) Генетически рекомбинантное антитело

В предпочтительном варианте анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению предлагается генетически рекомбинантное антитело. Тип такого генетически рекомбинантного антитела не ограничен. Примеры включают химерное антитело, гуманизированное антитело и антитело человека.

Химерное антитело (то есть, гуманизированное химерное антитело) представляет собой антитело, образованное лигированием (конъюгацией) переменной области полученного от мыши антитела с константной областью полученного от человека антитела (пожалуйста см. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81,

6851-6855, (1984), и т.д.). В случае получения такого химерного антитела лигированное таким образом антитело может быть легко сконструировано способом генетической рекомбинации.

В случае получения гуманизированного антитела определяющую комплементарность область (CDR) трансплантируют из вариабельной области антитела мыши в вариабельную область антитела человека, так чтобы получить реконструированную вариабельную область, в которой каркасная область (FR) получена от человека, а CDR получена от мыши (такой способ называют прививкой CDR (трансплантацией CDR)). Затем гуманизированную реконструированную вариабельную область человека лигируют с константной областью человека. Такой способ получения гуманизированного антитела хорошо известен в данной области (пожалуйста, см. Nature, 321, 522-525 (1986); J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987); Queen C et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033 (1989); Публикацию патента JP (Kohyo) No. 4-502408 A (1992) (патент Японии № 2828340; Queen et al.), и т.д.).

В данном случае тип последовательности CDR, полученной от мыши, которую можно использовать в гуманизированном анти-hTROP-2-антителк согласно настоящему изобретению, особым образом не ограничен. Например, аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO:36-38 или аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO:66-68, предпочтительно используют в качестве CDR 1-3 V-области Н-цепи (VH), соответственно. Аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO:41-43, или аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO:71-73 предпочтительно используют в качестве CDR 1-3 V-области L-цепи (VL), соответственно.

Кроме того, предпочтительные примеры аминокислотной последовательности V-области Н-цепи в гуманизированной реконструированной вариабельной области человека включают: аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:92 (содержащую CDR 1-3, состоящие из аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID NO:36-38;

аминокислотная последовательность, дополнительно содержащая сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO:75); аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:98 (содержащую CDR 1-3, состоящие из аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID NO:36-38; аминокислотная последовательность, дополнительно содержащая сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO:97); аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:94 (содержащую CDR 1-3, состоящие из аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID NO:66-68; аминокислотная последовательность, дополнительно содержащая сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO:79); и аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:95 (содержащую CDR 1-3, состоящие из аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID NO:66-68; аминокислотная последовательность, дополнительно содержащая сигнальный пептид показана в SEQ ID NO:81). В настоящем изобретении указанная выше аминокислотная последовательность V-области Н-цепи, показанная в SEQ ID NO:98, представляет собой модифицированную аминокислотную последовательность, в которой аргинин (R) в положении 44 указанной выше аминокислотной последовательности V-области Н-цепи, показанной в SEQ ID NO:92, заменен глицином (G).

Подобным образом, предпочтительные примеры аминокислотной последовательности V-области L-цепи в гуманизированной реконструированной вариабельной области человека включают: аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:93 (содержащую CDR 1-3, состоящие из аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID NO:41-43; и аминокислотная последовательность, дополнительно содержащая сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO:77); и аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:96 (содержащую CDR 1-3, состоящие из аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID NO:71-73; аминокислотная последовательность, дополнительно содержащая сигнальный пептид, показана в SEQ ID NO:83).

В настоящем изобретении предпочтительные примеры

гуманизированного анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению включают: (i) гуманизированное анти-hTROP-2-антитело, аминокислотная последовательность V-области Н-цепи которого показана в SEQ ID NO:92, и аминокислотная последовательность V-области L-цепи которого показана в SEQ ID NO:93; и (ii) гуманизированное анти-hTROP-2-антитело, аминокислотная последовательность V-области Н-цепи которого показана в SEQ ID NO:98, и аминокислотная последовательность V-области L-цепи которого показана в SEQ ID NO:93. В частности, гуманизированное анти-hTROP-2-антитело, описанное в пункте (ii), указанном выше, аминокислотная последовательность V-области Н-цепи которого показана в SEQ ID NO:98, обладает улучшенной авидностью (то есть гибкостью движения двух антигенсвязывающих плеч) и обладает высокой антигенсвязывающей активностью, и поэтому такое антитело является особенно предпочтительным.

Также другие предпочтительные примеры гуманизированного анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению включают: (iii) гуманизированное анти-hTROP-2-антитело, аминокислотная последовательность V-области Н-цепи которого показана в SEQ ID NO:94, и аминокислотная последовательность V-области L-цепи которого показана в SEQ ID NO:96; и (ii) гуманизированное анти-hTROP-2-антитело, аминокислотная последовательность V-области Н-цепи которого показана в SEQ ID NO:95, и аминокислотная последовательность V-области L-цепи которого показана в SEQ ID NO:96.

В общем, в случае антитела человека (полного антитела человека), его структура, содержащая гипервариабельную область, которая является антигенсвязывающим участком V-области, другие части V-области и константная область, являются такими же как в структуре антитела человека. Однако такой гипервариабельный участок также может быть получен от других животных. Способ получения антитела человека общеизвестен, и разработан способ получения генных последовательностей, которые являются общими у людей, с использованием генетической инженерии. Антитело человека может быть получено, например, способом с

использованием мыши, продуцирующей антитело человека, которая имеет фрагменты хромосом человека, содержащие гены Н-цепи и L-цепи антитела человека (пожалуйста, см. публикации Tomizuka, K. et al., Nature Genetics, (1977) 16, 133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nuc. Acids Res., (1998) 26, 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects, (1999) 10, 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2000) 97, 722-727, и т.д.), или способом получения антитела человека из фагового дисплея, выбранного из библиотеки антител человека (пожалуйста, см. публикации Wormstone, I. M. et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science., (2002) 43 (7), 2301-8; Carmen, S. et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics, (2002) 1 (2), 189-203; Siriwardena, D. et al., Ophthalmology, (2002) 109 (3), 427-431, и т.д.).

В случае указанных выше химерного антитела, гуманизированного антитела и антитела человека связанная N-гликозидной связью сахарная цепь в Fc-области антитела, предпочтительно, представляет собой сахарную цепь, в которой фукоза не связана с N-ацетилглюкозамином на восстанавливающем конце. Конкретным примером является антитело, состоящее из генетически рекомбинантных молекул антител, которое имеет в Fc-области молекул антител цепь сахара, в которой положение 1 фукозы не связано с положением 6 N-ацетилглюкозамина на восстанавливающем конце связанной N-гликозидной связью цепью сахара через α -связь. Такое антитело способно значительно улучшать ADCC-активность. Такое условие (характеристики связанной N-гликозидной связью цепи сахара в Fc-области антитела) также, предпочтительно, для указанного выше поликлонального антитела и моноклонального антитела.

(4-2) Фрагмент антитела

Фрагмент анти-hTROP-2-антитела (частичный фрагмент) согласно настоящему изобретению включен в объем термина «антитело» согласно настоящему изобретению. В данном случае

фрагмент антитела согласно настоящему изобретению обладает активностью связывания с hTROP-2 (а именно, он способен связываться с hTROP-2), а также обладает противоопухолевой активностью *in vivo*, как и в случае анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению.

Фрагмент антитела означает область части поликлонального анти-hTROP-2-антитела или моноклонального анти-hTROP-2-антитела (а именно, фрагмент антитела, полученный из анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению). Примеры такого фрагмента антитела включают пептиды, содержащие по меньшей мере в качестве его части, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv (вариабельный фрагмент антитела), однонитевое антитело (H-цепь, L-цепь, V-область H-цепи и V-область L-цепи и т.д.), scFv, диатело (димер scFv), dsFv (стабилизированную дисульфидом V-область) и определяющую комплементарность область (CDR).

Fab представляет собой фрагмент антитела с молекулярной массой примерно 50000, обладающий антигенсвязывающей активностью, который образован связыванием примерно половины H-цепи с N-концевой стороны с полной L-цепью дисульфидной связью, среди фрагментов, получаемых при обработке молекул антител протеазой папаином. Кроме того, также можно получить такой Fab встраиванием ДНК, кодирующей Fab антитела, в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии, и затем введением вектора в клетку прокариота или эукариота так, чтобы обеспечить возможность для экспрессии в ней ДНК.

F(ab')₂ представляет собой фрагмент антитела с молекулярной массой примерно 100000, обладающий антигенсвязывающей активностью, размер которого немного больше, чем Fab, который связывается с Fab дисульфидной связью в шарнирной области, среди фрагментов, получаемых обработкой молекул антител протеазой пепсином. Кроме того, также можно получить такой F(ab')₂, используя связывание Fab тиоэфирной связью или дисульфидной связью, как описано далее.

Fab' представляет собой фрагмент антитела с молекулярной массой примерно 50000, обладающий антигенсвязывающей активностью, который образуется при расщеплении дисульфидной

связи в шарнирной области указанного выше $F(ab')_2$. Кроме того, также можно получить такой Fab' встраиванием ДНК, кодирующей Fab'-фрагмент антитела в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии, и затем введением вектора в клетку прокариота или эукариота, так чтобы обеспечить в ней возможность экспрессии ДНК.

scFv представляет собой фрагмент антитела, обладающий антигенсвязывающей активностью, который представляет собой полипептид VH-P-VL или VL-P-VH, образованный лигированием одной V-области Н-цепи (VH) с одной V-областью L-цепи (VL) с использованием подходящего пептидного линкера (P). Такой scFv может быть образован посредством получения кДНК, кодирующей VH и VL антитела, конструирования ДНК, кодирующей scFv, встраивания ДНК в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии и затем введением вектора в клетку прокариота или эукариота, так чтобы обеспечить в ней возможность экспрессии ДНК.

Диатело представляет собой фрагмент антитела, образованный димеризацией scFv, который обладает дивалентной антигенсвязывающей активностью. Такие дивалентные антигенсвязывающие активности могут быть идентичными друг другу или они также могут отличаться друг от друга. Такое диатело может быть создано посредством получения кДНК, кодирующей VH и VL антитела, конструирования ДНК, кодирующей scFv, так чтобы длина аминокислотной последовательности P составляла 8 остатков или меньше, встраивания ДНК в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии и затем введения вектора в клетку прокариота или эукариота так, чтобы обеспечить возможность экспрессии в ней ДНК.

dsFv представляет собой фрагмент антитела, образованный связыванием полипептидов, в которых один аминокислотный остаток в каждой VH и VL был заменен остатком цистеина, друг с другом дисульфидной связью между остатками цистеина. Аминокислотный остаток, заменяемый остатками цистеина, может быть выбран на основе оценки трехмерной структуры антитела согласно способу Reiter с соавторами (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994).

Такой dsFv можно создать посредством получения кДНК, кодирующей VH и VL антитела, конструирования ДНК, кодирующей dsFv, встраивания ДНК в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии и затем введения вектора в клетку прокариота или эукариота так, чтобы обеспечить возможность экспрессии в ней ДНК.

Пептид, содержащий CDR, содержит по меньшей мере одну область CDR VH (CDR 1-3) и CDR VL (CDR 1-3). Более предпочтительные примеры такого пептида включают пептид, содержащий все CDR VH, и пептид, содержащий все CDR VL. Особенно предпочтительным примером пептида является пептид, содержащий все CDR VH и VL (всего 6 областей). Предпочтительные примеры аминокислотной последовательности такой CDR включают аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO:36-38, 41-43, 46-48, 51-53, 56-58, 61-63, 66-68 и 71-73, которые описаны выше. Пептид, содержащий множественные CDR, может быть связан с другим пептидом непосредственно или через подходящий пептидный линкер. Такой пептид, содержащий CDR, можно получить посредством конструирования ДНК, кодирующей VH и VL антитела, встраивания ДНК в прокариотический вектор экспрессии или эукариотический вектор экспрессии и затем введения вектора экспрессии в клетку прокариота или эукариота так, чтобы обеспечить возможность для экспрессии в ней ДНК. Кроме того, такой пептид, содержащий CDR, также может быть получен способами химического синтеза, такими как способ на основе Fmoc (способ с использованием флуоренилметилоксикарбонила) и способ на основе tBoc (способ с использованием трет-бутилоксикарбонила).

Фрагмент антитела согласно настоящему изобретению как таковой может представлять собой фрагмент антитела, который содержит часть или полную Fc-область антитела, в которой фукоза не связана с N-ацетилглюкозамином на восстанавливаемом конце связанной N-гликозидной связью цепь сахара. В данном случае фрагмент антитела согласно настоящему изобретению также может представлять собой слитый белок, в котором указанный выше фрагмент антитела слит с частью или полной Fc-областью

антитела, в которой фукоза не связана с N-ацетилглюкозамином на восстанавливаемом конце связанной N-гликозидной связью цепи сахара. Такой фрагмент антитела способен значительно улучшать ADCC-активность, и поэтому он является предпочтительным.

Далее в описании настоящего изобретения вышеуказанные фрагменты антител также включены в объем термина «анти-hTROP-2-антитело» согласно настоящему изобретению.

3. Полинуклеотид, рекомбинантный вектор и трансформант

В настоящем изобретении также предлагается полинуклеотид (ген, ДНК), кодирующий описанное выше анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению или фрагмент антитела. В частности, полинуклеотид согласно настоящему изобретению, предпочтительно, представляет собой полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую каждую аминокислотную последовательность, приведенную в качестве примера для описанного выше анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению или фрагмента такого антитела. Кроме того, полинуклеотид согласно настоящему изобретению может представлять собой либо полинуклеотид, состоящий только из полинуклеотида, кодирующего анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению или фрагмент такого антитела, или полинуклеотид, который содержит данный полинуклеотид в виде своей части, а также содержит известные нуклеотидные последовательности, необходимые для экспрессии генов (например, промотор транскрипции, SD-последовательность, последовательность Козака, терминатор и т.д.). Таким образом, тип полинуклеотида согласно настоящему изобретению не ограничен.

Что касается полинуклеотида, кодирующего анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению или фрагмент такого антитела, то кодоны, соответствующие отдельным аминокислотам, получаемым после трансляции, особым образом не ограничены. Полинуклеотид может содержать нуклеотиды ДНК, составляющие кодоны, обычно используемые у млекопитающих, таких как человек (предпочтительно, часто используемые кодоны), или также может содержать нуклеотиды ДНК, составляющие кодоны, обычно

используемые у микроорганизмов, таких как *Escherichia coli* или дрожжи, растения и тому подобное (предпочтительно, часто используемые кодоны).

В настоящем изобретении также предлагается рекомбинантный вектор, содержащий описанный выше полинуклеотид согласно настоящему изобретению, или трансформант, содержащий рекомбинантный вектор.

Промотор транскрипции, SD-последовательность (в том случае, когда хозяином является прокариотическая клетка) и последовательность Козака (в том случае, когда хозяином является эукариотическая клетка) могут быть предварительно лигированы выше полинуклеотида (гена, ДНК), включаемого в вектор экспрессии, используемый в качестве рекомбинантного вектора. Кроме того, терминатор может быть лигирован ниже данного полинуклеотида. Кроме того, с полинуклеотидом могут быть лигированы энхансер, сигнал сплайсинга, дополнительный поли(А)-сигнал, селективный маркер и тому подобное. Отдельные элементы, необходимые для экспрессии генов, такие как описанный выше промотор транскрипции, могут входить в состав данного полинуклеотида с самого начала. Когда такие элементы исходно присутствуют в векторе экспрессии, они также могут быть использованы. Таким образом, использование отдельных элементов особым образом не ограничено.

В качестве способов включения полинуклеотида согласно настоящему изобретению в вектор экспрессии можно выбрать различные типы способов с использованием известных методик генетической рекомбинации, таких как способ с использованием ферментов рестрикции или способ с использованием топоизомеразы. Тип вектора экспрессии не ограничен, при условии, что он способен сохранять полинуклеотид (ген, ДНК), кодирующий анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению или фрагмент такого антитела, и соответствующим образом может быть выбран и использован вектор, подходящий для применяемых клеток-хозяев. Примеры такого вектора экспрессии включают плазмидную ДНК, ДНК бактериофага, ДНК ретротраспозона, ретровирусный вектор и искусственную хромосомную ДНК.

Затем сконструированный таким образом рекомбинантный вектор вводят в хозяина, получая трансформант, и полученный трансформант затем культивируют так, чтобы анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению или фрагмент такого антитела могли экспрессироваться. Следует отметить, что термин «трансформант» используют в настоящем изобретении для обозначения хозяина, в которого был введен чужеродный ген. Примеры такого трансформанта включают: хозяина, в которого был введен чужеродный ген посредством введения плазмидной ДНК или тому подобного (трансформация); и хозяина, в которого был введен чужеродный ген посредством инфекции хозяина разными типами вирусов и фагов (трансдукция).

Тип хозяина не ограничен, при условии, что он способен экспрессировать анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению или фрагмент такого антитела после того, как описанный выше рекомбинантный вектор был введен в хозяина. Таким образом, хозяин может быть выбран соответствующим образом. Примеры такого хозяина включают известных хозяев, таких как разные типы клеток животных, таких как клетки человека или мыши, и различные типы клеток растений, бактерий, дрожжей и клеток растений.

В случае использования клеток животных в качестве клеток-хозяев примеры таких клеток животных включают: фибробласты человека, клетки эмбриональной почки человека, клетки HEK293, клетки 293F, клетки CHO, клетки обезьян COS-7, Vero, L-клетки мыши, клетки GH3 крысы и клетки FL человека. Кроме того, также можно использовать клетки насекомых, такие как клетки Sf9 или клетки Sf21.

В случае использования бактерий в качестве хозяев примеры таких бактерий включают *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*.

В случае использования дрожжей в качестве хозяина примеры таких дрожжей включают *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*.

В случае использования клеток растений используют, например, клетки табака BY-2.

Способ получения трансформанта не ограничен и его можно

выбрать соответствующим образом, принимая во внимание сочетание типа хозяина и типа вектора экспрессии. Предпочтительные примеры способа получения трансформанта включают электропорацию, липофекцию, способ на основе теплового шока, ПЭГ, способ на основе фосфата кальция, способ на основе DEAE-декстрана и способ, основанный на инфицировании хозяина различными типами вирусов, такими как ДНК-вирус или РНК-вирус.

В полученном трансформанте тип кодонов полинуклеотида, входящего в состав рекомбинантного вектора может быть идентичным или может отличаться от типа кодонов используемого хозяина. Таким образом, тип кодонов не ограничен.

4. Получение конъюгата антитело-лекарственное средство

В качестве иммуноконъюгата, получаемого с использованием указанного выше анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению, может быть предложен конъюгат антитело-лекарственное средство, который содержит указанное выше антитело и вещество (соединение и т.д.), обладающее противоопухолевой активностью и/или активностью, вызывающей гибель клеток. Следует отметить, что конъюгат, образованный в результате предварительного получения указанной выше молекулы антитела и указанного выше вещества, обладающего противоопухолевой активностью и/или активностью, приводящей к гибели клеток, по отдельности и затем их объединения, обычно называют иммуноконъюгатом. С другой стороны, конъюгат, полученный лигированием белка-токсина, используемого в качестве такого вещества, обладающего противоопухолевой активностью и/или активностью, приводящей к гибели клеток, с антителом на уровне генов согласно способу генетической рекомбинации так, чтобы обеспечить возможность экспрессии в виде одного белка (слитого белка), обычно называют иммунотоксином.

Примеры вещества, обладающего противоопухолевой активностью, включают доксорубицин, калихеамицин, митомицин С, ауристатин Е и радиоактивный изотоп (RI). Примеры вещества, обладающего активностью, приводящей к гибели клеток, включают сапорин, лизин, экзотоксин *Pseudomonas*, дифтерийный токсин и радиоактивный изотоп (RI). Из них, предпочтительно, используют

сапорин и экзотоксин *Pseudomonas*. Тип RI, обладающего противоопухолевой активностью и/или активностью, приводящей к гибели клеток, особым образом не ограничен, и примеры такого RI включают ^{90}Y , ^{111}In , ^{125}I , ^3H , ^{35}S , ^{14}C , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{198}Au , ^{224}Ac , ^{126}I , ^{133}I , ^{77}Br , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, $^{121\text{m}}\text{Te}$, $^{122\text{m}}\text{Te}$, $^{125\text{m}}\text{Te}$, ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{111}Ag , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{105}Rh , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{199}Au , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{18}F , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{86}Y , ^{169}Yb , ^{166}Dy , ^{212}Pb и ^{223}Ra .

Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство не ограничен. Например, применяют способ связывания антитела с лекарственным средством дисульфидной связью или гидразоновой связью.

Указанное выше анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению является превосходным с точки зрения активности в интернализации в опухолевые клетки-мишени, которые экспрессируют hTROP-2. Таким образом, благодаря предварительному объединению вещества, обладающего противоопухолевой активностью и активностью, приводящей к гибели клеток, с анти-hTROP-2-антителом, становится возможным обеспечить возможность прямого и высокоизбирательного действия такого вещества на опухолевые клетки. Конъюгат антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению является очень хорошим с точки зрения способности доставлять средство в опухолевые клетки-мишени.

Активность в интернализации в клетки может быть оценена с использованием флуоресцентного мечення антитела родамином или тому подобным красителем и затем наблюдения поведения при миграции и локализации антитела с помощью флуоресцентного микроскопа или тому подобного.

Кроме того, в настоящем изобретении в дополнение к указанному выше конъюгату антитело-лекарственное средство также предлагается конъюгат фрагмент антитела-лекарственное средство, в котором вместо антитела используют указанный выше фрагмент антитела. Что касается подробностей, связанных с таким конъюгатом фрагмент антитела-лекарственное средство, то в

соответствующих случаях может быть применимо описание указанного выше конъюгата антитело-лекарственное средство.

Далее в описании настоящего изобретения такой конъюгат фрагмент антитело-лекарственное средство также включен в объем термина «конъюгат антитело-лекарственное средство» согласно настоящему изобретению.

5. Фармацевтическая композиция

Анти-hTROP-2-антитело и конъюгат антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению применимы в качестве активных ингредиентов, входящих в состав фармацевтической композиции.

Фармацевтическая композиция применима в качестве фармацевтической композиции для лечения и/или диагностики опухоли. В частности, так как анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению и конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий указанное выше антитело, имеют превосходную ингибирующую рост опухолей активность, по существу противоопухолевую активность, они предпочтительно применимы для лечения опухоли. Иначе говоря, анти-hTROP-2-антитело и конъюгат антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению применимы в качестве активных ингредиентов, входящих в состав средства для терапии опухолей и средства для диагностики опухолей. Следует отметить, что описанное выше лечение опухоли включает ингибирование опухолевого роста и подавление роста опухолей. В частности, если средство представляет собой средство для терапии опухолей, то примеры средства для терапии опухолей включают ингибитор опухолевого роста и средство, подавляющее рост опухолей.

Предпочтительным является получение фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению в форме фармацевтической композиции, содержащей анти-hTROP-2-антитело и/или конъюгат антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению в качестве активного ингредиента(ов), и дополнительно содержащей фармакологически приемлемый носитель. Кроме того, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть использована в сочетании с известными

противоопухолевыми средствами. При таком комбинированном применении может быть получен более высокий противоопухолевый эффект.

Заболевания (опухоли), являющиеся мишенями, по отношению к которым применима фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению, включают: указанные выше различные типы известных опухолей человека, в которых подтверждена экспрессия hTROP-2. Среди прочих, особенно предпочтительными являются один или два или больше типов, выбранных из различных типов опухолей человека, таких как рак поджелудочной железы человека, рак простаты человека, рак прямой и ободочной кишки человека, рак молочной железы человека, рак яичника человека, рак легкого человека и рак желчных протоков человека. Такое заболевание-мишень может быть представлять собой одно заболевание, или могут развиваться два или больше заболеваний в сочетании. Кроме того, опухоль-мишень может представлять собой рецидивирующую злокачественную опухоль или метастатическую злокачественную опухоль. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению (кроме того, анти-hTROP-2-антитело и/или конъюгат антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению) можно эффективно применять в качестве терапевтического средства и диагностического средства в случае рецидивирующей злокачественной опухоли или метастатической злокачественной опухоли.

Примеры «фармакологически приемлемого носителя» включают эксципиент, разбавитель, наполнитель, дезинтегрирующее средство, стабилизатор, консервант, буфер, эмульгатор, ароматизатор, краситель, подсластитель, загуститель, корригент, солюбилизатор и другие добавки. С использованием одного или нескольких типов таких носителей фармацевтическая композиция может быть получена в форме инъекционного средства, жидкого средства, капсулы, суспензии, эмульсии, сиропа и т.д. Такие фармацевтические композиции можно вводить перорально или парентерально. Другой формой для парентерального введения является, например, инъекционное средство, содержащее один или несколько активных ингредиентов, которое получают обычным

способом. Такое инъекционное средство может быть получено растворением или суспендированием антитела согласно настоящему изобретению в фармакологически приемлемом носителе, таком как физиологический раствор соли или коммерчески доступная дистиллированная вода, используемая для инъекции.

В частности, в том случае, когда фрагмент антитела, полученный из анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению (в частности, фрагмент антитела с низкой молекулярной массой) вводят в живой организм, в дополнение к указанным выше компонентам можно использовать коллоидную дисперсную систему. Предполагается, что такая коллоидная дисперсная система оказывает действие, повышающее стабильность соединения (фрагмента антитела) в живом организме или действие, способствующее эффективному транспорту такого соединения в конкретный орган, ткань или клетку. Тип такой коллоидной дисперсной системы не ограничен, при условии, что такой тип широко используется. Примеры такой коллоидной дисперсной системы включают дисперсные системы, содержащие в качестве основы полиэтиленгликоль, конъюгат макромолекул, агрегированные макромолекулы, нанокapsулу, микросферу, шарики и липиды, включая эмульгатор масла в воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Предпочтительные примеры таких коллоидных дисперсных системы включают многочисленные липосомы и везикулы из искусственных мембран, действие которых заключается в эффективном транспорте такого соединения в конкретный орган, ткань или клетку (Mannino et al., *Biotechniques*, 1988, 6, 682; Blume and Cevc, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1990, 1029, 91; Lappalainen et al., *Antiviral Res.*, 1994, 23, 119; Chonn and Cullis, *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, 698).

Дозы фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению различаются в зависимости от возраста, пола, массы тела и симптомов пациента, терапевтических эффектов, способа введения, времени лечения, типа анти-hTROP-2-антитела и конъюгата антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению, входящих в состав фармацевтической композиции, и т.д. В общем, фармацевтическую композицию согласно настоящему

изобретению можно вводить в диапазоне от 600 мкг до 6000 мг для взрослого человека за одно введение. Однако доза не ограничена указанным выше диапазоном.

В том случае, когда фармацевтическую композицию вводят, например, в форме инъекции, ее можно вводить в дозе от 100 мкг до 100 мг на введение на массу тела человека, однократно или дробно в несколько введений, в качестве средней суточной дозы. Предпочтительно, фармацевтическую композицию можно вводить один раз каждые три дня, один раз в неделю, один раз каждые десять дней или один раз каждые две недели или при однократном введении (когда общее количество введений равно 1). Примеры дозируемой формы включают внутривенную инъекцию, подкожную инъекцию, интрадермальную инъекцию, внутримышечную инъекцию и внутрибрюшинную инъекцию. Из них предпочтительной является внутривенная инъекция. Кроме того, такое инъекционное средство можно получить в неводном разбавителе (например, полиэтиленгликоле, растительном масле, таком как оливковое масло, спиртах, таких как этанол и т.д.), в форме суспензии или эмульсии. Такое инъекционное средство можно стерилизовать посредством механической стерилизации с использованием фильтра, смешивания с бактерицидным средством и т.д. Инъекционное средство может быть получено в форме инъекционного средства, которое готовят перед применением. То есть, стерильную твердую композицию получают способом сушки вымораживанием или тому подобным, и затем композицию растворяют в стерильной дистиллированной воде, используемой для инъекций, или других растворителях перед ее применением так, чтобы ее можно было затем использовать.

Настоящее изобретение относится к применению указанного выше анти-hTROP-2-антитела и/или конъюгата антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению для получения фармацевтического средства (лекарственного средства) для лечения и/или диагностики опухоли. Кроме того, настоящее изобретение относится к указанному выше анти-hTROP-2-антителу и/или конъюгату антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению, которые применяют для лечения и/или

диагностики опухоли.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения и/или диагностики опухоли, который отличается тем, что он включает применение (а именно, введение пациентам) указанного выше анти-hTROP-2-антитела и/или конъюгата антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение также относится к применению указанного выше анти-hTROP-2-антитела и/или конъюгата антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению для лечения и/или диагностики опухоли.

6. Способ выявления опухоли

Способ выявления опухоли согласно настоящему изобретению отличается тем, что он включает обеспечение возможности взаимодействия указанного выше анти-hTROP-2-антитела согласно настоящему изобретению с образцом, полученным из живого организма (далее называемым биологическим образцом), и регистрацию сигнала(ов) вступившего во взаимодействие антитела.

Как описано выше, было подтверждено, что hTROP-2 специфично экспрессируется в разных типах опухолевых клеток. Таким образом, hTROP-2, и в частности, свободный hTROP-2 (часть внеклеточной области hTROP-2) можно использовать в качестве маркера различных типов опухолей. В частности, такой hTROP-2, предпочтительно, можно использовать в качестве маркера рака поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека и рака молочной железы человека.

Поэтому анти-hTROP-2-антителу согласно настоящему изобретению обеспечивают возможность взаимодействия с биологическим образцом, и затем регистрируют сигнал вступившего во взаимодействие антитела, чтобы выявить опухоль. Полученный сигнал антитела можно использовать в качестве показателя количества антигена в биологическом образце (то есть, количества hTROP-2 или количества свободного hTROP-2). При выявлении опухоли с использованием антитела согласно настоящему изобретению сначала позволяют биологическому образцу, собранному в качестве анализа от индивида, такому как срез

ткани или кровь, используемому в качестве тестируемой мишени, связаться с антителом согласно настоящему изобретению в результате взаимодействия антиген-антитело. Затем на основании результатов измерения количества связанного антитела измеряют количество представляющего интерес антигена, находящегося в биологическом образце. Такое измерение можно осуществить в соответствии с известными способами иммуноанализа. Например, можно использовать способ иммунопреципитации, способ иммуноагглютинации, радиоиммуноанализ, иммуннефелометрию, Вестерн-блот-анализ, проточную цитометрию и тому подобное. В случае радиоиммуноанализа используют меченое антитело, и поэтому сигнал антитела выражают в количестве меченого антитела, которое выявляют непосредственно. В ином случае можно использовать раствор антитела, концентрация или титр антитела в котором известны, в качестве стандартного раствора, и при этом сигнал антитела к мишени может быть выражен в виде относительного количества. То есть, и стандартный раствор и аналит можно измерить, используя измерительное устройство, и сигнал антитела в биологическом образце может быть выражен в виде значения относительно значения для стандартного раствора, используемого в качестве критерия. Примеры такого радиоиммуноанализа включают способ ELISA, способ EI, способ РИА, флуоресцентный иммуноанализ (FIA) и люминесцентный иммуноанализ. Из указанных анализов особенно предпочтительным является способ ELISA, который является простым и высокочувствительным.

В настоящем изобретении состояние опухоли можно оценить или диагностировать, используя результат указанным выше способом регистрации, в качестве показателя. Например, в том случае, когда результат регистрации превышает предварительно определяемое стандартное значение, статус опухоли определяют как позитивный в отношении опухоли, а когда результат регистрации меньше, чем предварительно определяемое стандартное значение, статус определяют как негативный в отношении опухоли. В случае опухолевой позитивности определяют какой тип опухоли мог развиваться и таким образом оценивают статус опухоли. Термин

«статус опухоли» в используемом в настоящем описании смысле означает присутствие или отсутствие развития опухоли или степень ее прогрессирования. Таким образом, конкретные примеры статуса опухоли включают присутствие или отсутствие развития опухоли, степень ее прогрессирования, степень злокачественности, присутствие или отсутствие метастазов и присутствие или отсутствие рецидивов.

В случае указанной выше оценки в качестве статуса опухоли, подвергаемой оценке, может быть выбран только один статус из указанных выше примеров или множество примеров можно объединить и выбрать. Присутствие или отсутствие опухоли можно оценить, определяя развилась ли опухоль или нет, со ссылкой на предварительно определяемое стандартное значение, используемое в качестве пограничного, на основании полученного результата регистрации. Степень злокачественности используют в качестве показателя, который свидетельствует о степени прогрессирования злокачественной опухоли. На основании результата регистрации опухоль-мишень можно классифицировать, относя ее к определенной стадии заболевания, и ее можно оценить. В другом случае можно отличить друг от друга раннюю стадию злокачественной опухоли и позднюю стадию злокачественной опухоли, и затем их можно оценить. Например, также можно определить опухоль-мишень как злокачественную опухоль на ранней стадии или злокачественную опухоль на поздней стадии, используя результаты регистрации в качестве показателя. Метастазы опухоли можно оценивать, определяя появилась ли новообразование в месте, отдаленном от положения начального поражения, используя результат регистрации в качестве показателя. Рецидив можно оценить, определяя превысил ли снова или не превысил результат регистрации предварительно определяемое стандартное значение после промежуточной стадии или стадии ремиссии.

7. Набор для выявления или диагностики опухоли

Анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению может быть представлено в форме набора для выявления или диагностики опухоли. Набор согласно настоящему изобретению содержит метящее вещество, твердофазный реагент, на котором

антитело или меченое антитело было иммобилизовано, и т.д., а также указанное выше антитело. Метящее вещество, которое метит антитело, означает вещество, меченое ферментом, радиоактивным изотопом, флуоресцирующим соединением, хемилюминесцирующим соединением и т.д. Набор согласно настоящему изобретению также может содержать другие реагенты, используемые для осуществления выявления согласно настоящему изобретению, в дополнение к указанным выше составным элементам. Например, когда таким метящим веществом является меченое ферментом вещество, набор согласно настоящему изобретению может содержать субстрат фермента (хромогенный субстрат и т.д.), раствор для растворения субстрата фермента, раствор для остановки ферментативной реакции, разбавитель, используемый для аналитов, и т.д. Кроме того, набор согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать различные типы буферов, стерильную воду, различные типы сосудов для культивирования клеток, различные типы реакторов (пробирки Эппендорф и т.д.), блокирующий агент (компонент сыворотки, такой как бычий сывороточный альбумин (БСА), обезжиренное молоко или сыворотка козы), агент для промывки, поверхностно-активное вещество, различные типы планшетов, антисептик, такой как азид натрия, руководство по осуществлению Экспериментальной процедуры (инструкцию) и т.д.

Набор согласно настоящему изобретению можно эффективно применять для осуществления указанного выше способа выявления согласно настоящему изобретению, и поэтому он является чрезвычайно полезным.

Далее настоящее изобретение будет описано более конкретно в следующих примерах. Однако такие примеры не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

[Пример 1]

[Клонирование гена hTROP-2]

Полноразмерный ген hTROP-2 выделяли из печени плода человека (10-недельный эмбрион) согласно способу на основе ОТ-ПЦР. Сначала конструировали следующие ПЦР-праймеры на основе последовательности гена hTROP-2 (номер доступа в Genbank NM 002353).

Прямой праймер: 5'-ttcctccgccccaccatggc-3' (SEQ ID NO:3)

Обратный праймер: 5'-ctcgagcaagctcggttcctttctc-3' (SEQ ID NO:4)

Когда конструировали такие праймеры, последовательность, расщепляемую ферментом рестрикции *XhoI*, за исключением стоп-кодона добавляли к обратному праймеру. кДНК синтезировали с суммарной РНК (TAKARA), полученной из печени плода человека (10-недельный эмбрион). Используя такую кДНК в качестве матрицы, осуществляли реакцию ПЦР с указанными выше праймерами. Затем осуществляли электрофорез в агарозном геле и экстракцию представляющей интерес полосы, и затем продукт клонировали в векторе pCRII (Invitrogen) (pCRII-hTROP-2). Клонированную кДНК hTROP-2 подтверждали секвенированием.

Вектор экспрессии конструировали отщеплением *EcoRI/XhoI*-фрагмента, содержащего ген hTROP-2 из pCRII-hTROP-2, и затем встраиванием фрагмента в сайт *EcoRI/XhoI* вектора pcDNA4/*myc*-His[®] A (Invitrogen) (pcDNA4-hTROP-2-*myc*/His). Кроме того *HindIII/PmeI*-фрагмент, содержащий ген hTROP-2, вырезали из pcDNA4-hTROP-2-*myc*/His (при этом часть, расщепляемая *HindIII*, имела тупые концы) и затем фрагмент встраивали в *PmeI*-сайт вектора pcDNA3.1(+)(Invitrogen), так чтобы сконструировать вектор экспрессии, содержащий ген резистентности к неомицину (pcDNA3.1-hTROP-2-*myc*/His).

[Пример 2]

[Конструирование клеточной линии, способной стабильно экспрессировать ген hTROP-2]

Вектор экспрессии (pcDNA3.1-hTROP-2-*myc*/His), кодирующий полноразмерную кДНК hTROP-2, который был получен описанным выше способом, вводили в клетки HEK293 (RIKEN), клетки NuH-7 (HSRRB), клетки 7E2-C (описанные в WO 2005/052156) и клетки CHO-K1 (HSRRB), используя реагент липофектамин 2000 (Invitrogen), и затем осуществляли селекцию, используя антибиотик G418 (генетицин; GIBCO BRL). Затем закладывали и получали клеточную линию, которая стабильно экспрессировала hTROP-2.

[Пример 3]

[Получение рекомбинантного белка внеклеточной области hTROP-2]

Фрагмент гена, кодирующий часть внеклеточной области hTROP-2 (в частности, область, состоящую из аминокислот в положениях 1-263 из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:2) амплифицировали способом ПЦР. В амплификации использовали следующие праймеры.

Прямой праймер: 5'-ttcctccgccccaccatggc-3' (SEQ ID NO:3)

Обратный праймер: 5'-ctcgagctcgtccaggtaatagatgagcg-3' (SEQ ID NO:5)

В такой ориентации расщепляемую ферментом рестрикции *XhoI* последовательность добавляли к обратному праймеру. Фрагмент ДНК, амплифицированный способом ПЦР, выявляли при электрофорезе в агарозном геле, и затем его очищали, используя набор для экстракции из геля QIAquick (зарегистрированная торговая марка) (QIAGEN). Очищенный фрагмент ДНК субклонировали в векторе pCR Blunt (Invitrogen) (pCRB-hTROP-2 EC), и последовательность гена подтверждали. Затем *EcoRI/XhoI*-фрагмент, содержащий фрагмент гена, кодирующий внеклеточную область hTROP-2, вырезали из pCRB-hTROP-2 EC, и затем его встраивали в *EcoRI/XhoI*-сайт вектора pCDNA4/*myc*-His[®] A (Invitrogen) (pCDNA4mH-hTROP-2 EC). Кроме того, чтобы получить сайт расщепления ферментом рестрикции *NruI*, следующие олигонуклеотиды связывали и встраивали в *BamHI/EcoRI*-сайт pCDNA4mH-hTROP-2 EC.

Олигонуклеотид 1: 5'-gatccactagtcgcgagtgggtgg-3' (SEQ ID NO:6),

Олигонуклеотид 2: 5'-aattccaccactcgcgactagtg-3' (SEQ ID NO:7).

Подобным образом линкер pBgl II (TAKARA) встраивали в *PmeI*-сайт pCDNA4mH-hTROP-2 EC (pCDNA4mH-NB-hTROP-2 EC). Чтобы получить рекомбинантный белок с использованием бакуловируса, *NruI/BglII*-фрагмент, содержащий фрагмент гена, кодирующий внеклеточную область hTROP-2, вырезали из pCDNA4mH-NB-hTROP-2 EC, и затем его встраивали в *NruI/BglII*-сайт вектора pPSC8 (Nosan Corporation) (pPSC8-hTROP-2 EC). Получение рекомбинантного белка внеклеточной области hTROP-2 с

использованием бакуловируса было поручено Nosan Corporation.

Рекомбинантный белок внеклеточной области hTROP-2 очищали следующим образом. Ni-сефарозу 6 Fast Flow (GE Healthcare Biosciences) добавляли к надосадку культуры, содержащему рекомбинантный белок, так чтобы обеспечить возможность для их связывания друг с другом, при 4°C в течение 2 часов. Затем полученный в результате продукт промывали фосфатным буфером, содержащим 20 мМ имидазола, используя колонку EconoColumn (BIO RAD), и затем элюировали фосфатным буфером, содержащим 300 мМ имидазола, осуществляя очистку.

[Пример 4]

[Выделение кДНК ЕрСAМ человека и конструирование вектора экспрессии]

Полноразмерный ген ЕрСAМ человека выделяли из печени плода человека (10-недельного эмбриона) согласно способу ОТ-ПЦР. Сначала конструировали следующие праймеры ПЦР на основе последовательности гена ЕрСAМ человека (номер доступа в Genbank NM_002354).

Прямой праймер: 5'-tcctcgtgtccctactcccgg-3' (SEQ ID NO:8).

Обратный праймер: 5'-ctcgagtgcattgagttccctatgc-3' (SEQ ID NO:9).

При конструировании таких праймеров последовательность, расщепляемую ферментом рестрикции *XhoI*, за исключением стоп-кодона добавляли к обратному праймеру. кДНК синтезировали с суммарной РНК (TAKARA) из печени плода человека (10-недельного эмбриона). Используя такую кДНК в качестве матрицы, осуществляли реакцию ПЦР с указанными выше праймерами. Затем осуществляли выявление электрофорезом в агарозном геле и экстракцию представляющей интерес полосы, и затем клонировали в векторе pCRII (Invitrogen) (pCRII-hЕрСАМ). Клонированную кДНК ЕрСАМ человека подтверждали секвенированием.

Вектор экспрессии конструировали отщеплением *EcoRI/XhoI*-фрагмента, содержащего ген ЕрСАМ человека, из pCRII-hЕрСАМ, и затем встраиванием фрагмента в *EcoRI/XhoI*-сайт вектора pcDNA4/*myc*-His[®] А (Invitrogen) (pcDNA4-hЕрСАМ-*myc*/His). Кроме

того, *HindIII*/*PmeI*-фрагмент, содержащий ген *ErCAM* человека, вырезали из *pcDNA4-hErCAM-myc/His* (при этом часть, отщепляемая *HindIII*, имела тупой конец), и затем фрагмент встраивали в *PmeI*-сайт вектора *pcDNA3.1(+)* (Invitrogen), конструируя вектор экспрессии, содержащий ген резистентности к неомичину (*pcDNA3.1-hErCAM-myc/His*).

[Пример 5]

[Получение моноклонального анти-hTROP-2-антитела]

В качестве иммуногенов использовали линии клеток, способных стабильно экспрессировать hTROP-2 (клетки HEK293-hTROP-2, клетки CHO-K1-hTROP-2 и клетки 7E2-C-hTROP-2); линию клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека, эндогенно экспрессирующую белок hTROP-2 на клеточной поверхности (PK-59, RCB1901; приобретенную из банка клеток RIKEN); и рекомбинантный белок внеклеточной области hTROP-2 получали описанным выше способом.

В случае линий клеток, способных стабильно экспрессировать hTROP-2, использовали 1×10^7 клеток, и в случае рекомбинантного белка hTROP-2 использовали 20 мкг белка. Линии клеток или рекомбинантный белок смешивали с адъювантом TiterMax Gold (Funakoshi Corporation) в соотношении в смеси 1:1, получая эмульсию. Затем эмульсию инъецировали в две подушечки лап или брюшную полость мыши (C57/BL6, Balb/c) (начальная иммунизация). Когда иммунизацию осуществляли путем инъекции в две подушечки лап в течение короткого периода времени, проводили бустер-иммунизацию через три-десять дней после начальной иммунизации. На следующий день после последней иммунизации собирали лимфатические узлы из обоих колен и затем получали лимфоциты. Когда иммунизацию осуществляли путем инъекции в брюшную полость в течение длительного периода времени, бустер-иммунизации проводили с интервалами раз в неделю после начальной иммунизации (при этом бустер-иммунизации осуществляли в течение 1-2 месяцев). Затем выделяли В-клетки из селезенки обычным способом. В случае иммунизации с использованием в качестве иммуногенов клеток для бустер-иммунизаций использовали

суспензию клеток, которая представляла собой PBS, содержащий 5×10^6 клеток. В случае использования белка в качестве иммуногена использовали 5 мкг раствора в PBS.

Полученные лимфоциты смешивали с линией клеток миеломы мышей (P3-X63-Ag8.653) в соотношении в смеси 3:1 и осуществляли слияние клеток согласно способу с использованием полиэтиленгликоля. Затем слитые клетки культивировали в течение 7–28 дней в среде с метилцеллюлозой (торговое название: среда для клонирования ClonaCell-HY D; стволовые клетки), которая содержала НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин). Каждую из отдельных колоний выросших гибридом собирали и помещали в 96-луночный планшет с плоским дном, и используя жидкую селективную среду, содержащую НАТ, гибридомы культивировали в инкубаторе с 5% CO_2 . Надсадок культуры выросших гибридом из отдельных колоний подвергали первичному скринингу в ELISA клеток (описанном далее) и затем вторичному скринингу в FACS-анализе, используя HuH-7-hTROP-2-клетки, РК-59, получая таким образом 300 типов гибридом, которые продуцируют моноклональные анти-hTROP-2-антитела, распознающие белки hTROP-2, экспрессируемые на клеточной поверхности живых клеток.

[Пример 6]

[Первичный скрининг с использованием ELISA клеток]

Клетки CHO-K1 (hTROP-2-негативный контроль; приобретали из Japan Health Sciences Foundation) и клетки CHO-K1-hTROP-2 (или клетки HUH-7 (hTROP-2-негативный контроль; приобретали из Japan Health Sciences Foundation) и клетки HuH-7-hTROP-2) поочередно инокулировали в 96-луночный планшет для культивирования (BD Falcon) с плотностью клеток 3×10^4 клеток/лунку и затем клетки культивировали в атмосфере 5% CO_2 при 37°C в течение 1–2 дней. Среду для культивирования клеток удаляли декантированием. Затем клетки промывали охлажденном на льду PBS и затем обрабатывали 4% параформальдегидом-PBS в течение 5 минут для того, чтобы иммобилизовать клетки. Клетки промывали PBS, который был охлажден на льду, и затем готовили планшет для ELISA. Затем осуществляли ELISA согласно обычному способу. Конкретные

операции будут описаны ниже.

Сначала осуществляли блокирование 2% раствором обезжиренного молока в PBS при комнатной температуре в течение от 30 минут до 1 часа. Затем добавляли надсадок культуры гибридом и затем давали возможность взаимодействовать при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем промывали 0,1% раствором твин 20-PBS три раза. В качестве второго антитела к полученной смеси добавляли меченое пероксидазой хрена (HRP) антитело против IgG мыши (GE Healthcare Biosciences), которое было разбавлено в 1000 раз блокирующим раствором, и затем они взаимодействовали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем полученную смесь промывали 0,1% раствором твин 20-PBS три раза. К полученному раствору добавляли раствор субстрата TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин: SIGMA), чтобы осуществить цветную реакцию, и затем реакцию останавливали добавлением 1 М серной кислоты. Затем измеряли оптическую плотность (405 нм), используя устройство для считывания микропланшетов, модель 550 (BIO RAD). Гибридомы, соответствующие надсадку культуры гибридом, имеющему высокое значение оптической плотности по сравнению с негативным контролем, подвергали крупномасштабному культивированию в 24-луночной планшете с плоским дном и затем подвергали вторичному скринингу с использованием FACS-анализа.

[Пример 7]

[Вторичный скрининг с использованием FACS-анализа]

Гибридомы, которые, как было обнаружено, были позитивным в описанном выше первичном скрининге с использованием ELISA клеток, подвергали вторичному скринингу с использованием FACS-анализа. При оценке клеток гибридом в качестве негативных контрольных клеток использовали клетки NuH-7, которые представляли собой клетки злокачественной опухоли печени человека, которые не экспрессируют hTROP-2, и реактивность по отношению к клеткам NuH-7-hTROP-2, которые стабильно экспрессировали hTROP-2, использовали в качестве индикатора. Затем осуществляли оценку на основании реактивности по отношению к клеткам PK-59 (RCB1901; приобретенные из банка клеток RIKEN), которые являются клетками злокачественной

опухоли поджелудочной железы, эндогенно экспрессирующими белок hTROP-2 белок на клеточной поверхности.

Клетки извлекали из культуральной чашки обработкой трипсином и затем готовили суспензию клеток (плотность клеток: 2×10^6 клеток/мл). Надосадок культуры гибридом, которая была позитивной в первичном скрининге с использованием ELISA клеток, подвергали взаимодействию с 100 мкл клеточной суспензии при 4°C в течение 20 минут. Реакционную смесь промывали PBS и затем подвергали взаимодействию с PE-меченым IgG мыши (BD Pharmingen) (0,1 мкг) (4°C, 30 минут). Затем реакционную смесь анализировали, используя FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

В результате получали примерно 300 типов гибридом, которые продуцируют моноклональное анти-hTROP-2-антитело, распознающее белок hTROP-2, экспрессируемый на клеточной поверхности живых клеток.

[Пример 8]

[Идентификация изотипа]

Изотип полученного моноклонального анти-hTROP-2-антитела идентифицировали, используя набор для изотипирования моноклональных антител мыши (Serotec), согласно способу, описанному в приложении к указанному выше набору.

[Пример 9]

[Образование асцитов и очистка TROP-2-антитела]

Клоны гибридом, полученные описанным выше способом, вводили с плотностью 3×10^6 клонов в брюшную полость мыши BALB/c nude, которой предварительно вводили 2,6,10,14-тетраметилпентадекана (пристана) (предварительно за семь дней). Спустя две недели собирали асциты. Кроме того, такие асциты подвергали преципитации каприловой кислотой и затем аффинной очистке с использованием колонки с белком G (HiTrap, белок G; GE Healthcare Biosciences) или колонки с белком А (HiTrap, белок А; GE Healthcare Biosciences), получая моноклональные анти-hTROP-2-антитела из отдельных клонов гибридом.

[Пример 10]

[Измерение аффинности связывания антигена (измерение значения K_d)]

Аффинность связывания антигена (значение K_d) образованного моноклонального анти-hTROP-2-антитела вычисляли способом с использованием ELISA (Djavadi-Ohanian L. et al. (1996), в *Antibody Engineering*, Chapter 4, pp. 77-97. IRL Press, Oxford).

В частности, очищенный рекомбинантный белок hTROP-2 (0,1 мкг/мл) добавляли в 96-луночный планшет для культивирования (Corning) для того, чтобы покрыть планшет антигеном (при комнатной температуре в течение 1 часа или при 4°C в течение ночи). Затем планшет три раза промывали PBS и затем в него добавляли 2% обезжиренное молоко (раствор в PBS) для блокирования (при комнатной температуре в течение 1 часа). Полученный планшет дважды промывали PBS. Затем комплекс антиген-антитело, который был образован ранее в результате смешивания раствора антигена (очищенный белок hTROP-2; 50, 25, 12,5, 6,25 или 3,125 нМ) с каждым клоном (0,5 нМ) моноклонального анти-hTROP-2-антитела и затем уравнивания смеси, добавляли к описанному выше планшету для ELISA и оставляли для взаимодействия (при комнатной температуре в течение 1 часа). Продукт реакции промывали PBS три раза и затем подвергали взаимодействию с HRP-меченым антителом против IgG мыши (конечная концентрация: 1 мкг/мл) (GE Healthcare Biosciences), разбавленным блокирующим раствором (при комнатной температуре в течение 1 часа). Затем продукт реакции промывали 0,1% раствором твин 20-PBS три раза и затем к полученному продукту добавляли раствор субстрата ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин: SIGMA), чтобы осуществить цветную реакцию. Затем к продукту реакции добавляли 1 М серную кислоту, чтобы остановить реакцию. Используя устройство для считывания микропланшетов, модель 550 (BIO RAD), измеряли оптическую плотность.

Использовали следующие выражения для вычисления, чтобы измерить константу диссоциации (K_d).

Согласно закону действия масс взаимодействие антиген-

антитело представлено следующими выражениями.

k_1

$Ag \text{ (антиген)} + Ab \text{ (антитело)} \rightleftharpoons Ag-Ab \text{ (комплекс антиген-антитело)}$

k_2

(1)

$$K_d = k_2/k_1 = Ag_f \times Ab_f / Ag-Ab = Ag_f \times Ab_f / x \quad (2)$$

В выражении (2), Ag_f означает концентрацию свободного антигена, Ab_f означает концентрацию свободного антитела, и $Ag-Ab$ означает концентрацию комплекса антиген-антитело. Если $Ag-Ab = x$, то концентрация свободного антитела представлена следующим выражением.

$$Ab_f = Ab_t - x \quad (3)$$

Поэтому указанное выше выражение (2) может быть в виде

$$K_d = Ag_f \times (Ab_t - x) / x \quad (4)$$

Если оба члена в выражении (4) умножить на $x/K_d \times Ab_t$, то

$$x/Ab_t = Ag_f \times (1 - x/Ab_t) \times 1/K_d$$

$$x/Ab_t \times 1/Ag_f = (1 - x/Ab_t) \times 1/K_d \quad (5)$$

Если $X = x/Ab_t$ и $Y = x/Ab_t \times Ag_f$ в выражении (5), то

$$Y = (1 - X) \times 1/K_d \quad (6)$$

На основании выражения (6) вычисляли значение K_d .

Значения K_d созданных 300 клонов моноклональных анти-hTROP-2-антител измеряли описанным выше способом. В результате было 133 клон, имеющих значение K_d 1×10^{-10} (М) или меньше, 59 клонов, имеющих значение K_d 1×10^{-11} (М) или меньше, и 2 клон, имеющих значение K_d 1×10^{-12} (М) или меньше.

Среди моноклональных анти-hTROP-2-антител, которые обладали ингибирующей рост опухолей активностью *in vivo*, было обнаружено, что значения K_d K5-70 (IgG2a мыши), T6-16 (IgG2a мыши), K5-107 (IgG1 мыши), K5-116-2-1 (IgG2a мыши) и T5-86 (IgG1 мыши) составляли $6,8 \times 10^{-12}$ (М), $4,3 \times 10^{-12}$ (М), $4,7 \times 10^{-12}$ (М), $2,69 \times 10^{-11}$ (М) и $8,49 \times 10^{-11}$ (М), соответственно (фигура 1 и таблица 1).

Таблица 1

Значения Kd для моноклональных анти-hTROP-2-антител

№ клона	K5-70	T6-16	K5-107	K5-116-2-1	T5-86
Kd ($\times 10^{-12}$ М)	6,8	4,3	4,7	26,9	84,9

[Пример 11]

[Реактивность моноклональных анти-hTROP-2-антител по отношению к линиям клеток злокачественных опухолей человека]

Линии клеток злокачественных опухолей человека (линии опухолевых клеток человека), используемые для такого исследования, приобретали из Health Science Research Resources Bank (HSRRB), банка клеток RIKEN (RIKEN), ATCC (американской коллекции типов культур), ECACC (европейской коллекции культур клеток) и DSMZ (немецкой коллекции микроорганизмов и культур клеток). В частности, использовали следующие линии злокачественных клеток.

huH-1 (HSRRB), HUH-6 (HSRRB), HuH-7 (HSRRB), JHH-5 (HSRRB), JHH-6 (HSRRB), JHH-7 (HSRRB), HLE (HSRRB), HLF (HSRRB), HepG2 (HSRRB), Alexander (HSRRB), KP-1N (HSRRB), KP-1NL (HSRRB), KP-2 (HSRRB), KP-3 (HSRRB), KP-3L (HSRRB), PK-1 (RIKEN), PANC-1 (RIKEN), MIA PaCa-2 (HSRRB), PK-59 (RIKEN), PK-45H (RIKEN), PK-45P (RIKEN), BxPC-3 (ATCC), SUIT-2 (HSRRB), TCC-PAN2 (HSRRB), SW480 (ATCC), DLD-1 (HSRRB), LoVo (HSRRB), COLO-320 (RIKEN), CACO-2 (RIKEN), CW-2 (RIKEN), HCT 116 (ATCC), HCC-56 (HSRRB), MCF-7 (HSRRB), JIMT-1 (DSMZ), HCC1143 (ATCC), A549 (HSRRB), DU145 (RIKEN) и PC-3 (HSRRB).

Злокачественные клетки извлекали из культуральной чашки обработкой трипсином и затем готовили суспензию клеток (плотность клеток: 2×10^6 клеток/мл). Моноклональное анти-hTROP-2-антитело (0,1 мкг) добавляли к 100 мкл клеточной суспензии, и затем они взаимодействовали при 4°C в течение 20 минут. Реакционный раствор промывали PBS, и затем подвергали взаимодействию с PE-меченым антителом против IgG мыши (BD Biosciences Pharmingen) (0,1 мкг) (при 4°C в течение 30 минут). Затем анализировали результат, используя FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

Все созданные анти-hTROP-2-антитела не связывались с линией клеток злокачественной опухоли печени человека HuH-7, которая эндогенно не экспрессировала hTROP-2. С другой стороны анти-hTROP-2-антитела связывались с клетками HuH-7-hTROP-2, в которых ген hTROP-2 стабильно экспрессировался (фигура 2). Затем исследовали реактивность созданных моноклональных анти-hTROP-2-антител по отношению к линиям злокачественных клеток человека (в которых белок hTROP-2 эндогенно экспрессировался на клеточной поверхности), используя FACS-анализ. В результате все созданные 300 типов моноклональных анти-hTROP-2-антител связывались с линиями клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека (PK-59 и ВхРС-3). В частности, все антитела К5-70, Т6-16, К5-107, К5-116-2-1 и Т5-86, которые проявляли ингибирующую рост опухолей активность *in vivo*, связывались с линиями злокачественных клеток человека на высоком уровне. Например, при сравнении со случаем, в котором линии злокачественных клеток подвергали воздействию только с РЕ-меченым антителом против IgG мыши (BD Biosciences Pharmingen), указанные выше антитела проявляли следующую способность связывания с клетками PK-59 и клетками ВхРС-3 при средней интенсивности флуоресценции: К5-70 (44 раза), Т6-16 (59 раз), К5-107 (89 раз), К5-116-2-1 (122 раза) и Т5-86 (15 раз) (с клетками PK-59; фигура 3); и К5-70 (45 раз), Т6-16 (25 раз), К5-107 (90 раз), К5-116-2-1 (121 раз) и Т5-86 (10 раз) (с клетками ВхРС-3; фигура 4).

Что касается линий злокачественных клеток человека, отличных от PK-59 и ВхРС-3, то среди 12 типов линий клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы моноклональные анти-hTROP-2-антител связывались с KP-2, KP-3L, PK-1, PK-45H, SUIT-2 и TCC-PAN2 и не связывались с KP-1N, KP-1NL, KP-3, PANC-1 и MIA-PaCa2 (фиг.5). Среди линий линия клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека моноклональные анти-hTROP-2-антитела связывались с CACO-2, SW480, DLD-1 и HCT 116, и не связывались с COLO-320 и CW-2 (фигура 6). Кроме того, моноклональные анти-hTROP-2-антитела связывались с JIMT-1 и HCC1143 (которые представляли собой линии клеток

злокачественной опухоли молочной железы человека) и с РС-3 и DU145 (которые представляли собой линии клеток злокачественной опухоли простаты человека). Таким образом, они распознавали белки hTROP-2, эндогенно экспрессирующиеся на клеточной поверхности многих типов линий злокачественных клеток человека (фиг.6).

[Пример 12]

[Перекрестная реактивность с белком TROP-2 мыши и белком TROP-1/ErCAM человека]

В целях исследования специфичности созданных моноклональных анти-hTROP-2-антител определяли реактивность антител по отношению к белку TROP-2 мыши, имеющему гомологию 80% на уровне аминокислотной последовательности с белком hTROP-2, и по отношению к белку TROP-1/ErCAM человека, имеющему гомологию 50% на уровне аминокислотной последовательности с белком hTROP-2, используя FACS-анализ.

В частности, вектор экспрессии (TROP-2-pcDNA3.1(+)) мыши, предоставленный Institute of Molecular and Cellular Biosciences, the University of Tokyo), содержащий полноразмерную кДНК гена TROP-2 мыши (номер доступа в Genbank NM__020047, Y08830), и вектор экспрессии (pcDNA3.1-hErCAM-мус/His), содержащий полноразмерную кДНК гена TROP-1/ErCAM человека (номер доступа в Genbank NM_002354), временно вводили в клетки CHO-K1, используя реагент липофектамин 2000 (Invitrogen). Затем спустя 24-48 часов клетки извлекали из культуральной чашки обработкой их трипсином и затем готовили суспензию клеток. Полученную таким образом суспензию клеток последовательно подвергали взаимодействию с полученным моноклональным анти-hTROP-2-антителом (0,1 мкг) и с PE-меченым антителом против IgG мыши и затем анализировали, используя FACSCalibur.

Антитело T2-102 (IgG1 мыши), используемое в качестве позитивного контроля, которое проявляло перекрестную реактивность с TROP-2 мыши, проявляло высокую способность к связыванию с клетками CHO-K1, в которых ген TROP-2 мыши был временно экспрессирован. С другой стороны, антитела K5-70, T6-

16, K5-107, K5-116-2-1 и T5-86 не проявляли такой перекрестной реактивности по отношению к TROP-2 мыши (фиг.7).

Подобным образом, моноклональное антитело против EpCAM человека (BD Biosciences Pharmingen), используемое в качестве позитивного контроля, проявляло высокую способность к связыванию с клетками CHO-K1, в которых EpCAM/TROP-1 человека был временно экспрессирован. С другой стороны, антитела K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 и T5-86 не проявляли перекрестной реактивности по отношению к EpCAM/TROP-1 человека (фиг.8).

Указанные выше результаты свидетельствуют, что образованные моноклональные анти-hTROP-2-антитела, и в частности, антитела K5-70, T6-16, K5-107, K5-116-2-1 и T5-86, которые проявляли противоопухолевую активность *in vivo*, специфично связываются с hTROP-2.

[Пример 13]

[Измерение ингибирующей рост активности]

В качестве способа исследования активности моноклонального анти-hTROP-2-антитела ингибировать функцию hTROP-2, оценивали влияние антитела на клеточный рост злокачественных клеток человека, которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на клеточной поверхности, измеряя количество живых клеток с использованием TetraColor ONE (Seikagaku Corporation). В частности, клетки PK-59 суспендировали в среде RPMI1640, содержащей 0,5% фетальной сыворотки теленка (производства BioWest), получая концентрацию клеток 2×10^5 клеток/мл, и затем по 100 мкл полученной клеточной суспензии добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета для культивирования. Затем в лунки добавляли IgG мыши (негативный контроль) и моноклональные анти-hTROP-2-антитела (конечные концентрации: 0,1 и 1 мкг/мл) и затем смеси культивировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 72 часов. В качестве контроля использовали коммерчески доступное моноклональное анти-hTROP-2-антитело (клон YY01, Santa Cruz). В лунки добавляли TetraColor ONE (Seikagaku Corporation) и затем подвергали взаимодействию в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 1-2 часов. После завершения реакции в 96-луночном планшете для

культивирования непосредственно измеряли оптическую плотность при длине волны 490 нм (длина волны в контроле: 655 нм), используя устройство для считывания микропланшетов. Эксперимент осуществляли, используя по 3 лунки на каждую группу. Оценку значимых различий осуществляли согласно критерию Стьюдента, и различия определяли как статистически значимые при $P < 0,05$.

Среди моноклональных анти-hTROP-2-антител, которые были созданы в компании авторов изобретения до настоящего времени, примерно 160 клонов были исследованы описанным выше способом в отношении их влияния на клеточный рост клеток РК-59. В результате было подтверждено, что Т6-16, Т5-86, К5-70 и К5-107, которые проявляли ингибирующую рост опухолей активность *in vivo*, обладали активностью, ингибирующей клеточный рост на 20%-40%, по сравнению с IgG мыши (негативный контроль). Стало ясно, что такие анти-hTROP-2-антитела обладают активностью в связывании белков hTROP-2, которые экспрессировались на поверхности злокачественных клеток человека, нейтрализуя белки hTROP-2 и ингибируя рост злокачественных клеток (фиг.9).

[Пример 14]

[Анализ заращения царапины]

Влияние моноклонального анти-hTROP-2-антитела на способность злокачественных клеток человека к миграции оценивали в анализе заращения царапины. Клетки РК-59 суспендировали в среде RPMI1640, содержащей 10% фетальную сыворотку теленка, в концентрации 3×10^5 клеток/мл и затем по 100 мкл полученной клеточной суспензии добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета для культивирования. После слияния клеток часть культивируемых в монослое клеток счищали кончиком наконечника, так чтобы сделать на планшете царапину в продольном направлении. Моноклональное анти-hTROP-2-антитело и IgG мыши, используемый в качестве негативного контроля, добавляли в среду до конечной концентрации 0,1 и 1 мкг/мл, соответственно, и затем осуществляли культивирование в течение 24 часов. Перед добавлением антитела (день 0) и через 24 часа культивирования (день 1), область счищенных клеток фотографировали и затем измеряли расстояние между клетками.

Кроме того, площадь такой области со счищенными клетками количественно оценивали, используя компьютерную группу Scion Image. Эксперимент осуществляли, используя 8 лунок на каждую группу. Проверку значимого различия осуществляли, используя *t*-критерий Стьюдента, и определяли различие как статистически значимое при $P < 0,05$.

Исследовали влияние hTROP-2-антитела на способность к миграции клеток, проникающих в область царапины. Как и в случае анализа ингибирования клеточного роста, оценивали антитела, оказывающие полезные эффекты. В качестве способа оценки клетки фотографировали в 0 день (когда добавляли антитело) и в 1 день (через 24 часа после добавления антитела), и расстояние миграции (мкм) и площадь области царапины определяли, используя анализ изображения. В результате, как показано на фигуре 10, наблюдали четкие различия в способности клеток к миграции. Антитела Т6-16 и К5-70, которые использовали в данном тесте, обладали значимой ингибирующей рост клеток активностью, по сравнению с контролем. Даже в тесте воспроизводимости наблюдали такую же тенденцию. В частности, в случае Т6-16 $P < 0,01$ (*t*-критерий Стьюдента), и обнаружена корреляция с тестом *in vivo*.

[Пример 15]

[Оценка полезных эффектов моноклонального анти-hTROP-2-антитела у мышей, несущих опухоли]

Модель профилактики

Линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы (РК-59 и ВхРС-3), которые экспрессировали hTROP-2, собирали обработкой трипсином и к ним добавляли PBS, чтобы получить суспензию клеток, имеющую концентрацию 1×10^8 клеток/мл. Полученную таким образом суспензию клеток смешивали с равным количеством Matrigel (BD Biosciences Pharmingen) на льду. Используя шприц 26G, 100 мкл полученной смеси (5×10^6 клеток) инъецировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей nude 6-недельного возраста (Balb/c, nu/nu). В день трансплантации злокачественных клеток (день 1) мышей делили на группы и начинали введение антитела (1, 5 или 10 мг/кг массы тела, внутрибрюшинное введение). Затем введение антитела продолжали с

интервалами один раз каждые три дня. Противоопухолевую активность оценивали на основе частоты образования опухолей и объема опухолей. Объем опухолей вычисляли по следующей формуле.

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = (\text{меньшая ось})^2 \times (\text{большая ось}) \times \pi/6$$

Модель лечения

Линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы (PK-59 и ВхРС-3), которые экспрессировали hTROP-2, собирали обработкой трипсином и к ним добавляли PBS, чтобы получить суспензию клеток, имеющую концентрацию 1×10^8 клеток/мл. Полученную таким образом суспензию клеток смешивали с равным количеством Matrigel (BD Biosciences Pharmingen) на льду. Используя шприц 26G, 100 мкл полученной смеси (5×10^6 клеток) инъецировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей nude 6-недельного возраста (Balb/c, nu/nu). Через пять-шесть дней после трансплантации злокачественных клеток мышей, объем опухолей у которых повысился до 50-150 мм³ (среднее значение: примерно 100 мм³), делили на группы. День, в который мышей делили на группы, определяли как первый день (день 1) и начинали введение антитела. Антитело вводили внутривентально с интервалами один раз каждые три дня (10 мг/кг массы тела). Противоопухолевую активность оценивали по измерению объема опухолей. Проверку значимого различия осуществляли, используя t-критерий Стьюдента, и определяли различие как статистически значимое при $P < 0,05$.

[Пример 16]

[Анализ противоопухолевой активности моноклонального анти-hTROP-2-антитела *in vivo* в модели ксенотрансплантов злокачественных клеток поджелудочной железы человека]

В случае антитела, применяемого для лечения злокачественной опухоли, мишенью которого является hTROP-2, важно наличие активности, приводящей к специфичной гибели опухолевых тканей, экспрессирующих hTROP-2 или ингибированию роста опухоли в модели на основе ксенотрансплантатов.

Моноклональные анти-hTROP-2-антитела (примерно 160 клонов), которые были вновь получены в настоящем изобретении,

оценивали с использованием моделей лечения ксенотрансплантатов линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы PK-59. Клетки PK-59 экспрессируют на своей поверхности EpCAM (фигура 11A), действующий как маркер стволовых клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы (Chenwei Li, с соавторами, *Cancer Res.* 2007; 67: (3), 1030-1037), а также экспрессируют Р-гликопротеин/MDR1 (фигура 11B) и ABCG2/CDw338 (фигура 11C) (Chen, C. J. et al., *Cell* 47 (3), 381-389 (1986), Allikmets, R., et al., *Hum. Mol. Genet.* 5 (10), 1649-1655 (1996)), которые являются ABC-переносчиками, ассоциированными с резистентностью к лекарственным средствам. Кроме того, клетки PK-59 содержат фракцию клеток (8,93%) (фиг. 11D), позитивных как по CD24, так и по CD44, которые характерны для стволовых клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы, и полагают, что они являются высоко злокачественной линией клеток рака поджелудочной железы человека (Chenwei Li, et al., *Cancer Res* 2007; 67: (3), 1030-1037, Jane E. Visvader and Geoffrey J. Lindeman. *Nat Rev. Cancer* Vol. 8(10): 755-68, 2008).

Большинство вновь полученных примерно 160 клонов не проявляли полезных эффектов в моделях лечения ксенотрансплантатов клеток PK-59. Среди таких клонов были получены клоны, проявляющие значимую ингибирующую рост опухолей активность, а именно, клоны K5-70, T6-16, K5-107, T5-86 и K5-116-2-1.

В группе введения клона K5-70 (IgG2a мыши) скорость роста опухолей была статистически значимо ингибирована. На 21-ый день после начала введения (день 21) объем опухолей в контрольной группе (N=14) составлял $1200,8 \pm 377,3$ мм³, тогда как объем опухолей в группе введения клона K5-70 составлял $748,7 \pm 175,0$ мм³ ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента) (фиг. 12A). Если объем опухолей в момент начала введения антитела был определен, как равный 1,0, объем опухолей на 21-ый день (день 21) составлял 7,8 в группе введения клона K5-70, тогда как объем опухолей в контрольной группе составлял 12,5 (фиг. 12A). Масса вырезанной опухоли составляла $0,43 \pm 0,14$ г ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента) в группе введения клона K5-70, тогда как масса вырезанной опухоли

в контрольной группе составляла $0,73 \pm 0,26$ г. Таким образом, клон К5-70 проявлял ингибирующую активность, составляющую примерно 60% (фиг. 12В).

Подобным образом, скорость роста опухолей была статистически значимо ингибирована даже в группе введения клона К5-107 (IgG1 мыши) (N=8), в группе введения клона Т6-16 (IgG2а мыши) (N=8), в группе введения клона Т5-86 (IgG1 мыши) и в группе введения клона К5-116-2-1 (IgG2а мыши) (N=8). На 17-ый день после начала введения (день 17) объем опухолей в группе введения клона К5-107 (N=8) и в группе введения клона Т6-16 (N=8) составлял $698,2 \pm 175,9$ мм³ ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента) и $707,2 \pm 254,5$ мм³ ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), соответственно, тогда как объем опухолей в контрольной группе составлял $1039,3 \pm 271,6$ мм³. Подобным образом, на 16-ый день после начала введения (день 16) объем опухолей в группе введения клона К5-116-2-1 (N=8) составлял $508,5 \pm 225,2$ мм³ ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), тогда как объем опухолей в контрольной группе (N=8) составлял $797,0 \pm 172,9$ мм³ (фиг. 13).

С другой стороны, в случае клона Т5-86 на 15-ый день после начала введения (день 15) объем опухоли в группе введения клона Т5-86 (N=8) составлял $744,1 \pm 289,1$ мм³, тогда как объем опухолей в контрольной группе (N=8) составлял $1033,2 \pm 319,4$ мм³. Таким образом, не было обнаружено значимого различия в отношении объема опухолей. Однако при сравнении массы опухолей, которое осуществляли в тот же день, масса опухолей в группе введения клона Т5-86 составляла $0,44 \pm 0,13$ г ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), тогда как масса опухолей в контрольной группе составляла $0,62 \pm 0,14$ г. Таким образом, клон Т5-86 проявлял значимую ингибирующую активность.

Кроме того, что касается объема опухолей и массы опухолей, то отношение (Т/С) для каждой группы введения клона антитела к контрольной группе в последний день эксперимента показано в таблице 2 ниже. Как показано в таблице 2, антитело каждого клона проявляло значимую ингибирующую активность (Т/С = 62%-72%) в каждой группе введения клона антитела.

Таблица 2

Группа	N (количество мышей)	Объем опухолей Т/С (%)	Масса опухолей Т/С (%)
K5-70	14	62,3**	58,8**
K5-107	8	67,2*	65,0*
T6-16	8	68,0*	64,7*
T5-86	8	72,0	70,5*
K5-116-2-1	8	63,8*	60,5*

*P<0,05, **P<0,01 (t-критерий Стьюдента)

Кроме того, анализировали противоопухолевую активность каждого из клонов K5-70, T6-16 и K5-116-2-1 в моделях профилактики ксенотрансплантатов линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы РК-59. После окончания введения антитела каждого клона рост опухолей был ингибирован у всех особей (N=8). На 18-ый день после начала введения (день 18) объем опухолей в группе введения клона K5-70 (10 мг/кг массы тела) составлял $62,4 \pm 80,4$ мм³ (P<0,01, t-критерий Стьюдента), тогда как объем опухолей в контрольной группе (N=8) составлял $880,8 \pm 206,4$ мм³. Таким образом, клон K5-70 проявлял активность, ингибирующую рост опухолей на 92,9%. На 28-ой день после начала введения (день 28) объем опухолей в группе введения клона T6-16 (10 мг/кг массы тела) составлял $152,14 \pm 122,3$ мм³ (P<0,01, t-критерий Стьюдента), тогда как объем опухолей в контрольной группе (N=8) составлял $992,3 \pm 250,8$ мм³. Таким образом, клон T6-16 проявлял активность, ингибирующую рост опухолей на 84,6%. На 20-ый день после начала введения (день 20) объем опухолей в группе введения клона K5-116-2-1 (10 мг/кг массы тела) составлял $207,7 \pm 319,2$ мм³ (P<0,01, t-критерий Стьюдента), тогда как объем опухолей в контрольной группе (N=8) составлял $1159,4 \pm 413,3$ мм³. Таким образом, клон K5-116-2-1 проявлял активность, ингибирующую рост опухолей на 82,1% (фиг. 14 и таблица 3). Кроме того, во всех экспериментах не было значимого различия между контрольной группой и каждой из групп введения анти-hTROP-2-антител в отношении изменения средней массы тела в

течение периода тестирования.

Что касается объема опухолей и массы опухолей, то отношение (Т/С) каждой группы введения клона антитела к контрольной группе в последний день эксперимента показано в таблице 3 ниже. Как показано в таблице 3, значимое ингибирование роста опухолей наблюдали в каждой группе введения клона антитела, и в частности, значимый эффект, такой как Т/С = 10% или меньше, был подтвержден в группе введения клона К5-70.

Таблица 3

Группа	N (количество мышей)	Объем опухолей Т/С (%)	Масса опухолей Т/С (%)
К5-70	8	7,1**	5,8**
Т6-16	8	15,3**	10,5**
К5-116-2-1	8	23,2**	21,5**

**P<0,01 (t-критерий Стьюдента)

Известное анти-TR0P-2-антитело AR47A6.4.2 (патент США № 7420041) оказывало ингибирующее рост опухолей действие в дозе 20 мг/кг в моделях профилактики ксенотрансплантатов при использовании различных линий злокачественных клеток человека. Такое анти-TR0P-2-антитело AR47A6.4.2 ингибировало рост опухолей в случае линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PL45 почти на 100%. Однако такое антитело оказывало ингибирующее действие на опухоль в случае линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы ВхРС-3 в процентах примерно на 50%, в случае линии клеток злокачественной опухоли простаты РС-3 в процентах примерно на 40%, в случае линии клеток злокачественной опухоли молочной железы MCF-7 в процентах примерно на 60% и в случае линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки Colo205 в процентах примерно на 40%. Напротив, анти-hTR0P-2-антитело согласно изобретению, описанному в настоящей заявке, проявляло более высокий ингибирующий эффект на рост опухолей в дозе, составляющей половину от указанной выше дозы (10 мг/кг массы тела).

[Пример 17]

[Анализ противоопухолевой активности в моделях ксенотрансплантатов (модели профилактики и модели лечения) линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека ВхРС-3]

Как и в случае использования описанных выше моделей лечения ксенотрансплантатов линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-59, анализировали противоопухолевую активность клона К5-70 в моделях профилактики ксенотрансплантатов и моделях лечения ксенотрансплантатов линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека ВхРС-3 анализировали.

При сравнении с контрольной группой ($N = 8$) рост опухолей в группе введения клона К-70 был значимо ингибирован. На 52-ой день (день 52) объем опухолей в группе введения клона К5-70 ($N=8$) составлял $236,0 \pm 136,4$ мм³, тогда как объем опухолей в контрольной группе ($N=8$) составлял $616,3 \pm 266,8$ мм³. Таким образом, клон К-70 оказывал действие, ингибирующее рост опухолей на 61,7% ($P < 0,01$, t -критерий Стьюдента) (фигура 15).

На основании указанных выше результатов становится ясным, что моноклональное анти-hTROP-2-антитело проявляют значимую ингибирующую рост опухолей активность *in vivo*, по меньшей мере, на двух видах злокачественных клеток.

[Пример 18]

[Зависимая от дозы противоопухолевая активность анти-hTROP-2-антитела (клон К5-70) в моделях профилактики ксенотрансплантатов hTROP-2-экспрессирующей линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы (клетки РК-59)]

В целях более подробного анализа ингибирующей рост опухолей активности *in vivo* анти-hTROP-2-антитела осуществляли тестирование зависимости от дозы. Как показано на фигуре 16, рост опухолей клеток РК-59 зависимым дозы образом был ингибирован при введении антитела К5-70. На 21-ый день после введения антитела (день 21) объем опухолей в контрольной группе ($N = 8$) составлял $937,8 \pm 295,3$ мм³. С другой стороны объем опухолей в группе введения антитела К5-70 (1 мг/кг массы тела)

(N = 8) составлял $493,5 \pm 305,1$ мм³, что соответствует степени ингибирования на 50%, и объем опухолей в группе введения антитела K5-70 (5 мг/кг массы тела) (N=8) составлял $124,7 \pm 89,0$ мм³, что соответствует степени ингибирования 90%. Таким образом, становится очевидно, что по сравнению с известным анти-TROP-2-антителом AR47A6.4.2 (патент США № 7420041) анти-hTROP-2-антитело согласно настоящему изобретению оказывает ингибирующее рост опухолей действие *in vivo*, эквивалентное действию анти-TROP-2-антитела AR47A6.4.2 в дозе одна двенадцатая от дозы анти-TROP-2-антитела AR47A6.4.2, и что оно оказывает более высокий ингибирующий эффект, составляющий 90%, в дозе одна четвертая от дозы известного антитела.

[Пример 19]

[Эпитопный анализ]

Получение химерного белка TROP-2 человека/мышь

Ген TROP-2 человека/мышь получали согласно способу ПЦР. Конструировали праймеры для ПЦР, которые показаны ниже, на основе последовательности гена TROP-2 человека и последовательности гена TROP-2 мыши (номер доступа в Genbank NM 020047).

Праймеры TROP-2-С человека/мышь

Y606 (прямое направление): 5' -

cctgagcctacgctgscgacgaagtgggtgscg-3' (SEQ ID NO:10)

Y607 (обратное направление): 5' -

cgcaccacttcgtcgcagcgtaggctcagg-3' (SEQ ID NO:11)

Праймеры TROP-2-А человека/мышь

Y612 (прямое направление): 5' -

gactgctccacgctgacttccaagtgcctg-3' (SEQ ID NO:12)

Y613 (обратное направление): 5' -

caggcacttggaagtcagcgtggagcagtc-3' SEQ ID NO:13)

Праймеры TROP-2-В человека/мышь

Y614 (прямое направление): 5' -

ctcgtggacaacgatggcctctacgacccg-3' (SEQ ID NO:14)

Y615 (обратное направление): 5' -

cgggtcgtagaggccatcggttgtccacgag-3' (SEQ ID NO:15)

Праймеры TROP-2-D мышь/человека

Y608 (прямое направление): 5'-
ccaaagcctgcgctgcgatgagctggtgcgc-3' (SEQ ID NO:16)

Y609 (обратное направление): 5'-
gcgcaccagctcatcgcagcgcaggctttgg-3' (SEQ ID NO:17)

Праймеры TROP-2-Е мышцы/человека

Y616 (прямое направление): 5'-
agcttcctatccgcggtgcactacgagcag-3' (SEQ ID NO:18)

Y617 (обратное направление): 5' -
ctgctcgtagtgccaccgcggataggaagct-3' (SEQ ID NO:19)

Праймеры TROP-2-F мышцы/человека

Y618 (прямое направление): 5'-
gacattaaaggcgagtctctattccagggc-3' (SEQ ID NO:20)

Y619 (обратное направление): 5' -
gccctggaatagagactcgccctttaatgtc-3' (SEQ ID NO:21)

Праймеры TROP-2 мьши

Прямой праймер: 5-ctactccacccccaccctggcg-3' (SEQ ID NO:22)

Обратный праймер: 5'-ctcgagcaagctagggttcgcttctc-3' (SEQ ID NO:23)

К обратному праймеру мыши TROP-2 добавляли последовательность, расщепляемую ферментом рестрикции *XhoI*, за исключением стоп-кодона. Схематичное представление полученных химерных белков TROP-2 человека/мыши показано на фигуре 17.

Химерный белок hmTROP-2-A представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 69 белка hTROP-2 и полипептида в диапазоне от аминокислоты в положении 64 до С-конца белка TROP-2 мыши. Химерный белок hmTROP-2-B представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 101 белка hTROP-2, и полипептида в диапазоне от аминокислоты в положении 96 до С-конца белка TROP-2 мыши. Химерный белок hmTROP-2-C представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 145 белка hTROP-2 и полипептида в диапазоне от аминокислоты в положении 140 до С-конца белка TROP-2 мыши. Химерный белок mhTROP-2-D представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида в диапазоне от

N-конца до аминокислоты в положении 139 белка TROP-2 мыши и полипептида в диапазоне от аминокислоты в положении 146 до C-конца белка hTROP-2. Химерный белок mhTROP-2-E представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 187 белка TROP-2 мыши и полипептида в диапазоне от аминокислоты в положении 194 до C-конца белка hTROP-2. Химерный белок mhTROP-2-F представляет собой химерный белок, который состоит из полипептида в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 227 белка TROP-2 мыши и полипептида в диапазоне от аминокислоты в положении 234 до C-конца белка hTROP-2.

Векторы экспрессии, используемые для получения описанных выше химерных белков, специально конструировали следующими способами. Чтобы получить химерный ген hmTROP-2-A, ген hTROP-2 использовали в качестве матрицы и осуществляли ПЦР с использованием прямого праймера hTROP-2 и праймера TROP-2-A человека/мыши Y613. Подобным образом, ген TROP-2 мыши использовали в качестве матрицы и осуществляли ПЦР с использованием праймера TROP-2-A человека/мыши Y612 и обратного праймера TROP-2 мыши. Фрагмент ДНК, амплифицированный в ПЦР, выявляли, используя акриламидный гель, и затем представляющую интерес полосу извлекали экстракцией. Затем два типа экстрагированных фрагментов ДНК смешивали, получая матрицу, и затем осуществляли ПЦР, используя прямой праймер hTROP-2 и обратный праймер TROP-2 мыши. Продукт ПЦР выявляли электрофорезом в агарозном геле, и затем экстрагировали представляющий интерес фрагмент ДНК. Экстрагированный фрагмент ДНК клонировали в векторе pCR (зарегистрированная торговая марка)-Blunt (Invitrogen) (pCRB-hmTROP-2-A), и затем подтверждали последовательность гена. Вектор экспрессии для клеток животных получали удалением гена hTROP-2 из pcDNA3.1-hTROP-2-мус/His в результате расщепления *EcoRI/XhoI* и затем встраиванием в *EcoRI/XhoI*-фрагмента, содержащего химерный ген hmTROP-2-A, полученный из pCRB-hmTROP-2-A (pcDNA3.1-hmTROP-2-A-мус/His). Кроме того, получали следующие химерные гены таким же способом, который описан выше, и конструировали векторы

экспрессии: hmTROP-2-B (используя прямой праймер TROP-2 человека, праймер TROP-2-B человека/мышь Y615, праймер TROP-2-B человека/мышь Y614 и обратный праймер TROP-2 мыши), hmTROP-2-C (используя прямой праймер TROP-2 человека, праймер TROP-2-C человека/мышь Y607, праймер TROP-2-C человека/мышь Y606 и обратный праймер TROP-2 мыши), mhTROP-2-D (используя прямой праймер TROP-2 мыши, праймер TROP-2-D мыши/человека Y609, праймер TROP-2-D мыши/человека Y608 и обратный праймер TROP-2 человека), mhTROP-2-E (используя прямой праймер TROP-2 мыши, праймер TROP-2-E мыши/человека Y617, праймер TROP-2-E мыши/человека Y616 и обратный праймер TROP-2 человека), mhTROP-2-F (используя прямой праймер TROP-2 мыши, праймер TROP-2-F мыши/человека Y619, праймер TROP-2-F мыши/человека Y618 и обратный праймер TROP-2 человека) (pcDNA3.1-hmTROP-2-B-мус/His, pcDNA3.1-hmTROP-2-C-мус/His, pcDNA3.1-mhTROP-2-D-мус/His, pcDNA3.1-mhTROP-2-E-мус/His и pcDNA3.1-mhTROP-2-F-мус/His).

Установление линий клеток HEK293, которые конститутивно экспрессируют hTROP-2, химерные белки TROP-2-C человека/мышь и TROP-2-D мыши/человека

Каждый из описанных выше векторов экспрессии pcDNA3.1-hTROP-2-мус/His, pcDNA3.1-hmTROP-2-C-мус/His и pcDNA3.1-mhTROP-2-D-мус/His вводили в клетки HEK293. Селекцию осуществляли, используя антибиотик G418 (Calbiochem), и получали линии клеток HEK293, конститутивно экспрессирующие белок hTROP-2, химерный белок hmTROP-2-C и химерный белок mhTROP-2-D.

Идентифицировали связывающие области моноклональных анти-hTROP-2-антител K5-70, T5-86, K5-107, T6-4, T6-16 и K5-116-2-1, которые оказывали полезное действие в моделях лечения ксенотрансплантатов линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы PK-59. Сначала исследовали реактивность моноклональных анти-hTROP-2-антител, оказывающих полезное действие в случае клеток HEK293, которые конститутивно экспрессируют химерные белки hmTROP-2-C и mhTROP-2-D, в FACS-анализе (фигура 18). В результате было обнаружено, что антитела K5-70, K5-107, T5-86 и K5-116-2-1 взаимодействовали с hmTROP-2-C, но такие антитела не взаимодействовали с mhTROP-2-D. С

другой стороны, антитела Т6-4 и Т6-16 взаимодействовали с mhTROP-2-D, но они не взаимодействовали с hmTROP-2-C. На основании полученных результатов показано, что связывающая область каждого из антител К5-70, К5-107, Т5-84 и К5-116-2-1 ограничена областью в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 145 hTROP-2, и связывающая область каждого из антител Т6-4 и Т6-16 ограничена областью в диапазоне от аминокислоты в положении 146 до С-концевой области hTROP-2 (фигура 18).

Чтобы проанализировать связывающие области более подробно, получали векторы, используемые для экспрессии химерных белков hmTROP-2-A, hmTROP-2-B, mhTROP-2-E и mhTROP-2-F, и анализировали реактивность химерных белков по отношению к моноклональным анти-hTROP-2-антителам, оказывающим полезное действие (фигура 19). Каждый из вновь полученных векторов экспрессии, которые использовали для экспрессии химерных белков, вводили в клетки HEK293 и затем осуществляли FACS-анализ, используя клетки, которые временно экспрессировали химерные белки. Антитела К5-70, К5-107, Т5-86 и К5-116-2-1 взаимодействовали с hmTROP-2-A, но не взаимодействовали с mhTROP-2-B. Все 6 исследованных типов моноклональных антител взаимодействовали с hTROP-2. Полученные результаты ясно показывают, что связывающая область антител К5-70, К5-107, Т5-86 и К5-116-2-1 присутствует в области в диапазоне от N-конца до аминокислоты в положении 69 в hTROP-2. Кроме того, антитела Т6-4 и Т6-16 не взаимодействовали ни с mhTROP-2-E, ни с mhTROP-2-F. Такой результат свидетельствует о том, что такие антитела распознают область в диапазоне от аминокислоты в положении 146 до аминокислоты в положении 193 hTROP-2.

[Пример 20]

[Иммуногистохимия]

<Материалы/Способ>

Следующие матрицы нормальных тканей и тканей злокачественных опухолей использовали для иммуногистологического окрашивания.

Матрицы нормальных тканей человека:

Нормальные органы человека в двух повторах (№ в каталоге:

AB1, Super Bio Chips).

Нормальные ткани, более чем в одном пятне (№ в каталоге: A103(VI), ISU ABXIS).

Матрицы тканей злокачественных опухолей легкого:

Рак легкого человека-метастазы-нормальная ткань (№ в каталоге: CCA3, Super Bio Chips).

Ткань карциномы легкого человека с краевой тканью, коровая биопсия в 2 местах (№ в каталоге: OD-CT-RsLug03-002, Shanghai Outdo Biotech).

Матрица тканей злокачественных опухолей поджелудочной железы:

Ткани карциномы поджелудочной железы человека монопатологического типа из 60 случаев, коровая биопсия в 2 местах (№ в каталоге: OD-CT-DgPan03-001, Shanghai Outdo Biotech)

Матрицы тканей злокачественных опухолей печени:

Гепатоклеточная карцинома, степени I-III с контролями в виде нормальных тканей, матрицы тканей 63 случаев (№ в каталоге: CS03-01-002U, Cybrdi).

Ткань карциномы печени человека монопатологического типа из 30 случаев, коровая биопсия в 2 местах (№ в каталоге: OD-CT-DgLiv02-002, Shanghai Outdo Biotech).

Матрицы тканей злокачественных опухолей прямой и ободочной кишки:

Рак прямой и ободочной кишки человека (№ в каталоге: CD3, Super Bio Chips).

Карцинома ободочной кишки человека с краевой тканью, коровая биопсия в 2 местах (№ в каталоге: OD-CT-DgCol03-002, Shanghai Outdo Biotech).

Матрицы тканей метастазов в лимфатических узлах и метастазов в печени из злокачественной опухоли прямой и ободочной кишки:

Матрица тканей злокачественных опухолей ободочной и прямой кишки (ободочной кишки и прямой кишки) с совместимыми тканями метастазов в лимфатических узлах, 44 случая/99 коровых биопсий, стекла из испытаний (№ в каталоге: C0991t, Biomax us).

Матрица тканей злокачественных опухолей ободочной и прямой кишки (ободочной кишки и прямой кишки) с совместимыми тканями метастазов в лимфатических узлах и нормальными близлежащими тканями, 43 случая/99 коровых биопсий (№ в каталоге: CO992, Biomaх us).

Ткани злокачественных опухолей оболочной и прямой кишки метастазы в печени (№ в каталоге: A203(IV), ISU ABXIS).

Матрицы тканей злокачественных опухолей молочной железы:

Рак молочной железы человека-метастазы-нормальные ткани (№ в каталоге: CBA3, Super Bio Chips).

Карцинома молочной железы человека с краевой тканью, коровая биопсия в 2 местах (№ в каталоге: OD-CT-RpBre03-002, Shanghai Outdo Biotech)

Матрицы тканей злокачественных опухолей желудка:

Рак желудка человека (№ в каталоге: CQ1, Super Bio Chips)

Карцинома желудка человека с краевой тканью, коровая биопсия в 2 местах (№ в каталоге: OD-CT-DgStm03-002, Shanghai Outdo Biotech).

Матрица тканей злокачественных опухолей пищевода:

Рак пищевода человека (№ в каталоге: CR1, Super Bio Chips).

Карцинома пищевода человека с краевой тканью, коровые биопсии в 2 местах (№ в каталоге: OD-CT-DgEso03-002, Shanghai Outdo Biotech).

Матрица тканей злокачественной опухоли яичника:

Злокачественная опухоль яичника человека (№ в каталоге: CJ1, Super Bio Chips).

Матрица тканей злокачественных опухолей простаты:

Рак простаты человека-нормальные ткани (№ в каталоге: CA3, Super Bio Chips).

Матрица тканей злокачественных опухолей мочевого пузыря:

Карцинома мочевого пузыря/переходно-клеточная карцинома, степени I-III с матрицами нормальных тканей (№ в каталоге: CC12-01-001U, Cybrdi).

Информацию о пациентах и клиническую информацию, относящуюся к описанным выше матрицам тканей, получали из

листов с данными, прилагаемых к матрицам и на страницах отдельных компаний.

Способ иммуногистологического окрашивания

После окончания обработки по депарафинизации стекла с матрицами тканей, содержащими нормальные ткани и ткани злокачественных опухолей человека, подвергали протеазной обработке пепсином при 37°C в течение 5 минут. Затем использовали срезы для иммунологического окрашивания с применением моноклонального анти-hTROP-2-антитела. Цветную реакцию осуществляли, используя DAB (3,3'-диаминобензидин) в качестве субстрата, и затем в качестве контрастного окрашивания осуществляли окрашивание ядер, используя гематоксилин.

Более конкретно такие способы осуществляли следующим образом. Залитый в парафин срез подвергали обработке для депарафинизации и затем подвергали протеазной обработке пепсином (DAKO) при 37°C в течение 5 минут. После активации антигена срез обрабатывали при комнатной температуре в течение 20 минут, используя раствор, полученный добавлением раствора пероксида водорода к метанолу до конечной концентрации 0,3%, чтобы исключить активность эндогенной пероксидазы. Полученный продукт промывали PBS при комнатной температуре по 5 минут два раза и затем блокировали при комнатной температуре в течение 30 минут, используя раствор PBS, содержащий 1,5% нормальную сыворотку лошади (DAKO), так чтобы осуществить операцию блокирования неспецифического связывания в тканях. Затем полученный продукт подвергали взаимодействию с моноклональным анти-hTROP-2-антителом клона K5-63-17 (конечная концентрация: 10 мкг/мл), которое было разбавлено раствором PBS, содержащим 1,5% нормальной сыворотки лошади, при комнатной температуре в течение 1 часа и затем промывали PBS при комнатной температуре по 5 минут три раза. Затем подвергали взаимодействию с биотинилированным антителом против IgG мыши (Vector), которое было разбавлено в 200 раз раствором PBS, содержащим 1,5% нормальную сыворотку лошади, при комнатной температуре в течение 30 минут. Продукт реакции промывали PBS при комнатной

температуре по 5 минут три раза и реагент из набора Vectastain ABC kit (Vector) смешивали в соответствии с инструкциями, включенными в набор, получая комплекс ABC. Такой комплекс ABC подвергали взаимодействию при комнатной температуре в течение 30 минут. Продукт реакции промывали PBS при комнатной температуре по 5 минут три раза, и затем осуществляли развитие окраски, используя раствор простого красителя субстрата пероксидазы DAB Histofine (Nichirei Biosciences). После завершения развития окраски продукт реакции промывали деионизованной водой в течение 5 минут, и ядро красили раствором гематоксилина по Майеру (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Затем осуществляли дегидратирование спиртом с последующим пропитыванием ксиленом и заливали в Entellan New (Merck Japan).

<Результаты>

Экспрессия hTROP-2 в нормальных тканях человека

Картину экспрессии hTROP-2 в нормальных тканях человека анализировали, используя моноклональное анти-hTROP-2-антитело клона K5-63-17. Матрицу нормальных тканей человека (№ в каталоге: AB1, Super Bio Chips) депарафинизировали и затем подвергали гидрофильной обработке. Затем антиген активировали протеазой, пепсином и затем осуществляли иммунологическое окрашивание, используя моноклональное анти-hTROP-2-антитело клона K5-63-17 (фигура 20). В результате окрашивание наблюдали в коже, пищеводе, почке (коре и мозговом веществе), поджелудочной железе, простате, мочевом пузыре и миндалинах. Большинство окрашенных изображений было локализовано в клеточной мембране (фигура 20A, B, C, D, F, G и H), но экспрессию hTROP-2 частично наблюдали даже в цитоплазме (фигура 20E и H). С другой стороны, такое окрашивание не наблюдали в сердце, печени, желудке, тонком кишечнике, толстом кишечнике, скелетных мышцах, легком, селезенке, тимусе и тому подобном (фигура 20I и J).

Экспрессия hTROP-2 в тканях злокачественных опухолей человека

Чтобы исследовать экспрессию hTROP-2 (hTROP-2-позитивная

оценка) в тканях злокачественных опухолей человека, матрицы тканей злокачественных опухолей различных видов злокачественных опухолей человека иммунологически окрашивали, используя моноклональное анти-hTROP-2-антитело клона К5-63-17. Срез ткани, в котором 10% или больше злокачественных клеток были окрашены, определяли как hTROP-2-позитивный. Результаты окрашивания показаны в таблице 4.

Таблица 4

Ткани злокачественных опухолей	количество TROP-2-позитивных случаев/общее количество случаев	TROP-2-позитивная оценка (%)
Рак молочной железы	32/80	40
рак легкого	53/81	65,4
рак пищевода	69/90	76,7
Рак желудка	25/90	27,8
Рак ободочной кишки	29/178	16,3
Рак поджелудочной железы	26/62	41,9
Рак печени	7/92	7,61
рак мочевого пузыря	42/59	71,2
Рак простаты	35/38	92,1
Рак яичника	14/58	24,1

Типичные окрашенные изображения показаны на фигуре 21. Среди видов злокачественных опухолей, в которых была проанализирована экспрессия hTROP-2, рак простаты имел наиболее высокую позитивную оценку (92,1%), а также высокие позитивные оценки имели рак легкого (65,4%), рак пищевода (76,7%), рак мочевого пузыря (71,2%) и тому подобные. Рак печени имел наименьшую позитивную оценку (7,61%). На окрашенных изображениях было выявлено, что как и в случае с нормальными клетками, hTROP-2 в большом количестве был локализован в клеточной мембране, даже в случае злокачественных клеток (фиг. 21А-Ф, Н и I). Кроме того, в некоторых случаях hTROP-2 также был локализован в цитоплазме (фиг. 21А, В, Е и G).

hTROP-2-позитивная оценка злокачественной опухоли

поджелудочной железы составляла 41,9%. Анализировали взаимосвязь между такой hTROP-2-позитивной оценкой и степенью развития (степенью дифференцировки) злокачественной опухоли поджелудочной железы. В результате, hTROP-2 экспрессировался с высокой частотой в злокачественной опухоли поджелудочной железы с высокой степенью развития, а именно с низкой степенью дифференцировки (таблица 5).

Таблица 5

hTROP-2-позитивные пятна в случае рака поджелудочной железы
26/62 (41,94%)

Степень	-	+	Позитивная оценка	
I	8	0	0%	
I-II	5	0	0%	
II	19	21	52,5%	
II-III	4	5	55,6%	p<0,01
Итого	36	26		

[Пример 21]

[Противоопухолевая активность антитела K5-70 при однократном введении в моделях профилактики ксенотрансплантатов линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59]

Высокую противоопухолевую активность *in vivo* клона K5-70 (IgG2a мыши) наблюдали даже при однократном введении K5-70 в дозе 10 мг/кг массы тела в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59. В контрольной группе (IgG мыши, 10 мг/кг массы тела, N=3) образование опухолей наблюдали у всех особей, и объем опухолей на 28-ой день после трансплантации клеток (день 28) составлял 781,7±74,5 мм³. С другой стороны, в группе, в которой антитело K5-70 вводили только один раз в день трансплантации злокачественных клеток (день 1) (10 мг/кг массы тела, N = 3), объем опухолей на 28 день составлял 144,4±176,9 мм³ (P < 0,05 t-критерий Стьюдента), что соответствует проявлению активности,

ингибирующей рост опухолей на 81,5% (фигура 22А). Что касается массы опухолей, то масса опухолей в контрольной группе на 28 день составляла $0,59 \pm 0,06$ г. Напротив, масса опухолей в группе введения антитела клона К5-70 составляла $0,07 \pm 0,10$ г ($P < 0,01$ t-критерий Стьюдента), что соответствует проявлению ингибирующей активности, составляющей 88% (фигура 22В). Что касается объема опухолей и массы опухолей, то образование опухолей было полностью ингибировано у 2 из 3 особей в группе введения антитела К5-70 в дозе 10 мг/кг массы тела на введение (фигура 22С).

[Пример 22]

[Противоопухолевая активность моноклонального анти-hTROP-2-антитела в моделях лечения ксенотрансплантатов линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480]

Исследовали противоопухолевую активность каждого из моноклональных анти-hTROP-2-антител (клоны К5-70, К5-116-2-1 и Т6-16) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid 6-недельного возраста (день 1). Когда средний объем опухолей достигал 100 мм^3 , осуществляли деление на группы (день 7 или день 10). С 7 дня или 10 дня осуществляли внутрибрюшинное введение антитела с интервалами введения один раз каждые три дня. Противоопухолевую активность антитела клона К5-70 и противоопухолевые активности антитела клона К5-116-2-1 и антитела клона Т6-16 оценивали в независимых исследованиях по отдельности. В исследовании по оценке противоопухолевой активности антитела К5-70 объем опухолей в контрольной группе (IgG мыши (10 мг/кг массы тела), N=8) на 44-ый день после трансплантации злокачественных клеток (день 44) составлял $365,4 \pm 214,6 \text{ мм}^3$. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела К5-70 (10 мг/кг массы тела) составлял $27,4 \pm 29,4 \text{ мм}^3$ ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и таким образом, образование опухолей было значимо ингибировано в группе введения К5-70 (степень ингибирования: 92,5%) (фигура 23А). Что касается массы опухолей, то масса опухолей в

контрольной группе составляла $0,11 \pm 0,07$ г, тогда как масса опухолей в группе введения антитела K5-70 составляла $0,005 \pm 0,007$ (г) ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), что соответствует степени ингибирования 95,5% (фигура 23В). В частности, у двух из восьми особей мышей в группе введения антитела K5-70 образование опухолей было полностью ингибировано, и присутствие опухолей не подтверждалось.

В исследованиях по оценке противоопухолевых активностей антитела K5-116-2-1 и антитела T6-16, которые осуществляли по отдельности, объем опухолей в контрольной группе на 42 день составлял $713,8 \pm 354,5$ мм³ ($N = 8$). Напротив, объем опухолей в группе введения антитела K5-116-2-1 (10 мг/кг массы тела) составлял $188,9 \pm 97,4$ мм³ ($N = 8$, $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента) (фигура 24А), и объем опухолей в группе введения антитела T6-16 (10 мг/кг массы тела) составлял $292,8 \pm 199,7$ мм³ ($N = 8$, $P < 0,05$, t-критерий Стьюдента) (фигура 25А). Таким образом, в двух указанных выше группах введения наблюдали степени ингибирования 73,5% и 59,0%, соответственно. Что касается массы опухолей, то масса опухолей в контрольной группе составляла $0,39 \pm 0,19$ г. Напротив, масса опухолей в группе введения антитела K5-116-2-1 составляла $0,10 \pm 0,07$ г ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и масса опухолей в группе введения антитела T6-16 составляла $0,17 \pm 0,14$ г ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента). Таким образом, в двух указанных выше группах введения наблюдали и степени ингибирования 72,2% и 56,4%, соответственно (фигура 24В и фигура 25В).

[Пример 23]

[Зависимая от дозы противоопухолевая активность клона K5-70 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480]

Затем исследовали зависимость от дозы противоопухолевую активность антитела K5-70 с использованием моделей лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали в правый бок каждой самке мышей NOD-scid 6-недельного возраста. Через десять

дней после трансплантации (день 10), когда средний объем опухолей достигал 100 мм^3 , мышей делили на группы: контрольную группу (IgG мыши, группа введения 10 мг/кг массы тела, $N=8$, $104,4 \pm 17,6 \text{ мм}^3$), группу введения антитела K5-70 (1 мг/кг массы тела) ($N=8$, $104,3 \pm 16,1 \text{ мм}^3$), группу введения антитела K5-70 (5 мг/кг массы тела) ($N=8$, $104,6 \pm 15,9 \text{ мм}^3$) и группу введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела) ($N=8$, $104,8 \pm 14,9 \text{ мм}^3$). Затем осуществляли внутрибрюшинное введение с интервалами введения один раз каждые три дня. На 42 день объем опухолей в контрольной группе составлял $713,8 \pm 354,5 \text{ мм}^3$. С другой стороны, в группах введения антитела K5-70 наблюдали зависимость от дозы активности в ингибировании образования опухолей. То есть, объем опухолей в группе введения 1 мг/кг массы тела составлял $485,0 \pm 207,3 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: $32,1\%$), объем опухолей в группе введения 5 мг/кг массы тела составлял $339,5 \pm 253,2 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: $52,4\%$), и объем опухолей в группе введения 10 мг/кг массы тела составлял $355,4 \pm 202,8 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: $50,2\%$, $P < 0,05$, t -критерий Стьюдента) (фигура 26А). Подобным образом, что касается массы опухолей на 42 день, то масса опухолей в контрольной группе составляла $0,39 \pm 0,19 \text{ г}$. С другой стороны, масса опухолей в группе введения антитела K5-70 (1 мг/кг массы тела) составляла $0,24 \pm 0,11 \text{ г}$ (степень ингибирования: $37,8\%$), масса опухолей в группе введения 5 мг/кг массы тела составляла $0,17 \pm 0,14 \text{ г}$ (степень ингибирования: $55,8\%$, $P < 0,05$, t -критерий Стьюдента), и масса опухолей в группе введения 10 мг/кг массы тела составляла $0,20 \pm 0,13 \text{ г}$ (степень ингибирования: $47,1\%$). Таким образом, подтверждали зависимость от дозы противоопухолевую активность (фигура 26В).

[Пример 24]

[Анализ интервалов введения антитела K5-70 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480]

Затем, чтобы проанализировать оптимальные интервалы введения антитела K5-70, исследовали противоопухолевую активность клона K5-70 при его введении один раз в неделю (один

раз каждые 7 дней) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid 6-недельного возраста. Через десять дней после трансплантации (день 10), когда средний объем опухолей достигал 100 мм^3 , мышей делили на группы: контрольную группу (IgG мыши, 10 мг/кг массы тела, $N=8$, $104,42 \pm 15,1 \text{ мм}^3$) и группу введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела, $N=8$, $104,3 \pm 16,1 \text{ мм}^3$). Затем осуществляли внутрибрюшинное введение один раз каждые 7 дней. На 42 день объем опухолей в контрольной группе составлял $713,8 \pm 354,5 \text{ мм}^3$, тогда как объем опухолей в группе введения антитела K5-70 (вводили один раз в неделю) составлял $332,3 \pm 239,9 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 55%, $P < 0,05$, t-критерий Стьюдента) (фигура 27А). Кроме того, когда интервал введения увеличивали до одного раза каждые 10 дней и до одного раза каждые две недели, объем опухолей в контрольной группе на 39-ый день составлял $956,9 \pm 367,8 \text{ мм}^3$. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела K5-70 (вводили один раз каждые 10 дней) на 39 день составлял $525,4 \pm 180,6 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 45,1%, $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и объем опухолей в группе введения антитела K5-70 (вводили один раз каждые 2 недели) составлял $459,4 \pm 217,6 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 52,0%, $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента) (фигура 27В). В известном уровне техники (US 7420040 и US 7420041), когда антитела вводили в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы (ВхРС-3) в дозе 20 мг/кг массы тела, три раза в неделю (с интервалами введения 2 дня), антитела проявляли противоопухолевую активность со степенью ингибирования от 50% до 60%. Напротив, антитело K5-70 проявляло противоопухолевую активность, эквивалентную активностям, известным из предшествующего уровня техники, в дозе, составляющей половину от дозы, известной в предшествующем уровне техники (10 мг/кг массы тела), один раз каждые 2 недели (с интервалами введения 13 дней). Соответственно, стало очевидным, что антитело K5-70 проявляло

значимую противоопухолевую активность в суммарной дозе, составляющей, по меньшей мере, одну двенадцатую часть от доз, используемых в известном уровне техники.

[Пример 25]

[Зависимая от дозы противоопухолевая активность антитела Т6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480]

Затем исследовали зависимость от дозы противоопухолевую активность антитела Т6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid 6-недельного возраста. Через десять дней после трансплантации (день 10), когда средний объем опухолей достигал 100 мм^3 , мышей делили на группы: контрольную группу (IgG мыши, 10 мг/кг массы тела, N=8, $105,8 \pm 9,9 \text{ мм}^3$), группу введения антитела Т6-16 (1 мг/кг массы тела, N=8, $104,4 \pm 13,3 \text{ мм}^3$), группу введения антитела Т6-16 (5 мг/кг массы тела, N=8, $104,7 \pm 13,0 \text{ мм}^3$), и группу введения антитела Т6-16 (10 мг/кг массы тела, N=8, $104,8 \pm 12,4 \text{ мм}^3$). Затем осуществляли внутрибрюшинное введение с интервалами введения один раз каждые три дня. На 43 день объем опухолей в контрольной группе составлял $473,5 \pm 137,0 \text{ мм}^3$. С другой стороны, в группах введения антитела Т6-16 наблюдали зависимость от дозы активности в ингибировании образования опухолей. А именно, объем опухолей в группе введения 1 мг/кг массы тела составлял $397,9 \pm 97,5 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 16,0%), объем опухолей в группе введения 5 мг/кг массы тела составлял $195,9 \pm 89,7 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 58,7%, $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и объем опухолей в группе введения 10 мг/кг массы тела составлял $190,2 \pm 56,5 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 59,8 %, $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента) (фигура 28А). Подобным образом, что касается массы опухолей на 43-ий день, то масса опухолей в контрольной группе составляла $0,19 \pm 0,07 \text{ г}$. С другой стороны, масса опухолей в группе введения антитела Т6-16 (1 мг/кг массы тела) составляла

0,20±0,08 г, масса опухолей в группе введения антитела Т6-16 (5 мг/кг массы тела) составляла 0,08±0,04 г (степень ингибирования: 57,9%, $P<0,01$, t -критерий Стьюдента), и масса опухолей в группе введения антитела Т6-16 (10 мг/кг массы тела) составляла 0,09±0,04 г (степень ингибирования: 52,6%, $P<0,01$, t -критерий Стьюдента). Таким образом, была подтверждена зависимость от дозы противоопухолевая активность (фигура 28В).

[Пример 26]

[Анализ интервалов введения антитела Т6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480]

Затем, для того, чтобы проанализировать оптимальные интервалы введения антитела Т6-16, исследовали противоопухолевую активность клона Т6-16 при его введении с интервалами введения один раз в неделю (один раз каждые 7 дней) и один раз каждые 10 дней в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid 6-недельного возраста. Через десять дней после трансплантации (день 10), когда средний объем опухолей достигал 100 мм³, мышей делили на группы: контрольную группу (IgG мыши, 10 мг/кг массы тела, $N=8$, 105,8±9,9 мм³), группу введения антитела Т6-16 (один раз в неделю) (10 мг/кг массы тела, $N=8$, 105,0±11,6 мм³) и группу введения антитела Т6-16 (один раз каждые 10 дней) (10 мг/кг массы тела, $N=5$, 130,8±2,4 мм³). Затем начинали введение. На 43-ий день объем опухолей в контрольной группе составлял 473,5±137,0 мм³. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела Т6-16 (один раз в неделю) составлял 243,7 ± 65,3 мм³ (степень ингибирования: 48,5%, $P<0,01$, t -критерий Стьюдента), и объем опухолей в группе введения антитела Т6-16 (один раз каждые 10 дней) составлял 297,8±54,4 мм³ (степень ингибирования: 37,1%, $P<0,05$, t -критерий Стьюдента) (фигура 29). Как известно из уровня техники (US 7420040 и US 7420041), в том случае, когда антитела вводили в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток

злокачественной опухоли поджелудочной железы (ВхРС-3) в дозе 20 мг/кг массы тела три раза в неделю (с интервалами введения в 2 дня), антитела проявляли противоопухолевую активность со степенью ингибирования от 50% до 60%. В отличие от этого, антитело Т6-16 проявляло значимую противоопухолевую активность при его введении в дозе, составляющей половину от дозы, используемой в известном уровне техники и с частотой один раз каждые 10 дней (с интервалами введения в 9 дней). Соответственно, стало ясно, что антитело Т6-16 проявляло значимую противоопухолевую активность в суммарной дозе, составляющей, по меньшей мере, одну восьмую часть от дозы, используемой в известном уровне техники.

[Пример 27]

[Анализ противоопухолевой активности клона K5-70 в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли простаты человека DU-145]

Противоопухолевую активность клона K5-70 по отношению к злокачественной опухоли простаты человека оценивали в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием клеток DU-145 (банк клеток RIKEN, RCB2143). Клетки DU-145 (5×10^6 клеток) подкожно трансплантировали каждой из самок мышей nude 6-недельного возраста (Balb/c, nu/nu). День, когда осуществляли трансплантацию, считали днем 1. Мышей делили на группы: контрольную группу (IgG мыши) (N=8) и группу введения антитела K5-70 (N=8). Начиная с 1 дня антитело K-70 и контрольное антитело вводили мышам внутрибрюшинно с частотой один раз каждые 3 дня в дозе 10 мг/кг массы тела. На 40-ой день объем опухолей в контрольной группе составлял $368,2 \pm 307,8$ мм³. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела K5-70 составлял $30,6 \pm 29,6$ мм³ ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует об активности в ингибировании образования опухолей, составляющей примерно 90% (фигура 30А). Что касается массы опухолей, то наблюдали значимую противоопухолевую активность. Масса опухолей в контрольной группе на 40-ой день составляла $0,18 \pm 0,18$ г. Напротив, в группе введения антитела K5-70 опухоли исчезали у всех 8 особей мышей, и следовательно,

образование опухолей было полностью ингибировано (фигура 30B). На основании приведенных выше результатов стало очевидным, что моноклональное антитело против TROP-2 человека клона K5-70 проявляет сильную противоопухолевую активность даже по отношению к клеткам злокачественной опухоли простаты человека.

[Пример 28]

[Ингибирующая метастазы активность антитела K5-70 в модели метастазов печени с использованием линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59]

Метастазы злокачественных опухолей являются важным фактором, который влияет на клинический прогноз при лечении рака желудочно-кишечного тракта. Контроль метастазов является важной терапевтически значимой задачей. Если не только образование опухолей, но также и метастазы злокачественной опухоли в другие органы можно подавить при введении антитела, применяемого для терапии злокачественных опухолей, мишенью которого является TROP-2, то можно предполагать высокую клиническую ценность. Таким образом, такое свойство является желательным для терапевтического противоракового антитела.

Экспрессия TROP-2 была подтверждена во многих типах карцином. Сообщалось, что TROP-2, в частности, экспрессируется на высоком уровне в очагах метастазов (Br. J. Cancer (2008); 99: 1290-1295, Clin. Cancer Res. (2006); 12: 3057-3063, Mod. Pathol. (2008); 21: 186-191). Кроме того, также сообщалось, что в том случае, когда злокачественные клетки с введенным геном Trop-2 трансплантировали мышам nude посредством введения через селезенку или поджелудочную железу, частота метастазов печени возрастала (WO 2010/089782, Molecular Cancer (2010); 9: 253), и следовательно, сообщение свидетельствует о важности TROP-2 в процессе образования метастазов злокачественных опухолей. Однако в настоящее время нет сообщений, специально описывающих что антитело, мишенью которого является TROP-2, оказывает ингибирующее метастазы действие *in vivo*.

Моноклональное анти-hTROP-2-антитело мыши K5-70, которое раскрыто в настоящем изобретении, оказывает высокое терапевтическое действие в моделях ксенотрансплантатов,

полученных подкожной трансплантацией клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека. В анализе застарания царapiны, осуществляемом *in vitro*, было показано, что антитело K5-70 способно подавлять способность линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59 к миграции в дополнение к эффекту подавления роста злокачественных клеток. Таким образом, было высказано предположение, что антитело K5-70 может ингибировать метастазы злокачественных опухолей *in vivo*. Поэтому исследовали ингибирующее метастазы действие мышиногo моноклонального анти-hTROP-2-антитела, используя модели, в которых клетки PK-59 инъецировали в селезенку мышей nude, чтобы могли развиваться метастазы в печени.

За день до трансплантации злокачественных клеток мышей делили на группы. Затем мышам вводили внутривбрюшинно моноклональное анти-hTROP-2-антитело (K5-70) или контрольное антитело (очищенный IgG мыши) в дозе 10 мг/кг массы тела. На следующий день линию клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека (PK-59), эндогенно экспрессирующих hTROP-2, собирали обработкой трипсином и затем готовили суспензию клеток в PBS в концентрации 2×10^7 клеток/мл. Суспензию клеток хранили на льду до трансплантации. Каждую из самок мышей nude (Balb/c, nu/nu) 6- или 7- недельного возраста анестезировали внутривбрюшинным введением пентобарбитала и под анестезией вырезали 10-15 мм из левого бока. Вынимали селезенку из брюшной полости и затем 50 мкл клеточной суспензии (1×10^6 клеток) инъецировали в селезенку, используя шприц 27G. Через четыре минуты после инъекции клеток ворота селезенки зашивали шелковой хирургической нитью 5-0 и затем селезенку вырезали. Разрез брюшины зашивали шелковой хирургической нитью 4-0, и затем участок, на котором проводилась операция, закрывали, используя клипсы для ран (AUTOCLIP 9 мм, Becton Dickinson). Кроме того, через семь дней после трансплантации злокачественных клеток мышам вводили антитело K-70 и контрольное антитело в дозе 10 мг/кг массы тела. Через четыре-

шесть недель после трансплантации злокачественных клеток мышей подвергали эвтаназии цервикальной дислокацией. Затем вырезали печень из каждой мыши и проверяли наличие или отсутствие очагов метастазов.

В контрольной группе, в которой мышам вводили IgG мыши, у 4 из 6 мышей, которым были трансплантированы клетки РК-59, наблюдали явные очаги метастазов (от 2 до 7 очагов) по всей доли печени через четыре-шесть недель после трансплантации (фигура 31А, частота метастазов: 67%, таблица 6). Напротив, у четырех мышей в группе введения антитела К5-70, которым также были трансплантированы клетки РК-59, таких очагов метастазов в печени ни у одной мыши не наблюдали, и, следовательно, частота метастазов составляла 0% (фиг. 31В, таблица 6).

Таблица 6

Подавляющее метастазы действие клона К5-70 в моделях метастазов печени, полученных трансплантацией мышам nude через селезенку клеток РК-59

Группа введения	Недели после трансплантации	№ особи	Количество очагов метастазов	Определение метастазов
Контрольная группа	4 нед.	С-1	0	-
	4 нед.	С-2	5	++
	6 нед.	С-3	7	++
	6 нед.	С-4	7	++
	6 нед.	С-5	2	+
	6 нед.	С-6	0	-
Среднее количество очагов метастазов			3,5	Частота метастазов 67%
Группа введения К5-70	4 нед.	К-1	0	-
	6 нед.	К-2	0	-
	6 нед.	К-3	0	-
	6 нед.	К-4	0	-
Среднее количество очагов метастазов				Частота метастазов 0%

На основании полученных результатов стало очевидно, что анти-hTROP-2-антитело К5-70 оказывает чрезвычайно сильное ингибирующее действие на метастазы в печени линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-59.

[Пример 29]

[Противоопухолевая активность антитела K5-70 в моделях ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480, которые представляют собой модели рецидивирующих злокачественных опухолей после введения гидрохлорида иринотекана]

В последние годы было разработано много химиотерапевтических лекарственных средств для подавления роста злокачественных клеток в качестве лекарственных средств для терапии злокачественных опухолей. С использованием таких лекарственных средств были достигнуты определенные результаты лечения. Однако такие химиотерапевтические лекарственные средства создают проблемы в отношении побочных эффектов, ассоциированных с их подавляющим рост действием на нормальные клетки, отличные от злокачественных клеток, и с рецидивами злокачественной опухоли после прекращения лечения. Соответственно, если рецидивы опухолей после завершения лечения химиотерапевтическим лекарственным средством могут быть подавлены введением противоопухолевого терапевтического антитела, мишенью которого является TROP-2, то можно предположить высокую клиническую значимость такого антитела. Таким образом, такое свойство противоопухолевого терапевтического антитела является желательным.

В качестве терапевтического средства для лечения рака прямой и ободочной кишки в дополнение к 5-FU и содержащим платину лекарственным средствам, недавно в клинике применили гидрохлорид иринотекана (топотecin, Daiichi Sankyo Co., Ltd.), обладающий ингибирующим топоизомеразу действием. Что касается моделей на животных, то сообщалось о противоопухолевом действии гидрохлорида иринотекана в мышинных моделях, в которых были трансплантированы различные типы опухолевых клеток человека, включая злокачественную опухоль ободочной кишки в качестве типичного примера (Cancer Chemother. Pharmacol. (1991); 28(3): 192-8). Поэтому было исследовано предотвращающее рецидивы действие анти-hTROP-2-антитела клона K5-70 (IgG2a мыши) на рекуррентную опухоль после введения гидрохлорида иринотекана в

моделях ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в правый бок самкам мышей NOD-scid 8-недельного возраста. Через одиннадцать дней после трансплантации (день 11), когда средний объем опухолей достигал 100 мм^3 , мышей делили на группы: группу без обработки (группа введения физиологического раствора, $N = 8$, $130,7 \pm 16,2 \text{ мм}^3$) и группу введения гидрохлорида иринотекана (CPT-11, топотecin, Daiichi Sankyo Co., Ltd.) ($N = 16$, $123,0 \pm 21,4 \text{ мм}^3$). Затем мышам внутрибрюшинно вводили гидрохлорид иринотекана в дозе 40 мг/кг массы тела один раз каждые 3 дня, всего 3 раза (дни 11, 14 и 17). На третий день после последнего введения гидрохлорида иринотекана (день 20) объем опухолей в необработанной группе достигал $232,1 \pm 21,1 \text{ мм}^3$. С другой стороны, объем опухолей в группе введения гидрохлорида иринотекана составлял $126,6 \pm 26,6 \text{ мм}^3$ ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и следовательно, наблюдали явное подавляющее опухоли действие. На такой стадии группу введения гидрохлорида иринотекана делили на две группы на основе размера опухолей. Одну группу определяли как группу введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела, $N = 8$, объем опухолей на 20 день: $126,0 \pm 28,0 \text{ мм}^3$), а другую группу определяли как группу введения IgG мыши (10 мг/кг массы тела, $N = 8$, объем опухолей на 20 день: $127,2 \pm 27,0 \text{ мм}^3$). Внутрибрюшинное введение антител и измерение объема опухолей осуществляли в каждой группе один раз каждые 3 дня, так чтобы оценить рецидивы опухолей (фигура 32). В группе введения IgG мыши, начиная с 18-ого дня после последнего введения гидрохлорида иринотекана (день 35), наблюдали явные рецидивизирующие опухоли с объемом опухолей более 300 мм^3 . На 30-ый день после последнего введения гидрохлорида иринотекана (день 47), опухоли с объемом опухолей более 300 мм^3 наблюдали у 5 из 8 мышей (средний объем опухолей: $401,7 \pm 172,7 \text{ мм}^3$). Напротив, в группе введения антитела K5-70 рецидивы опухолей были значимо подавлены, и средний объем опухолей составлял $180,5 \pm 142,1 \text{ мм}^3$ ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента) (фигура 32). В частности, в группе введения антитела K5-70 объем опухолей на

47-ой день стал меньше, чем объем опухолей в тот момент, когда мышей делили на группы ($126,0 \pm 28,0 \text{ мм}^3$). Объем опухолей стал меньше 100 мм^3 у 4 из 8 мышей. На основании полученных результатов стало очевидно, что анти-hTROP-2-антитело K5-70 оказывает чрезвычайно сильное подавляющее действие на рецидивизирующие опухоли после введения гидрохлорида иринотекана.

[Пример 30]

[Картирование эпитопов с использованием методики CLIPS]

<Материалы и способы >

Синтез пептидов

15-мерные и 30-мерные линейные пептиды, происходящие из внеклеточных доменов TROP-2, которые использовали в настоящем эксперименте, получали твердофазным синтезом согласно способу на основе Fmoc (9-флуоренилметоксикарбонил). Кроме того, для анализа прерывистых эпитопов синтезировали 17-мерные пептиды, происходящие из внеклеточного домена TROP-2, к обоим концам которого добавляли остатки цистеинов, и реконструировали конформацию, имеющую одну или две петлевых структуры, с использованием методики CLIPS (Chemically Linked Peptides on Scaffolds, методики получения химически связанных пептидов на каркасах). В том случае если другой остаток цистеина присутствовал вблизи добавляемого остатка цистеина, его заменяли аланином.

Скрининг эпитопов в ELISA

5034 типа синтезированных пептидов ковалентно связывали с картами PEPSCAN (455 пептидов/карту), и затем анализировали связывание синтезированных пептидов с антителами способом ELISA. Обеспечивали возможность взаимодействия карт PEPSCAN с моноклональными антителами против TROP-2 человека (K5-70, K5-107, K5-116-2-1, T5-86 и T6-16), которые были разбавлены до концентрации 1 мкг/мл блокирующим буфером (фосфатный буфер, содержащий 4% сыворотки, 5% овальбумина и 1% твина). После промывки полученному продукту давали возможность взаимодействовать с разбавленным в 1000 раз комплексом пероксидаза-второе антитело при 25°C в течение 1 часа. После

промывки к реакционному раствору добавляли раствор субстрата (раствор, содержащий сульфонат 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолина (ABTS) и 2 мкл 3% раствора пероксида водорода), с последующей хромогенной реакцией в течение 1 часа. Связывающую активность антител количественно оценивали, фотографируя CCD-камерой и затем осуществляя анализ изображений.

<Результаты>

Моноклональные анти-hTROP-2-антитела K5-70, K5-107, K5-116-2-1, T5-86 и T6-16, которые оказывали полезное действие, подвергали эпитопному анализу с использованием методики CLIPS (методики химически связанных пептидов на каркасах). Необходимо отметить, что термин «номер аминокислоты» используют в настоящих примерах для обозначения номера аминокислоты в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:2 (белок hTROP-2 (323 аминокислотных остатка)).

Результат анализа антитела K5-70 показан в таблице 7 ниже. В результате было обнаружено, что 33 пептида проявляют высокую активность в связывании с антителом K5-70. В указанных 33 пептидах многократно обнаруживали последовательность, содержащую VCSPDGPGGRCQCRLGSGMAVD (номера аминокислот 43-65) (пептиды № 1-7 и 9, показанные в таблице 7), последовательность, содержащую HHILIDLRHRPTAG (номера аминокислот 152-165) (пептиды № 14, 22-24 и 28, показанные в таблице 7), последовательность, содержащую VHYEQPTIQIELRQ (номера аминокислот 193-206) (пептиды № 8, 10, 12, 13, 18, 20, 21, 23, 26, 28, 30 и 32, показанные в таблице 7) и последовательность, содержащую DLDAELRRLFRER (номера аминокислот 171-183) (пептиды № 11, 16, 18, 19, 21, 22, 29 и 31, показанные в таблице 7). В частности, антитело K5-70 сильно связывалось с последовательностью, содержащей VCSPDGPGGRCQCRLGSGMAVD. На основании полученных результатов было высказано предположение, что в белке hTROP-2 указанные выше 4 типа областей последовательностей пептидов вероятно являются эпитопами антитела K5-70.

Связывание антитела K5-70 с CLIPS-пептидами, полученными
из внеклеточных доменов TROP-2 человека

Таблица 7

Номер	Пептид	Связывание с K5-70
1	NKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCST	2742
2	TVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTLTS	2604
3	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCS	2562
4	MTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTLT	2402
5	KMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTL	1770
6	PTNNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDC	1391
7	VCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTLTSK	932
8	CAAVHYEQPTIQIELRCAAVHYEQPTIQIELRC	876
9	CPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVD	839
10	CVHYEQPTIQIELRQNCVHYEQPTIQIELRQNC	825
11	HSDLDALRRRLFRERCHSDLDALRRRLFRERC	725
12	RLFRERYRLHPKFVAAVHYEQPTIQIELRQ	687
13	AVHYEQPTIQIELRQ	642
14	CAGAFNHSDDLALRRCHHILDLRHRPTAGAC	624
15	CPKFVAAVHYEQPTIQCGDLRVGEPLQVERC	579
16	CHSDLDALRRRLFRERCGLDLRV	538
17	FQGRGGLDLRVGEPLQ	538
18	CVHYEQPTIQIELRQNCDLALRRRLFRERYRC	524
19	CHSDLDALRRRLFRERCGRGEPLQ	519
20	CTIQIELRQNTSQKAACVHYEQPTIQIELRQNC	513
21	CVHYEQPTIQIELRQNCCHSDLDALRRRLFRERC	511
22	CHHILDLRHRPTAGACHSDLDALRRRLFRERC	489
23	CHHILDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC	489
24	CHHILDLRHRPTAGACGLDLRVGEPLQVERC	488
25	CDAELRRRLFRERYRLHCDLVRTHHILDLRHC	483
26	CVHYEQPTIQIELRQNC	483
27	CAFNHSDDLALRRRLFCVHYEQPTIQIELRQNC	478
28	CVHYEQPTIQIELRQNCCHHILDLRHRPTAGAC	473
29	CDAELRRRLFRERYRLHCDLVRTHHILDLRHC	472
30	VHYEQPTIQIELRQNCGLDLRVGEPLQVERC	470
31	CDELVRTHHILDLRHCDDLALRRRLFRERC	469
32	AVHYEQPTIQIELRQCAVHYEQPTIQIELRQC	468
33	CHSDLDALRRRLFRERCDELVRTHHILDLRHC	466

Результат анализа антитела K5-107 показан в таблице 8 ниже. В результате было обнаружено, что последовательность, содержащая VCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVD (номера аминокислот 43-65) входила в состав 10 из 20 пептидов (пептиды № 1-6, 8, 9, 14 и 17, показанные в таблице 8) (таблица 8).

Соответственно, были получены свидетельства того, что в белке hTROP-2 указанная выше область пептидной последовательности, состоящая из VCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVD, может быть эпитопом антитела K5-107.

Таблица 8

**Связывание антитела K5-107 с CLIPS-пептидами, полученными
из внеклеточных доменов TROP-2 человека**

Номер	Пептид	Связывание с K5-107
1	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCS	2763
2	NKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCST	2761
3	KMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTL	2752
4	MTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTLT	2726
5	CPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVD	2723
6	TVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTLTS	2720
7	TCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAV	2716
8	VCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTLTSK	2689
9	CSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTLTSKC	2655
10	CTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMA	2655
11	NCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGM	2207
12	DNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSG	1816
13	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCS	1525
14	CTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTLTSKC	1118
15	QDNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGS	874
16	SPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDCSTLTSKCL	561
17	CTNKMTVCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVDASTC	380
18	TVCSPDGPGGRCQCR	312
19	CAPKNARTLVRPSEHACARTLVRPSEHALVDNC	284
20	HSDLAELRRLFRERCHSDLAELRRLFRERC	272

Результат анализа антитела K5-116-2-1 показан в таблице 9 ниже. В данном анализе три типа пептидных последовательностей, а именно, последовательность, содержащая VCSPDGPGGRCQCRAVGSGMAVD (номера аминокислот 43-65) (пептиды № 1-7, 15 и 25, показанные в таблице 9), последовательность, содержащая NHILIDLRHRPTAG (номера аминокислот 152-165) (пептиды № 8-11, 16, 17, 19, 20, 22-24 и 27-29, показанные в таблице 9) и последовательность, содержащая DLDAELRRLFRER (номера аминокислот 171-183) (пептиды № 11-14, 17, 19, 21, 23 и 29, показанные в таблице 9) встречались несколько раз (таблица 9). Соответственно, были получены свидетельства того, что в белке hTROP-2 три указанных типа областей пептидной последовательности могут быть эпитопами антитела K5-116-2-1.

Таблица 9

Связывание антитела K5-116-2-1 с CLIPS-пептидами, происходящими
из внеклеточных доменов TROP-2 человека

Номер	Пептид	Связывание с K5-116-2-1
1	TVCSPDGPGGRCQCRA LGSGMAVDCSTLTS	2672
2	NKMTVCSPDGPGGRCQCRA LGSGMAVDCST	2613
3	TNKMTVCSPDGPGGRCQCRA LGSGMAVDCS	2482
4	MTVCSPDGPGGRCQCRA LGSGMAVDCSTLT	2440
5	KMTVCSPDGPGGRCQCRA LGSGMAVDCSTL	2423
6	CPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRA LGSGMAVD	2136
7	PTNKMTVCSPDGPGGRCQCRA LGSGMAVDC	1723
8	CAGAFNHSDLD AELRRCHHILDLRHRPTAGAC	1643
9	CTHHILDLRHRPTAGC	1586
10	CVHYEQPTIQIELRQNC HHHILDLRHRPTAGAC	1504
11	CHHILDLRHRPTAGCHSDLD AELRRLFRERC	1475
12	HSDLD AELRRLFRERCHSDLD AELRRLFRERC	1467
13	CDAELRRLFRERYRLHCHSDLD AELRRLFRERC	1462
14	CDAELRRLFRERYRLHCPK	1442
15	VCSPDGPGGRCQCRA LGSGMAVDCSTLTSK	1432
16	DSLRCDELVRTHHILDLRHRPTAGAFNH	1421
17	CDELVRTHHILDLRHCDLD AELRRLFRERYRC	1392
18	CFQGRGGDLRVRGEP	1376
19	CDAELRRLFRERYRLHCDLVRTHHILDLRH	1366
20	CGLDLRVRGEPQVERCHHILDLRHRPTAGAC	1342
21	CHSDLD AELRRLFRERCHSDLD AELRRLFRERC	1331
22	CDELVRTHHILDLRHCHHILDLRHRPTAGAC	1323
23	CDAELRRLFRERYRLHCDLVRTHHILDLRH	1266
24	CHHILDLRHRPTAGACRGEPLQVERTLIYYLC	1229
25	CSPDGPGGRCQCRA	1227
26	CTVASPDGPGGRAQARACVHYEQPTIQIELRQNC	1223
27	CHHILDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC	1222
28	LSLRCDELVRTHHILDLRHRPTAGAFNH	1220
29	CDELVRTHHILDLRHCHSDLD AELRRLFRERC	1205

Результаты анализа антител T5-86 и T6-16 показаны в таблице 10 и таблице 11 ниже, соответственно. В указанных анализах антитела сильно связывались с пептидом, содержащим последовательность, состоящую из DPEGRFKARQCN (номера аминокислот 109-120). Указанная выше пептидная последовательность входила в состав 22 из 26 пептидов, связывающихся с антителом T5-86 (пептиды № 1-4, 6-8, 10-13, 15-19 и 21-26, показанные в таблице 10), и она входила в состав 4 из 26 пептидов, связывающихся с антителом T6-16 (пептиды № 1, 2, 9 и 13, показанные в таблице 11) (таблица 10 и таблица 11). Кроме того, в анализе, относящемся к антителу T5-86, несколько раз встречалась другая последовательность, отличная от последовательности, содержащий DPEGRFKARQCN (номера аминокислот 109-120), а именно, последовательность, содержащая VCSPDGPGGRCQCRA (номера аминокислот 43-57) (пептиды № 5, 14 и

20, показанные в таблице 10). Кроме того, в анализе, относящемся к антителу Т6-16, несколько раз обнаруживали другую последовательность, содержащую NHILIDLRHRPTAG (номера аминокислот 152-165) (пептиды № 4-8, 10-12, 19, 21, 23, 25 и 26, показанные в таблице 11). Соответственно, было получено свидетельство того, что в белке hTROP-2 два типа областей пептидной последовательности, а именно, DPEGRFKARQCN (номера аминокислот 109-120) и VCSPDGPGGRCQCRA (номера аминокислот 43-57), могут быть эпитопами антитела К5-86. Также было получено свидетельство того, что в белке hTROP-2 два типа областей пептидной последовательности, а именно, DPEGRFKARQCN (номера аминокислот 109-120) и NHILIDLRHRPTAG (номера аминокислот 152-165), могут быть эпитопами антитела Т6-16.

Таблица 10

Связывание антитела Т5-86 с CLIPS-пептидами, происходящими
из внеклеточных доменов TROP-2 человека

Номер	Пептид	Связывание с Т5-86
1	CYDPDADPEGRFKARQCADPEGRFKARQANQTC	2306
2	PDCDPEGRFKARQCN	2292
3	CADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC	2287
4	VCSPDGPGGRCQCRA	2263
5	CYDPDADPEGRFKARQCPDADPEGRFKARQANC	2260
6	CADPEGRFKARQANQCTDPDADPEGRFKARQC	2240
7	CADPEGRFKARQANQTCYDPDADPEGRFKARQC	2208
8	DCDPEGRFKARQCNQ	2150
9	CTVASPDGPGGRAQARCHSDLAELRRLFRERC	2086
10	CDADPEGRFKARQANQCDADPEGRFKARQANQC	2035
11	DGRFKARQANQTSVAWCARTLVRPSEHALVDNC	2019
12	DADPEGRFKARQANQCPDADPEGRFKARQANC	1980
13	CPDADPEGRFKARQANCPDADPEGRFKARQANC	1950
14	CSPDGPGGRCQCRA	1946
15	CEGRFKARQANQTSVACEGRFKARQANQTSVAC	1895
16	CTVASPDGPGGRAQARCPDADPEGRFKARQANC	1890
17	CGLYDPDADPEGRFKACPDADPEGRFKARQANC	1857
18	DPDCDPEGRFKARQCNQTSVCWCVNSVGVR	1850
19	CPEGRFKARQANQTSVCDELVRHHILIDLRHC	1841
20	CPDGPGGRAQARALGSCHSDLAELRRLFRERC	1830
21	CTLVRPSEHALVDNDGCGRFKARQANQTSVAWC	1820
22	CPDADPEGRFKARQANCYDPDADPEGRFKARQC	1795
23	CGLYDPDADPEGRFKACPEGRFKARQANQTSVC	1793
24	YDPDCDPEGRFKARQ	1775
25	CPDADPEGRFKARQANCADPEGRFKARQANQTC	1773
26	CDPEGRFKARQCNQT	1772

Таблица 11

Связывание антитела Т6-16 с CLIPS-пептидами, происходящими
из внеклеточных доменов TROP-2 человека

Номер	Пептид	Связывание с Т6-16
1	CVNSVGVRRTDKGDLSCPDADPEGRFKARQC	1072
2	CSVGVRRTDKGDLRLCYDPADPEGRFKARQC	786
3	HSDLDAELRRLFRERCHSDLDAELRRLFRERC	714
4	CDELVRTHHILIDLRHCDLDAELRRLFRERYRC	713
5	CVNSVGVRRTDKGDLRLCDELVRTHHILI	688
6	VRRTDKGDLRLCDELVRTHHILIDLRHRP	670
7	CVERTLIYYLDEIPPKCHHILIDLRHRPTAGAC	626
8	CHHILIDLRHRPTAGACHSDLDAELRRLFRERC	620
9	CVNSVGVRRTDKGDLSCPDADPEGRFKARQANC	611
10	CVHYEQPTIQIELRQNCCHHILIDLRHRPTAGAC	602
11	VGVRRTDKGDLRLCDELVRTHHILIDLRH	601
12	CAGAFNHSDLDAELRRCHHILIDLRHRPTAGAC	592
13	CSVGVRRTDKGDLRLCPDADPEGRFKARQANC	585
14	CVRPSEHALVDNDGLYCSVGVRRTDKGDLRLC	573
15	CDAELRRLFRERYRLHCHSDLDAELRRLFRERC	566
16	CSVGVRRTDKGDLRLCNDGLYDPDADPEGRFC	559
17	CVNSVGVRRTDKGDLSCGLYDPDADPEGRFKAC	553
18	CDLDAELRRLFRERYRCHSDLDAELRRLFRERC	534
19	CDELVRTHHILIDLRHCHHILIDLRHRPTAGAC	534
20	CAGAFNHSDLDAELRRCDLDAELRRLFRERYRC	529
21	CDAELRRLFRERYRLHCDLVRTHHILIDLRHC	527
22	CVHYEQPTIQIELRQNCDLDAELRRLFRERYRC	526
23	CHHILIDLRHRPTAGACVHYEQPTIQIELRQNC	524
24	CGVRRTDKGDLRLRADCGVRRTDKGDLRLRADC	524
25	CGLDLRVRGEPLQVERCHHILIDLRHRPTAGAC	521
26	CDLDAELRRLFRERYRCDELVRTHHILIDLRHC	516

[Пример 31]

[Секвенирование переменных областей генов антител для
анти-hTROP-2-антител мыши (клоны K5-70, K5-107, K5-116-2-1 и
T6-16)]

Суммарную РНК экстрагировали из 3×10^6 гибридом, продуцирующих моноклональные мышинные анти-TROP-2-антитела, используя реагент триазол (Invitrogen). Что касается клона K5-70, клона K5-107 и клона K5-116-2-1, то кДНК синтезировали, используя набор для амплификации кДНК SMARTer™ RACE (Clontech), согласно способу, описание которого прилагается к набору, используя праймер, специфичный для Н-цепи IgG мыши (5'-TCCAAGTTCCA-3' (SEQ ID NO:24)) и праймер, специфичный для L-цепи IgG мыши (5'-GCTGTCCTGATC-3' (SEQ ID NO:25)). Что касается клона T6-16, то кДНК синтезировали, используя набор GeneRacer (Invitrogen), согласно способу, описание которого прилагается к набору, используя олиго-dT-праймер. Каждый из генов, кодирующих

вариабельные области (VH, VL) Н- и L-цепей клона K5-70 (IgG2a мыши), клона K5-107 (IgG1 мыши) и клона K5-116-2-1 (IgG2a мыши), клонировали способом ПЦР, используя синтезированную, как описано выше, кДНК в качестве матрицы. В данном способе 10х смесь универсальных праймеров А (UPM), включенную в набор для амплификации кДНК SMARTer™ RACE, использовали в качестве 5'-праймера. С другой стороны, в качестве 3'-праймера для амплификации VH использовали праймер, имеющий последовательность, специфичную для Н-цепи IgG мыши, а в качестве 3'-праймера для амплификации VL использовали праймер, имеющий последовательность, специфичную для L-цепи IgG мыши.

5'-Праймер (10х смесь универсальных праймеров А (UPM)):

Длинный (0,4 мкМ)

5'-СТААТАСГАСТКАСТАТАГГГКААГКАГТГГТАТКААККАГКАГТ-3' (SEQ ID NO:26)

Короткий (2 мкМ)

5'-СТААТАСГАСТКАСТАТАГГГК-3' (SEQ ID NO:27)

3'-Праймер (R-праймер):

VH: 5'-GGGAARTARCCCTTGACCAGGCA-3' (SEQ ID NO:28)

5'-GGGAARTAGCCTTTGACAAGGCA-3' (SEQ ID NO:29)

VL: 5'-CACTGCCATCAATVCTCCACTTGACA-3' (SEQ ID NO:30)

Используя каждый из описанных выше праймеров, осуществляли ПЦР с использованием следующего состава реакционного раствора и условий реакции. Кроме того, R-праймер для амплификации кДНК VH получали смешиванием двух указанных выше последовательностей друг с другом в эквимольном соотношении и затем использовали.

<Состав реакционного раствора >

Матричная кДНК:	2,5 мкл
5 × буфер PrimeSTAR (Mg ²⁺ плюс):	10 мкл
2,5 мм dNTP:	4 мкл
ДНК-полимераза PrimeSTAR HS (2,5 ед./мкл):	0,5 мкл
10 × смесь универсальных праймеров А (UPM):	5 мкл
R-праймер (10 мкМ):	1 мкл
<u>Стерилизованная вода:</u>	<u>27 мкл</u>
Всего:	50 мкл

<Условия реакции >

Реакцию осуществляли при 94°C (10 секунд), и затем осуществляли цикл, состоящий из «тепловой денатурации/диссоциации при 98°C (10 секунд) → отжига при 60°C (5 секунд) → синтеза/элонгации при 72°C (60 секунд)», всего 30 раз. Наконец осуществляли реакцию при 72°C (3 минуты).

Синтезированные кДНК VH и VL субклонировали в векторе pMD20-T (Takara Bio Inc.) и определяли нуклеотидные последовательности. Нуклеотидные последовательности множества клонов VH и клонов VL расшифровывали и идентифицировали нуклеотидные последовательности, специфичные для переменных областей H-цепи и L-цепи мыши. На фигуре 33 и фигуре 34 показаны консенсусные нуклеотидные последовательности кДНК VH и VL K5-70 и предполагаемые аминокислотные последовательности. На фигуре 35 и фигуре 36 показаны консенсусные нуклеотидные последовательности кДНК VH и VL K5-107 и предполагаемые аминокислотные последовательности. На фигуре 37 и фигуре 38 показаны консенсусные нуклеотидные последовательности кДНК VH и VL K5-116-2-1 и предполагаемые аминокислотные последовательности.

Гены, кодирующие переменные области (VH, VL) H- и L-цепей клона T6-16, клонировали способом ПЦР, используя синтезированную, как описано выше, кДНК в качестве матрицы. В данном способе в качестве 5'-праймера использовали праймер, включенный в набор GeneRacer. С другой стороны, в качестве 3'-праймера для амплификации VH использовали праймер, имеющий последовательность, специфичную для H-цепи IgG мыши, и в качестве 3'-праймера для амплификации VL использовали праймер, имеющий последовательность, специфичную для L-цепи IgG мыши.

5'-Праймер (F-праймер):

5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3' (SEQ ID NO:31)

3'-Праймер (R-праймер):

VH: 5'-GCCAGTGGATAGACAGATGG-3' (SEQ ID NO:32)

VL: 5'-GATGGATACAGTTGGTGCAGC-3' (SEQ ID NO:33)

Используя каждый из описанных выше праймеров, осуществляли ПЦР

с использованием следующего состава реакционного раствора и условий реакции.

<Состав реакционного раствора >

Матричная кДНК:	1,0 мкл
5 × буфер PrimeSTAR (Mg ²⁺ плюс):	10 мкл
2,5 мм dNTP:	4 мкл
ДНК-полимераза PrimeSTAR HS (2,5 ед./мкл):	0,5 мкл
Ф-праймер (10 мкМ):	3 мкл
Р-праймер (10 мкМ):	1,0 мкл
<u>Стерилизованная вода:</u>	<u>30,5 мкл</u>
Всего:	50 мкл

<Условия реакции >

Осуществляли цикл, состоящий из «тепловой денатурации/диссоциации при 98°C (10 секунд) → отжига при 57°C (10 секунд) → синтеза/элонгации при 72°C (60 секунд)», всего 35 раз.

Синтезированные кДНК VH и VL субклонировали в векторе pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) и определяли их нуклеотидные последовательности. Нуклеотидные последовательности множества клонов VH и клонов VL расшифровывали и идентифицировали нуклеотидные последовательности, специфичные для переменных областей Н-цепи и L-цепи мыши. На фигуре 39 и фигуре 40 показаны консенсусные нуклеотидные последовательности кДНК VH и VL T6-16 и предполагаемые аминокислотные последовательности.

[Пример 32]

[Конструирование гуманизированного антитела K5-70]

Гуманизацию переменных областей (VH, VL) антитела K5-70, полученных, как описано в предыдущих примерах, осуществляли следующим образом согласно способу Queen с соавторами (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033, 1989). Сначала осуществляли молекулярное моделирование трехмерной структуры каждой переменной области антитела K5-70, используя компьютер. Затем проводили поиск гомологии с последовательностями переменных областей генов антител человека. В результате последовательность кДНК (DA980102 VH) с

номером доступа в GenBank DA980102 была выбрана в качестве акцептора, который обеспечивает каркасную область (FR), необходимую для гуманизации VH K5-70 (Genome Res. 16: 55-65, 2006). Подобным образом последовательность кДНК (L41174 VL) с номером доступа в GenBank L41174 была выбрана в качестве акцептора, который обеспечивает каркасную область (FR), необходимую для гуманизации VL K5-70 (J. Biol. Chem. 270: 12457-12465, 1995).

Для гуманизации VH K5-70 последовательность CDR VH K5-70 заменяли соответствующим положением VH DA980102, используемой в качестве акцептора. В результате анализа трехмерной структуры согласно компьютерному моделированию, проводимого в отношении аминокислотных остатков (изолейцина (I) в положении 48, лизина (K) в положении 66, аланина (A) в положении 67, валина (V) в положении 71 и треонина (T) в положении 93), которые располагаются рядом с CDR VH K5-70 и которые, как полагают, играют важные роли в поддержании структуры, такие остатки в VH K5-70 сохраняли, а остальную FR-область заменяли акцепторной последовательностью. Номера положений аминокислотных остатков в VH и VL использовали согласно определениям Kabat с соавторами (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991).

Кроме того, метионин (M) в качестве аминокислотного остатка в положении 82 акцепторной последовательности VH DA980102 с большой вероятностью является специальным аминокислотным остатком, вызванным соматическим гипермутированием. Таким образом, чтобы снизить потенциальную антигенность, указанный выше метионин заменяли лейцином (L), который наиболее распространен в качестве аминокислотного остатка в положении 82. Выравнивание аминокислотных последовательностей сконструированной таким образом гуманизированной VH K5-70 (HuK5-70 VH), VH K5-70 и VH DA980102 показано на фигуре 41.

Что касается конструирования гуманизированной VL K5-70, то осуществляли такую же трансплантацию последовательности CDR,

как описано выше. В качестве аминокислотного остатка (лизин (K) в положении 49), важного для поддержания структуры CDR, такой остаток VL K5-70 сохраняли, а остальную FR-область заменяли акцепторной последовательностью (HuK5-70 VL). Выравнивание аминокислотных последовательностей VL HuK5-70, VL K5-70 и VL L41174 показано на фигуре 42.

[Пример 33]

[Конструирование гуманизированного антитела T6-16]

Гуманизация переменных областей (VH, VL) антитела T6-16, полученного, как описано в предыдущих примерах, осуществляли следующим образом согласно способу Queen с соавторами (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033, 1989). Сначала осуществляли молекулярное моделирование трехмерной структуры каждой переменной области антитела T6-16, используя компьютер. Затем проводили поиск гомологии с последовательностями переменных областей генов антител человека. В результате последовательность кДНК (DA935238 VH) с номером доступа в GenBank DA935238 была выбрана в качестве акцептора, который обеспечивает каркасную область (FR), необходимую для гуманизации VH T6-16 (Genome Res. 16: 55-65, 2006). Подобным образом последовательность кДНК (M99608 VL) с номером доступа в GenBank M99608 была выбрана в качестве акцептора, который обеспечивает каркасную область (FR), необходимую для гуманизации VL T6-16 (J. Immunol. 149: 2518-2529, 1992).

Для гуманизации VH T6-16 последовательность CDR VH T6-16 заменяли соответствующим положением VH DA935238, используемой в качестве акцептора. В результате анализа трехмерной структуры согласно компьютерному моделированию, проводимого в отношении аминокислотных остатков (изолейцина (I) в положении 48, аланина (A) в положении 67 и лизина (K) в положении 73), которые располагаются рядом с CDR VH T6-16 и которые, как полагают, играют важные роли в поддержании структуры, такие остатки в VH T6-16 сохраняли, а остальную FR-область заменяли акцепторной последовательностью (HuT6-16 VH1). Кроме того, остаток лизина (K) в положении 73 вероятно не оказывает влияния на

соответствующее образование антигенсвязывающего участка, и поэтому отдельно конструировали аминокислотную последовательность, в которой остаток лизина VH1 HuT6-16 заменяли треонином (Т), как более часто встречающимся аминокислотным остатком (HuT6-16 VH2). Выравнивание аминокислотных последовательностей сконструированной таким образом гуманизированной VH T6-16 (HuT6-16 VH1 и HuT6-16 VH2), VH T6-16 и VH DA935238 показаны на фиг. 43.

Что касается конструирования гуманизированной VL T6-16, то осуществляли такую же трансплантацию последовательности CDR, как описано выше. Аминокислотные остатки, важные для поддержания структуры CDR, также сохраняли в акцепторной последовательности, и в качестве последовательности FR использовали такую же последовательность, как и последовательность акцептора (HuT6-16 VL). Выравнивание аминокислотных последовательностей VL HuT6-16, VL T6-16 и VL L41174 показаны на фиг. 44.

[Пример 34]

[Синтез генов гуманизированных VH и VL K5-70]

Гены, кодирующие VH HuK5-70 и VL HuK5-70, получали следующим образом. Гены синтезировали на основе аминокислотной последовательности, в которой последовательность сигнального пептида, полученная из VH или VL K5-70 была добавлена с N-концевой стороны каждой из сконструированных, как описано выше, VH и VL HuK5-70 (Operon). При выполнении указанного способа синтеза генов последовательность Козака (ACC ACC) добавляли с 5'-концевой стороны от последовательности гена каждой из синтезируемых VH HuK5-70 и VL HuK5-70. Кроме того, добавляли сайт EcoRI (GAA TTC) в качестве сайта фермента рестрикции к 5'-концу VH HuK5-70, и сайт NheI (GCT AGC) добавляли к его 3'-концу. Подобным образом, сайт AgeI (ACC GGT) добавляли в качестве сайта фермента рестрикции к 5'-концу VL HuK5-70, и сайт BsiWI (CGT ACG) добавляли к его 3'-концу. Синтезированный ген VH HuK5-70 и ген VL HuK5-70 включали в вектор pCR2.1 (Invitrogen) согласно ТА-клонированию. Последовательности генов VH и VL HuK5-70, полученные в результате синтеза генов показаны

на фиг. 45 и 46, соответственно.

[Пример 35]

[Синтез гуманизированных генов VH1 T6-16, VH2 T6-16 и VL T6-16]

Гены, кодирующие VH1 HuT6-16, VH2 HuT6-16 и VL HuT6-16, получали следующим образом. Гены синтезировали на основе аминокислотной последовательности, в которой последовательность сигнального пептида, полученная из VH T6-16, была добавлена с N-концевой стороны от каждой из сконструированных, как описано выше VH1 HuT6-16 и VH2 HuT6-16, и аминокислотной последовательности, в которой последовательность сигнального пептида, полученная из VL T6-16, была добавлена с N-концевой стороны VL HuT6-16 (Operon). При выполнении указанного способа синтеза генов последовательность Козака (ACC ACC) добавляли с 5'-концевой стороны от последовательности гена каждой из синтезируемых VH1 HuT6-16 и VH2 HuT6-16 и VL HuT6-16. Кроме того, добавляли сайт EcoRI (GAA TTC) в качестве сайта фермента рестрикции к 5'-концу каждого из VH1 HuT6-16 и VH2 HuT6-16, и сайт NheI (GCT AGC) добавляли к их 3'-концу. Подобным образом, сайт AgeI (ACC GGT) добавляли в качестве сайта фермента рестрикции к 5'-концу гуманизированного VL T6-16, и сайт BsiWI (CGT ACG) добавляли к его 3'-концу. Синтезированный ген VH1 HuT6-16, ген VH2 HuT6-16 и ген VL HuT6-16 включали в вектор pCR2.1 (Invitrogen) согласно ТА-клонированию.

Последовательности генов VH1 HuT6-16, VH2 HuT6-16 и VL HuT6-16, полученные в результате синтеза генов, показаны на фиг. 47-49, соответственно.

[Пример 36]

[Конструирование экспрессирующих гены векторов для гуманизированных генов VH и VL K5-70]

Гены VH и VL HuK5-70, каждый из которых был включен в вектор pCR2.1 (Invitrogen), расщепляли ферментами рестрикции EcoRI и NheI, и AgeI и BsiWI, соответственно, и затем фрагменты генов извлекали. Затем отщепленный ген VH HuK5-70 встраивали в EcoRI/NheI-сайт вектора pFUSE-CHlg-hG1 (InvivoGen) в качестве вектора экспрессии клеток животных для экспрессии формы IgG1

человека (pFUSE-CHlg-HuK5-70), тогда как ген VL HuK5-70 встраивали в AgeI/BsiWI-сайт вектора pFUSE2-CLlg-hk (InvivoGen) в качестве вектора экспрессии формы Igк человека (pFUSE2-CLlg-HuK5-70). Таким образом получали каждую из конструкций.

[Пример 37]

[Конструирование экспрессирующих гены векторов для гуманизированных генов VH1 T6-16, VH2 T6-16 и VL T6-16]

Гены VH1 T6-16 и VH2 T6-16, каждый из которых был включен в вектор pCR2.1 (Invitrogen), отщепляли ферментами рестрикции EcoRI и NheI, и ген VL T6-16 отщепляли ферментами рестрикции AgeI и BsiWI. Затем генные фрагменты извлекали. Затем отщепленный ген VH1 T6-16 VH1 встраивали в EcoRI/NheI-сайт вектора pFUSE-CHlg-hG1 (InvivoGen) (pFUSE-CHlg-HuT6-16-1), и ген VH2 T6-16 также встраивали в EcoRI/NheI-сайт вектора pFUSE-CHlg-hG1 (pFUSE-CHlg-HuT6-16-2). Ген VL T6-16 VL встраивали в AgeI/BsiWI-сайт вектора pFUSE2-CLlg-hk (InvivoGen) (pFUSE2-CLlg-HuT6-16). Таким образом получали каждую из конструкций.

[Пример 38]

[Получение линии клеток 293F, способной стабильно экспрессировать антитело HuK5-70, антитело HuT6-16-1 и антитело HuT6-16-2]

Клетки 293F (Invitrogen) поддерживали и культивировали в среде для экспрессии FreeStyle 293 (Invitrogen). Гены вводили в клетки 293F, используя реагент фектин 293 (Invitrogen), согласно протоколам, прилагаемым к набору. То есть, pFUSE-CHlg-HuK5-70 и pFUSE2-CLlg-HuK5-70 вводили в клетки 293F и затем осуществляли селекцию на лекарственном средстве, используя зеоцин (InvivoGen) и бластицидин (InvivoGen), с тем, чтобы получить линию клеток, способную экспрессировать антитело HuK5-70. Также pFUSE-CHlg-HuT6-16-1 и pFUSE2-CLlg-HuT6-16 вводили в клетки 293F и затем проводили селекцию на указанных выше лекарственных средствах с тем, чтобы получить линию клеток, способных стабильно экспрессировать антитело HuT6-16-1. Также pFUSE-CHlg-HuT6-16-2 и pFUSE2-CLlg-HuT6-16 вводили в клетки 293F и затем проводили селекцию на указанных выше лекарственных

средствах с тем, чтобы получить линию клеток, способных стабильно экспрессировать антитело HuT6-16-2.

[Пример 39]

[Очистка белков антитела HuK5-70, антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2]

Каждую из полученных линий клеток, экспрессирующих антитела, инокулировали в среду для экспрессии FreeStyle 293 (Invitrogen) при плотности клеток $1-2,5 \times 10^5$ клеток/мл и затем осуществляли культивирование во вращающихся флаконах в течение 6-8 дней. Затем извлекали надосадок культуры и затем каждое из гуманизированных антител очищали, используя колонки с рекомбинантным белком А-сефарозой Fast Flow (GE Healthcare), согласно обычному способу.

На фигуре 50 показаны результаты, полученные при подтверждении с использованием Вестерн-блоттинга экспрессии каждого белка гуманизированного антитела в надосадке культуре клеток 293F, в которых экспрессировались антитело HuK5-70, антитело HuT6-16-1 и антитело HuT6-16-2. В частности, после осуществления электрофореза в SDS-ПААГ, каждый белок переносили на PVDF-мембрану (Immobilon-P, Millipore, IPVH00010). Мембрану блокировали при комнатной температуре в течение 30 минут с использованием буфера TBS (забуференный трисом физиологический раствор), содержащего 5% обезжиренное молоко. Полученный продукт промывали 0,1% TBST (TBS, содержащий 0,1% твина 20) в течение 5 минут три раза и затем давали возможность взаимодействовать с первым антителом.

На дорожке 1 показан надосадок культуры клеток 293F, в которые не было введено генов (негативный контроль), и дорожка 2 показывает надосадок культуры клеток 293F, в которые были введены pFUSE-CHlg-HuK5-70 и pFUSE2-CLlg-HuK5-70. Для выявления белков тяжелой цепи и легкой цепи антитела HuK5-70 использовали меченое биотином антитело против $F(ab')^2$ IgG человека (Rockland). На дорожке 3 показан надосадок культуры клеток 293F, в которые были введены pFUSE-CHlg-HuT6-16-1 и pFUSE2-CLlg-HuT6-16, и дорожка 4 показывает надосадок культуры клеток

293F, в которые были введены pFUSE-CHlg-HuT6-16-2 и pFUSE2-CLlg-HuT6-16. Белки тяжелой цепи антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 выявляли с использованием меченого биотином антитела против Fc IgG человека (Rockland), тогда как белки легкой цепи антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 выявляли с использованием меченого биотином антитела против F(ab')² IgG человека (Rockland).

В результате в случае антитела HuK5-70, антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 экспрессию белков тяжелой цепи и легкой цепи подтверждали в каждом надосадке культуры.

Кроме того, на фигуре 51 показаны результаты, полученные при загрузке очищенного антитела HuK5-70, антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 на SDS-ПААГ и затем окрашивании их СВВ. Во всех случаях тяжелая цепь с молекулярной массой примерно 50 кД и легкая цепь примерно 25 кД были выявлены в восстанавливающих условиях, и полосы были подтверждены в таких же положениях, как и в случае тяжелой цепи и легкой цепи, выявленных описанным выше Вестерн-блоттингом. На основании полученных результатов было подтверждено, что были образованы белок антитела HuK5-70, белок антитела HuT6-16-1 и белок антитела HuT6-16-2.

[Пример 40]

[Аффинность гуманизированного антитела K5-70 (HuK5-70) и гуманизированных антител T6-16 (HuT6-16-1 и HuT6-16-2) по отношению к антигену]

Аффинность по отношению к антигену очищенного антитела HuK5-70, антитела HuT6-16-1 и антитела HuT6-16-2 исследовали способами с использованием FACS и ELISA.

FACS осуществляли, используя клетки HEK293-hTROP-2, в которых полноразмерный ген TROP-2 человека стабильно экспрессировался в клетках HEK293, линию клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы PK-59, которые эндогенно экспрессировали белок TROP-2 человека на клеточной поверхности. 100 мкл раствора антитела, используемого в качестве первого антитела, которое было разбавлено до 1 мкг/мл средой, содержащей 10% FCS, добавляли к суспензии (5×10^5 клеток)

клеток (клетки HEK293-hTROP-2 или клетки PK-59), которые были извлечены из культуральной чашки обработкой трипсином, и затем полученную смесь инкубировали при 4°C в течение 20 минут. Затем промывали 1 мл среды, содержащей 10% FCS. Затем к полученной смеси добавляли второе антитело (по 100 мкл), которое представляло собой меченое фикоэритрином (PE)-меченое антитело против IgG мыши (BD Pharmingen) или меченое биотином антитело против Fc IgG человека (Rockland), разбавленное до 200 раз или 2000 раз, соответственно. Полученную смесь инкубировали при 4°C в течение 20 минут и затем снова промывали 1 мл среды, содержащей 10% FCS. В том случае, когда в качестве второго антитела использовали меченое биотином антитело против Fc IgG человека, 100 мкл раствора для мечения, в котором меченый стрептавидином PE (BD Pharmingen) был разбавлен до 400 раз, добавляли в качестве флуоресцирующего реагента для мечения. Затем полученную смесь инкубировали при 4°C в течение 20 минут и затем промывали 1 мл среды, содержащей 10% FCS. Затем образец, содержащий меченые клетки, суспендировали в 1 мл PBS, содержащего 1% FCS и 2 мм EDTA, и затем полученную суспензию анализировали, используя FACSCalibur (Becton Dickinson). В результате было обнаружено, что антитело HuK5-70 проявляло реактивность, эквивалентную реактивности мышинового антитела K5-70, как в клетках HEK293-hTROP-2, так и в клетках PK-59. Подобным образом, антитело HuT6-16-1 и антитело HuT6-16-2 проявляли реактивность, эквивалентную реактивности антитела T6-16 (фиг. 52).

Кроме того, также исследовали аффинность по отношению к антигену способом ELISA. ELISA осуществляли, используя планшет для ELISA, который покрывали рекомбинантным белком внеклеточной области hTROP-2, как описано в примере 3. В частности, 96-луночный планшет (BD FALCON) покрывали 50 мкл/лунку рекомбинантного белка внеклеточной области hTROP-2, который был разбавлен в PBS до 0,5 мкг/мл (при 4°C в течение ночи). Затем полученный планшет промывали буфером для промывки (PBS, содержащий 0,05% твина 20) и затем в него добавляли блокирующий

буфер (PBS, содержащий 2% обезжиренное молоко и 0,05% твин 20) (200 мкл/лунку), чтобы его блокировать (при комнатной температуре в течение 1 часа). Полученный планшет промывали буфером для промывки. Затем антитело HuK5-70, антитело HuT6-16-1, антитело HuT6-16-2, антитело K5-70 и антитело T6-16 разбавляли буфером для ELISA (PBS, содержащий 1% обезжиренное молоко и 0,025% твина 20) в диапазоне концентраций от $3,05 \times 10^{-4}$ до 5 мкг/мл, получая серию образцов двукратного разведения. Каждый из полученных при разведении образцов добавляли в количестве 50 мкл/лунку в описанный выше планшет для ELISA (при комнатной температуре в течение 2 часов). Продукт реакции промывали буфером для промывки и затем добавляли HRP-меченое антитело козы против κ -цепи человека (SouthernBiotech) или HRP-меченое антитело овцы против IgG мыши (GE Healthcare), каждое из которых было разбавлено в 2000 раз буфером для ELISA (50 мкл/лунку), в качестве антитела для выявления продукта реакции (при комнатной температуре в течение 1 часа). После промывки смеси буфером для промывки добавляли раствор субстрата TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин: SIGMA) (50 мкл/лунку) в полученному продукту, чтобы осуществить цветную реакцию. Затем к продукту реакции добавляли 1 М серную кислоту (25 мкл/лунку), чтобы остановить реакцию. Используя устройство для считывания микропланшетов модели 550 (BioRad), измеряли оптическую плотность при 450 нм, при этом в качестве сравнения использовали оптическую плотность при 655 нм. В результате кривые взаимодействия K5-70 и HuK5-70 почти перекрывались друг с другом, и значения EC50 составляли 27 нг/мл и 22 нг/мл, соответственно (фигура 53). Также кривые взаимодействия T6-16, HuT6-16-1 и HuT6-16-2 почти перекрывались друг с другом, и значения EC50 для них составляли 30 нг/мл, 27 нг/мл и 27 нг/мл, соответственно (фигура 54). На основании полученных результатов стало очевидно, что все антитела: антитело HuK5-70, антитело HuT6-16-1 и антитело HuT6-16-2, имеют аффинность по отношению к антигену, эквивалентную аффинности K5-70 или антитела T6-16, которое является исходным антителом для гуманизации.

[Пример 41][Противоопухолевая активность гуманизированного анти-hTROP-2-антитела (HuK5-70) *in vivo*]

Затем исследовали противоопухолевую активность антитела HuK5-70 *in vivo* в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480, которые эндогенно экспрессируют TROP-2 человека на клеточной поверхности. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid 7-недельного возраста (день 1). Когда средний объем опухолей достигал 100 мм^3 , осуществляли деление на группы (день 9). Начиная с 9 дня осуществляли внутрибрюшинное введение антитела с интервалами введения один раз каждые три дня. На 39-й день после трансплантации злокачественных клеток (день 39) объем опухолей в контрольной группе (введение PBS, N=8) составлял $824,3 \pm 188,8 \text{ мм}^3$. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела HuK5-70 (10 мг/кг массы тела, N=8) составлял $455,5 \pm 208,6 \text{ мм}^3$ ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и следовательно, образование опухолей было значимо ингибировано в группе введения антитела HuK5-70 (степень ингибирования: 44,7%) (фиг.55A). Что касается массы опухолей, то масса опухолей в контрольной группе составляла $0,509 \pm 0,161 \text{ г}$. Напротив, в группе введения антитела HuK5-70 масса опухолей составляла $0,272 \pm 0,162 \text{ г}$ ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 46,6% (фиг. 55B).

[Пример 42][Зависимая от дозы противоопухолевая активность гуманизированных анти-hTROP-2-антител (HuK5-70 и HuT6-16-2) в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480]

Зависимую от дозы противоопухолевую активность антител HuK5-70 и HuT6-16-2 исследовали в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480. Клетки SW480 (5×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей NOD-scid 7-недельного возраста (день 1).

На 9-ый день после трансплантации злокачественных клеток (день 9), когда средний объем опухолей достигал 100 мм^3 , мышей делили на группы: контрольную группу (группа введения PBS, $N = 8$, $101,65 \pm 8,35 \text{ мм}^3$), группу введения 1 мг/кг массы тела антитела HuK5-70 ($N = 8$, $103,18 \pm 9,86 \text{ мм}^3$), группу введения 5 мг/кг массы тела антитела HuK5-70 ($N = 8$, $101,34 \pm 8,94 \text{ мм}^3$), группу введения 10 мг/кг массы тела антитела HuK5-70 ($N=8$, $101,53 \pm 8,98 \text{ мм}^3$), группу введения 1 мг/кг массы тела антитела HuT6-16-2 ($N=8$, $103,18 \pm 9,86 \text{ мм}^3$), группу введения 5 мг/кг массы тела антитела HuT6-16-2 ($N=8$, $101,34 \pm 8,94 \text{ мм}^3$) и группу введения 10 мг/кг массы тела антитела HuT6-16-2 ($N=8$, $101,53 \pm 8,98 \text{ мм}^3$). Затем, начиная с 9 дня осуществляли внутрибрюшинное введение каждого антитела с интервалами введения один раз каждые три дня. На 48-ой день после трансплантации злокачественных клеток (день 48), объем опухолей в контрольной группе составлял $754,67 \pm 276,05 \text{ мм}^3$. С другой стороны, в группах введения антитела HuK5-70 объем опухолей составлял: в группе введения 1 мг/кг массы тела $521,81 \pm 183,45 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 30,9%), объем опухолей в группе введения 5 мг/кг массы тела составлял $258,78 \pm 137,02 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 65,7%, $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и объем опухолей в группе введения 10 мг/кг массы тела составлял $314,60 \pm 152,89 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 58,3%, $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента) (фигура 56A). В группах введения антитела HuT6-16-2: объем опухолей в группе введения 1 мг/кг массы тела составлял $600,41 \pm 319,84 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 20,4%), объем опухолей в группе введения 5 мг/кг массы тела составлял $315,32 \pm 189,02 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 58,2%, $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и объем опухолей в группе введения 10 мг/кг массы тела составлял $270,79 \pm 266,71 \text{ мм}^3$ (степень ингибирования: 64,1%, $P < 0,01$, t-критерий Стьюдента) (фигура 57A). Что касается массы опухолей на 48-ой день, то масса опухолей в контрольной группе составляла $0,422 \pm 0,201 \text{ г}$. С другой стороны, в группах введения антитела HuK5-70: масса опухолей в группе введения 1 мг/кг массы тела составляла $0,301 \pm 0,160 \text{ г}$ (степень ингибирования: 28,7%), масса опухолей в группе введения 5 мг/кг массы тела

составляла $0,115 \pm 0,083$ г (степень ингибирования: 72,7%, $P < 0,01$, t -критерий Стьюдента), и масса опухолей в группе введения 10 мг/кг массы тела составляла $0,244 \pm 0,181$ г (степень ингибирования: 42,2%) (фигура 56B). В группах введения антитела NuT6-16-2: масса опухолей в группе введения 1 мг/кг массы тела составляла $0,422 \pm 0,255$ г (степень ингибирования: 0%), масса опухолей в группе введения 5 мг/кг массы тела составляла $0,247 \pm 0,151$ г (степень ингибирования: 41,5%), и масса опухолей в группе введения 10 мг/кг массы тела составляла $0,190 \pm 0,190$ г (степень ингибирования: 53,1%, $P < 0,01$, t -критерий Стьюдента) (фиг. 57B). На основании полученных результатов было подтверждено, что антитела NuK5-70 и NuT6-16-2 обладают зависимой от дозы противоопухолевой активностью.

[Пример 43]

[Противоопухолевая активность мышинных моноклональных анти-hTROP-2-антител K5-70 и T6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли яичника человека SK-OV-3]

Противоопухолевую активность антител K5-70 и T6-16 в виде исходных антител *in vivo* исследовали в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли яичника человека SK-OV-3, которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на клеточной поверхности. Клетки SK-OV-3 (5×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей nude 7-недельного возраста (день 1). На 11-ый день после трансплантации злокачественных клеток (день 11) отдельных мышей, у которых явно наблюдали образование опухолей (средний объем опухолей: примерно 50 мм^3), делили на группы. Затем, начиная с 11 дня, осуществляли внутрибрюшинное введение каждого антитела с интервалами введения два раза в неделю. На 56-ой день после трансплантации злокачественных клеток (день 56) объем опухолей в контрольной группе (введение PBS, $N=8$) составлял $652,6 \pm 349,1 \text{ мм}^3$. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела K5-70 (10 мг/кг массы тела, $N=8$) составлял $253,7 \pm 137,3 \text{ мм}^3$ ($P < 0,01$, t -критерий Стьюдента), и, таким образом, образование опухолей

было значимо ингибировано (степень ингибирования: 61,1%); и объем опухолей в группе введения антитела Т6-16 (10 мг/кг массы тела, N=8) составлял $214,6 \pm 98,6$ мм³ ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и, таким образом, образование опухолей было значимо ингибировано (степень ингибирования: 67,1%) (фиг.58А). Что касается массы опухолей, то масса опухолей в контрольной группе составляла $0,413 \pm 0,218$ г. Напротив, масса опухолей в группе введения антитела К5-70 составляла $0,194 \pm 0,112$ (г) ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 53,0%; и масса опухолей в группе введения антитела Т6-16 составляла $0,183 \pm 0,093$ (г) ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 55,7% (фигура 58В).

[Пример 44]

[Противоопухолевая активность мышинных моноклональных анти-hTROP-2-антител К5-70 и Т6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MDA-MB-468]

Подобным образом противоопухолевую активность антител К5-70 и Т6-16 *in vivo* исследовали в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линия клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MDA-MB-468, которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на клеточной поверхности. Клетки MDA-MB-468 (5×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей nude 7-недельного возраста (день 1). На 12-ый день после трансплантации злокачественных клеток (день 12) отдельных мышей, у которых явно наблюдали образование опухолей (средний объем опухолей: примерно 50 мм³), делили на группы. Затем, начиная с 12-ого дня, осуществляли внутрибрюшинное введение каждого антитело с интервалами введения два раза в неделю. На 54-ый день после трансплантации злокачественных клеток (день 54), объем опухолей в контрольной группе (введение PBS, N = 8) составлял $218,6 \pm 75,5$ мм³. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела К5-70 (10 мг/кг массы тела, N = 8) составлял $70,2 \pm 37,4$ мм³ ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и, следовательно,

образование опухолей было значимо ингибировано (степень ингибирования: 67,9%); и объем опухолей в группе введения антитела Т6-16 (10 мг/кг массы тела, N = 8) составлял $88,3 \pm 42,9$ мм³ ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и, следовательно, образование опухолей было значимо ингибировано (степень ингибирования: 59,6%) (фиг. 59А). Что касается массы опухолей на 54-ый день, то масса опухолей в контрольной группе составляла $0,142 \pm 0,049$ г. Напротив, масса опухолей в группе введения антитела К5-70 составляла $0,050 \pm 0,033$ (г) ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 64,8%; и масса опухолей в группе введения антитела Т6-16 составляла $0,077 \pm 0,046$ (г) ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 45,8% (фиг. 59В).

[Пример 45]

[Противоопухолевая активность мышинных моноклональных анти-hTROP-2-антител К5-70 и Т6-16 в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3]

Подобным образом противоопухолевую активность антител К5-70 и Т6-16 *in vivo* исследовали в моделях лечения ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3, которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на клеточной поверхности. Клетки Calu-3 (5×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей nude 7-недельного возраста (день 1). На 9-ый день после трансплантации злокачественных клеток (день 9), отдельных мышей, у которых явно наблюдали образование опухолей (средний объем опухолей: примерно 100 мм³), делили на группы. Затем, начиная с 9 дня осуществляли внутрибрюшинное введение каждого антитела с интервалами введения два раза в неделю. На 41-ый день после трансплантации злокачественных клеток (день 41), объем опухолей в контрольной группе (введение PBS, N=8) составлял $395,7 \pm 221,2$ мм³. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела К5-70 (10 мг/кг массы тела, N = 8) составлял $120,7 \pm 125,6$ мм³ ($P < 0,01$, t-

критерий Стьюдента), и, следовательно, образование опухолей было значимо ингибировано (степень ингибирования: 69,5%); и объем опухолей в группе введения антитела Т6-16 (10 мг/кг массы тела, N=8) составлял $146,3 \pm 128,4$ мм³ ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), и, следовательно, образование опухолей было значимо ингибировано (степень ингибирования: 63,0%) (фиг. 60А). Что касается массы опухолей, то масса опухолей в контрольной группе составляла $0,301 \pm 0,189$ г. Напротив, масса опухолей в группе введения антитела К5-70 составляла $0,08 \pm 0,085$ (г) ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 73,5%; и масса опухолей в группе введения антитела Т6-16 составляла $0,106 \pm 0,096$ (г) ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 64,9% (фиг. 60В).

[Пример 46]

[Противоопухолевая активность мышинового моноклонального анти-hTROP-2-антитела К5-70 в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли желчных протоков человека ТФК-1]

Подобным образом противоопухолевую активность антитела К5-70 *in vivo* исследовали в моделях профилактики ксенотрансплантатов с использованием линии клеток злокачественной опухоли желчных протоков человека ТФК-1, которые эндогенно экспрессируют hTROP-2 на клеточной поверхности. Клетки ТФК-1 (5×10^6 клеток) трансплантировали подкожно в правый бок каждой из самок мышей nude 7-недельного возраста (день 1), и с того же дня начинали внутрибрюшинное введение антитела с интервалами введения два раза в неделю. На 31-ый день после трансплантации злокачественных клеток (день 31), объем опухолей в контрольной группе (введение PBS, N=5) составлял $1000,4 \pm 268,9$ мм³. С другой стороны, объем опухолей в группе введения антитела К5-70 (10 мг/кг массы тела, N=5) составлял $197,2 \pm 215,5$ мм³ ($P < 0,01$, t-критерий Стьюдента), и, следовательно, образование опухолей было значимо ингибировано (степень ингибирования: 80,3%) (фиг. 61А). Что касается массы опухолей, то масса опухолей в контрольной группе составляла

0,443±0,070 г. Напротив, масса опухолей в группе введения антитела K5-70 составляла 0,063±0,052 (г) ($P<0,01$, t -критерий Стьюдента), что свидетельствует о степени ингибирования 85,8% (фиг. 61В).

[Пример 47]

[Анализ avidности антител HuK5-70 и HuT6-16-2]

Антигенсвязывающую активность антител HuK5-70 и HuT6-16-2 исследовали согласно способу ELISA (ELISA с покрыванием антигеном с низкой плотностью), используя 96-луночный планшет, который был покрыт антигеном с низкой плотностью. Рекомбинантный белок hTACSTD2-Fc-His (Creative BioMart), который был приготовлен в концентрации 0,1 мкг/мл с использованием 0,1 М ацетатного буфера (pH 5,3), добавляли в количестве 50 мкл/лунку в 96-луночный планшет, и покрывание осуществляли при 4°C в течение ночи. Затем осуществляли такой же анализ, который описан в примере 40. Тестируемые антитела разбавляли буфером для ELISA (PBS, содержащий 1% обезжиренное молоко и 0,025% твина 20), получая образцы с диапазоном концентраций от 20 мкг/мл до серии двукратных разведений (15 образцов) и используя их. В результате было обнаружено, что антитело HuT6-16-2 обладает активностью связывания, которая почти эквивалентна активности связывания антитела T6-16 (при этом их значения EC50 составляли 49 нг/мл и 41 нг/мл, соответственно), но значение EC50 для антитела HuK5-70 было примерно в 20 раз выше, чем значение для антитела K5-70 (при этом их значения EC50 составляли 222 нг/мл и 12 нг/мл, соответственно; фиг. 62).

Затем исследовали антигенсвязывающую активность антител HuK5-70 и K5-70 в ELISA с целью анализа взаимодействия моновалентного антигена-антитела. Антитело козы против IgG человека (Fcγ-специфичное) (Southern Biotech), которое было разбавлено до 1 мкг/мл в 0,1 М ацетатном буфере (pH 5,3), и антитело козы против IgG мыши (специфичное к γ-цепи) (Southern Biotech), которое было разбавлено до 3 мкг/мл, добавляли в количестве 50 мкл/лунку в 96-луночный планшет. Затем

осуществляли покрытие при 4°C в течение ночи. Затем продукт реакции промывали буфером для промывки (PBS, содержащий 0,05% твин 20), и затем добавляли блокирующий буфер (PBS, содержащий 2% обезжиренное молоко и 0,05% твин 20) (200 мкл/лунку), чтобы его заблокировать (при комнатной температуре в течение 1 часа). Полученный планшет промывали буфером для промывки. Затем к описанному выше планшету добавляли тестируемое антитело, которое было разбавлено до 1 мкг/мл буфером для ELISA (PBS, содержащий 1% обезжиренное молоко и 0,025% твин 20), в количестве 50 мкл/лунку. Во время такой операции антитело NuK5-70 добавляли в лунку, покрытую антителом козы против IgG человека (Fcγ-специфичным), и антитело K5-70 добавляли в лунку, покрытую антителом козы против IgG мыши (специфичным к γ-цепи). Смесь оставляли при комнатной температуре на 1 час и затем продукт реакции промывали буфером для промывки. Рекомбинантный белок внеклеточной области hTROP-2, описанный в примере 3 (ЕС hTROP-2) разбавляли буфером для ELISA, получая образцы в диапазоне концентраций от 5 мкг/мл до серии трехкратных разведений (10 образцов). Полученный таким образом образец добавляли в планшет в количестве 50 мкл/лунку. Смесь оставляли при комнатной температуре на 1 час и затем продукт реакции промывали буфером для промывки. Затем к продукту реакции добавляли антитело против His (G-18) (Santa Cruz), которое было разбавлено до 2 мкг/мл буфером для ELISA, в качестве первого антитела (50 мкл/лунку). Полученную смесь оставляли при комнатной температуре на 1 час и затем ее промывали буфером для промывки. Затем к продукту реакции добавляли HRP-меченое антитело против IgG кролика (GE Healthcare), которое было разбавлено в 1000 раз буфером для ELISA, в качестве второго антитела (50 мкл/лунку). Полученную смесь оставляли при комнатной температуре на 1 час и затем ее промывали буфером для промывки. Затем, к полученному продукту добавляли раствор субстрата TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин: SIGMA) в количестве 50 мкл/лунку, чтобы осуществить цветную реакцию. Затем к продукту реакции добавляли 1 М серную кислоту (25

мкл/лунку), чтобы остановить реакцию. Используя устройство для считывания микропланшетов модели 550 (BioRad), измеряли оптическую плотность при 450 нм, при этом оптическую плотность при 655 нм использовали для сравнения. В результате, значения ЕС₅₀, вычисленные на основании кривых связывания белка hTROP-2ЕС с антителами К5-70 и NuK5-70, составляли 7 нг/мл и 6 нг/мл, соответственно (фиг. 63). Полученные результаты демонстрируют, что антитело NuK5-70 и антитело К5-70 обладают эквивалентной аффинностью по отношению к антигену при взаимодействии моновалентный антиген-антитело.

Как описано в примере 40, в способе ELISA с использованием 96-луночного планшета, который был покрыт антигеном с высокой плотностью (0,5 мкг/мл) (ELISA с покрыванием антигеном), аффинность по отношению к антигену антитела К5-70 была эквивалентна аффинности по отношению к антигену антитела NuK5-70 (фиг. 53). Таким образом, было высказано предположение, что антигенсвязывающая активность антитела NuK5-70, которая относительно меньше, чем активность антитела К5-70 в способе ELISA, в котором планшет покрывали антигеном с низкой плотностью (0,1 мкг/мл), может быть вызвана тем фактом, что гибкость при движении двух антигенсвязывающих плеч, а именно «авидность», относительно меньше в случае антитела NuK7-50, чем антитела К5-70.

[Пример 48]

[Получение и характеристика мутантов гуманизированного антитела К5-70]

В целях улучшения «авидности» антитела NuK5-70 осуществляли следующий эксперимент.

Обусловлена ли указанная выше относительно низкая «авидность» антитела NuK5-70 областями VH или VL, исследовали в следующем эксперименте. Сначала гены, кодирующие переменную область Н-цепи (К5-70 VH) и переменную область L-цепи (К5-70 VL) антитела К5-70 в качестве исходного антитела, получали синтезом генов (Operon). В ходе синтеза генов последовательность Козака (ACC ACC) добавляли с 5'-концевой стороны последовательности каждого из генов VH К5-70 и VL К5-

70. Затем добавляли сайт EcoRI (GAA TTC) в качестве сайта фермента рестрикции к 5'-концу VH K5-70, и сайт NheI (GCT AGC) добавляли в качестве сайта фермента рестрикции к его 3'-концу. Подобным образом, сайт AgeI (ACC GGT) добавляли в качестве сайта фермента рестрикции к 5'-концу VL K5-70, и сайт BsiWI (CGT ACG) добавляли в качестве сайта фермента рестрикции к его 3'-концу. Каждый из синтезированных генов: ген VH K5-70 и ген VL K5-70, включали в вектор pCR2.1 (Invitrogen). Последовательности генов VH и VL K5-70, полученных синтезом генов, показаны на фигуре 64 и фигуре 65, соответственно. Гены VH K5-70 и VL K5-70, включенные в вектор pCR2.1, отщепляли ферментами рестрикции EcoRI и NheI, и AgeI и BsiWI, соответственно, и затем фрагменты генов извлекали. Затем отщепленный ген VH K5-70 встраивали в EcoRI/NheI-сайт вектора pFUSE-CHlg-hG1 (InvivoGen) в качестве вектора экспрессии для экспрессии формы IgG1 человека, тогда как ген VL K5-70 встраивали в AgeI/BsiWI-сайт вектора pFUSE2-CLlg-hk (InvivoGen) в качестве вектора, экспрессирующего форму Igk человека, таким образом получая химерные конструкции мыши-человека (pFUSE-CHlg-MuK5-70 и pFUSE2-CLlg-MuK5-70).

Полученным таким образом конструкциям, и вектору, экспрессирующему Н-цепь HuK5-70 (pFUSE-CHlg-HuK5-70), и вектору, экспрессирующему L-цепь HuK5-70 (pFUSE2-CLlg-HuK5-70), которые были получены в примере Пример 36, создавали возможность совместно экспрессироваться в клетках 293F (Invitrogen) при сочетаниях 1-4, указанных в следующей таблице.

	Н-цепь	L-цепь	Созданное антитело	Примечания
1	pFUSE-CHlg-HuK5-70	pFUSE2-CLlg-HuK5-70	антитело HuK5-70	гуманизированное антитело K5-70
2	pFUSE-CHlg-HuK5-70	pFUSE2-CLlg-MuK5-70	антитело HuVH/MuVL	гуманизированная VH K5-70/VL K5-70 мыши
3	pFUSE-CHlg-	pFUSE2-	антитело	VH мыши K5-

	MuK5-70	CLIg-HuK5-70	MuVH/HuVL	70/гуманизированная VL K5-70
4	pFUSE-CHlg-MuK5-70	pFUSE2-CLIg-MuK5-70	антитело ChK5-70	химерное антитело K5-70

Трансфекцию векторов экспрессии, описанных выше, в клетки 293F (Invitrogen) осуществляли, используя реагент NeoFection (Astec) согласно способу, описанному в инструкциях, прилагаемых к реагенту. После осуществления трансфекции полученные клетки культивировали в течение 5 дней, используя среду для экспрессии FreeStyle 293 (Invitrogen) при 37°C в CO₂-инкубаторе с концентрацией CO₂ 8%. Затем получали надосадов культуры. Концентрацию антитела в надосадке культуры измеряли способом ELISA типа «сэндвича». В частности, антитело козы против IgG человека (Fcγ-специфичное) (Southern Biotech), которое было разбавлено до 1 мкг/мл в PBS, добавляли в количестве 50 мкл/лунку в 96-луночный планшет. Затем осуществляли покрывание при 4°C в течение ночи. Затем продукт реакции промывали буфером для промывки (PBS, содержащий 0,05% твин 20) и затем в планшет добавляли блокирующий буфер (PBS, содержащий 2% обезжиренное молоко и 0,05% твин 20) (200 мкл/лунку) для блокирования при комнатной температуре в течение 1 часа. Полученный планшет промывали буфером для промывки. Затем надосадов культуры, который был разбавлен до соответствующей кратности разведения буфером для ELISA (PBS, содержащий 1% обезжиренное молоко и 0,025% твин 20), добавляли в количестве 50 мкл/лунку в описанный выше планшет, и затем проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 часов. В качестве стандартного препарата использовали антитело HuK5-70. Затем продукт реакции промывали буфером для промывки. В качестве антитела для выявления к продукту реакции добавляли HRP-меченое антитело козы против карпа человека (специфичное для к-цепи) (Southern Biotech), которое было разбавлено в 1000 раз буфером для ELISA, в количестве 50 мкл/лунку, и затем осуществляли реакцию при комнатной температуре в течение 1 часа. Продукт реакции

промывали буфером для промывки, и затем к полученному продукту добавляли раствор субстрата ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин: SIGMA) в количестве 50 мкл/лунку, чтобы осуществить цветную реакцию. Затем к продукту реакции добавляли 1 М серную кислоту (25 мкл/лунку), чтобы остановить реакцию. Используя устройство для считывания микропланшетов iMark Microplate (BioRad), измеряли оптическую плотность при 450 нм, при этом оптическую плотность при 655 нм использовали для сравнения. Связывание 4 типов антител, находящихся в надосадках культур, с hTROP-2 измеряли описанным выше способом ELISA с покрытием антигеном с низкой плотностью. В результате было обнаружено, что связывающая активность антитела MuVH/HuVL, состоящего из VH K5-70 VH мыши и VL HuK5-70, по отношению к hTROP-2 была эквивалентна активности антитела ChK5-70, но что связывающая активность антитела HuVH/MuVL, состоящего из VH HuK5-70 и VL K5-70 мыши была относительно более низкой, чем активность ChK5-70 (фигура 66). Полученные результаты свидетельствуют, что VH HuK5-70 вовлечена в «авидность» HuK5-70. Поэтому, чтобы получить модифицированные антитела, в которых «авидность» антитела HuK5-70 улучшена, осуществляли аминокислотную замену в VH HuK5-70. Как было обнаружено при выравнивании аминокислотных последовательностей VH HuK5-70 и VH K5-70, которое показано на фигуре 41, всего 17 аминокислот с номерами аминокислот 5, 7, 11, 12, 13, 20, 38, 40, 44, 73, 75, 81, 82с, 83, 87, 108 и 109, отличаются в VH HuK5-70 и VH K5-70 (при этом номера аминокислот использованы в соответствии с определениями Кабата и соавторов (1991)). Указанные выше аминокислоты VH HuK5-70 заменяли соответствующими аминокислотами VH K5-70, так что в результате синтеза генов были получены мутанты. Затем получали вектор экспрессии (мутант pFUSE-CHlg-HuK5-70). В публикации Landolfi с соавторами (J. Immunol. 166: 1748, 2001) сообщалось, что аминокислоты в положениях 11 и 38 VH вовлечены в авидность гуманизированного антитела, и что авидность и биологическая активность улучшены при замене двух указанных выше аминокислот соответствующими аминокислотами, полученными от мыши. Таким образом также получали двойной мутант, содержащий замены

аминокислот в положениях 11 и 38. Названия полученных таким образом 18 типов мутантов VH HuK5-70 и их аминокислотные последовательности показаны на фигуре 67.

Каждый из полученных 18 типов мутантов VH HuK5-70 (векторы экспрессии для мутантов pFUSE-CHlg-HuK5-70) объединяли с вектором экспрессии L-цепи HuK5-70 (pFUSE2-CLlg-HuK5-70) и каждый их полученных таким образом векторов экспрессии трансфицировали в клетки НЕК293. Затем, используя полученный надосадок культуры, исследовали связывающую активность каждого из антител с аминокислотными заменами по отношению к hTROP-2, используя ELISA с покрыванием антигеном с низкой плотностью. В результате обнаружили, что среди 18 типов мутантов VH HuK5-70 мутант R44G, в котором R (аргинин) в положении 44 VH HuK5-70 был заменен G (глицином) (HuK5-70 R44G; который называют далее HuK5-70-2), по-видимому, обладает улучшенной антигенсвязывающей активностью (фигура 68). Последовательность гена VH HuK5-70 R44G (далее называемого VH2 HuK5-702) показана на фигуре 69.

[Пример 49]

[Очистка и характеристика антитела HuK5-70-2]

Антитело HuK5-70-2, которое представляет собой мутантное антитело HuK5-70 R44G, очищали следующим образом. А именно, pFUSE-CHlg-HuK5-70 R44G и pFUSE2-CLlg-HuK5-70 трансфицировали в клетки 293F, и затем полученные клетки культивировали в течение 5 дней. Затем получали надосадок культуры. Антитело HuK5-70-2 очищали из полученного надосадка культуры, используя колонку с рекомбинантным белком А-сефарозой Fast Flow (GE Healthcare). Очищенное антитело HuK5-70-2 загружали на SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях. В результате обнаружена H-цепь примерно 50 кД и L-цепь примерно 25 кД. Чистота каждого антитела составляла 95% или больше (фигура 70).

Связывающую активность очищенных антител HuK5-70-2 и HuK5-70 по отношению к hTROP-2 исследовали в ELISA с покрыванием антигеном с высокой плотностью и ELISA с покрыванием антигеном с низкой плотностью. Аффинность антител исследовали в ELISA с покрыванием антигеном с высокой плотностью (используя 96-луночный планшет, который покрывали 1 мкг/мл hTROP-2). В

результате было обнаружено, что кривая связывания антитела NuK5-70 почти перекрывалась с кривой связывания антитела NuK5-70-2, и что их аффинности были эквивалентны друг другу. Затем исследовали авидность антител в ELISA с покрытием антигеном с низкой плотностью (используя 96-луночный планшет, который покрывали 0,1 мкг/мл hTROP-2). В результате было обнаружено, что также как и в случае использования надосадка культуры, антигенсвязывающая активность антитела NuK5-70-2 была явно выше, чем антигенсвязывающая активность антитела NuK5-70 (фигура 71). В частности, значение EC_{50} антитела K5-70 составляло 11,4 нг/мл, значение EC_{50} антитела NuK5-70 составляло 33,4 нг/мл, и значение EC_{50} антитела NuK5-70-2 составляло 11,4 нг/мл. Таким образом, было показано, что антитело NuK5-70-2 имеет улучшенную авидность по сравнению с антителом NuK5-70, и что антитело NuK5-70-2 имеет активность, эквивалентную активности антитела K5-70.

[Пример 50]

[Измерение активности в зависимости от антител клеточной цитотоксичности (ADCC) гуманизированных анти-hTROP-2-антител]

(1) Получение раствора клеток-мишеней

В качестве клеток-мишеней использовали линию клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480, линию клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59 и линию клеток злокачественной опухоли простаты человека PC-3, каждая из которых эндогенно экспрессирует hTROP-2. Клетки-мишени, культивируемые в чашках для культур клеток диаметром 10 см, собирали из чашек обработкой трипсином и затем суспендировали в среде для анализа. Для ADCC-анализа использовали среду Leivovitz L-15 (для клеток SW480) или среду RPMI-1640 (для клеток PK-59 и PC-3), в которую добавляли 0,5% FBS. После осуществления центрифугирования (при 1000 об./мин в течение 3 минут при комнатной температуре), осадки получали с плотностью клеток 2×10^5 клеток/мл в такой же среде, как среда, описанная выше, и таким образом получали раствор с клетками-мишенями.

(2) Отделение моноклеарных клеток периферической крови

человека

Собирали венозную кровь здоровых доноров с гепарином и затем разбавляли в 2 раза, используя PBS. Затем разбавленную кровь наслаивали на Lymphoprep (Daiichi Kagaku Yakuhin K.K.) и затем центрифугировали (при комнатной температуре при 750 об./мин в течение 5 минут и затем при 2000 об./мин в течение 20 минут). После завершения центрифугирования мононуклеарные клетки (здоровые моноциты периферической крови) извлекали из фракции промежуточного слоя и затем три раза промывали PBS. Затем готовили суспензию клеток, используя среду для анализа, и полученные клетки использовали в качестве эффекторных клеток.

(3) ADCC-активность гуманизированных анти-hTROP-2-антител (антител HuK5-70, HuK5-70-2 и HuT6-16-2)

По 100 мкл (2×10^4 клеток/лунку) полученного раствора с клетками-мишенями распределяли в 96-луночном планшете с плоским дном (производства FALCON). Затем в планшет добавляли мононуклеарные клетки периферической крови человека (эффекторные клетки) так, чтобы соотношение между эффекторными клетками и клетками-мишенями составляло 40:1. Затем в планшет добавляли каждое из гуманизированных анти-hTROP-2-антител (антитела HuK5-70, HuK5-70-2 и HuT6-16-2) в качестве тестируемых антител до конечной концентрации 0,1-30 мкг/мл. Смесь доводили до общего объема 200 мкл и затем культивировали в CO₂-инкубаторе (при 37°C и 5% CO₂) в течение 6 часов. После завершения культивирования измеряли активность лактатдегидрогеназы, высвобождаемой из цитоплазмы клеток-мишеней, поврежденных эффекторными клетками, используя набор для определения цитотоксичности (LDH) (Roche, № в каталоге 11644793001) согласно протоколам, прилагаемым к набору, и затем оценивали ADCC-активность, используя результат измерения в качестве показателя.

Как показано на фигурах 72A-72C, очевидно, что антитела HuK5-70 и HuT6-16-2 зависимым от дозы образом проявляют ADCC-активность по отношению к линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480 (фигура 72A), линии клеток

злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-59 (фигура 72В) и линии клеток злокачественной опухоли простаты человека РС-3 (фигура 72С), каждая из которых экспрессирует hTROP-2 на клеточной поверхности. Кроме того, как показано на фигурах 72В и 72С, очевидно, что антитело NuK5-70-2 проявляет ADCC-активность по отношению к линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы РК-59 и линии клеток злокачественной опухоли простаты человека РС-3, при этом указанная выше ADCC-активность сильнее, чем активность антитела NuK5-70. Как указано выше, антитело NuK5-70-2 представляет собой антитело, способность связывания которого (авидность) с hTROP-2 была улучшена заменой R (аргинина) в положении 44 VH NuK5-70 на G (глицин). Было показано, что авидность антитела NuK5-70-2, которая была улучшена по сравнению с антителом NuK5-70, отражается в ADCC-активности. Поэтому было высказано предположение, что антитело NuK5-70-2 обладает превосходной противоопухолевой активностью даже *in vivo*, как в случае антитела NuK5-70 (при этом антитело NuK5-70-2, предпочтительно, может обладать более высокой противоопухолевой активностью, чем антитело NuK5-70). На основании описанных выше результатов показано, что антитела NuK5-70, NuK5-70-2 и NuT6-16-2 могут быть терапевтическими антителами, применимыми по отношению к злокачественной опухоли, которая экспрессирует hTROP-2 на клеточной поверхности.

ПРОМЫШЛЕННАЯ ПРИМЕНИМОСТЬ

В настоящем изобретении предлагается антитело, которое специфично взаимодействует с hTROP-2 и обладает высокой противоопухолевой активностью *in vivo*, и в частности, моноклональное антитело, обладающее высокой противоопухолевой активностью *in vivo* в низкой дозе, и в частности, такое антитело, которое является гуманизированным антителом. Кроме того, в настоящем изобретении предлагается гибридома, которая продуцирует антитело, фрагмент антитела, комплекс антитела или тому подобное, и различные типы лекарственных средств, фармацевтическая композиция для диагностики или лечения опухоли, способ выявления опухоли и набор для выявления или

диагностики опухоли.

СВОБОДНЫЙ ТЕКСТ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:3	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:4	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:5	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:6	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:7	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:8	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:9	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:10	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:11	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:12	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:13	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:14	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:15	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:16	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:17	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:18	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:19	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:20	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:21	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:22	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:23	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:24	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:25	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:26	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:27	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:28	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:29	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:30	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:31	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:32	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:33	синтетическая ДНК
SEQ ID NO:74	Рекомбинантная ДНК
SEQ ID NO:75	синтетическая конструкция (рекомбинантный

	белок)	
SEQ ID NO:76	Рекомбинантная ДНК	
SEQ ID NO:77	синтетическая конструкция	(рекомбинантный белок)
SEQ ID NO:78	Рекомбинантная ДНК	
SEQ ID NO:79	синтетическая конструкция	(рекомбинантный белок)
SEQ ID NO:80	Рекомбинантная ДНК	
SEQ ID NO:81	синтетическая конструкция	(рекомбинантный белок)
SEQ ID NO:82	Рекомбинантная ДНК	
SEQ ID NO:83	синтетическая конструкция	(рекомбинантный белок)
SEQ ID NO:92	Рекомбинантный белок	
SEQ ID NO:93	Рекомбинантный белок	
SEQ ID NO:94	Рекомбинантный белок	
SEQ ID NO:95	Рекомбинантный белок	
SEQ ID NO:96	Рекомбинантный белок	
SEQ ID NO:97	Рекомбинантный белок	
SEQ ID NO:98	Рекомбинантный белок	
SEQ ID NO:99	Рекомбинантная ДНК	
SEQ ID NO:100	Рекомбинантная ДНК	

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> LivTech, Inc.

<120> АНТИТЕЛО ПРОТИВ ТРОП-2 ЧЕЛОВЕКА, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ
IN VIVO

<130> PCT12-0027

<150> US61/562,672

<151> 2011-11-22

<160> 234

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 2080

<212> ДНК

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (339)..(1310)

<400> 1

gcgggtcccc agaagcctac aggtgagtat cggttctccc cttcccggct ttcgggtccgg 60

aggaggcggg agcagcttcc ctgttctgat cctatcgagg gcggcgagg gccggcttgg 120

ccttccgtgg gacggggagg ggggcgggat gtgtcaccca aataccagtg gggacggtcg 180

gtggtggaac cagccgggca ggtcgggtag agtataagag ccggagggag cggccggggcg 240

gcagacgcct gcagaccatc ccagacgccg gagcccgagg cccgacgagt cccgcgcct 300

catccgcccg cgtccgggtcc gcgttctctc gcccacc atg gct cgg ggc ccc ggc 356

Met Ala Arg Gly Pro Gly

1

5

ctc gcg ccg cca ccg ctg cgg ctg ccg ctg ctg ctg ctg gtg ctg gcg 404

Leu Ala Pro Pro Pro Leu Arg Leu Pro Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala

10

15

20

gcg gtg acc ggc cac acg gcc gcg cag gac aac tgc acg tgt ccc acc 452

Ala Val Thr Gly His Thr Ala Ala Gln Asp Asn Cys Thr Cys Pro Thr

25

30

35

aac aag atg acc gtg tgc agc ccc gac gcc ccc gcc gcc cgc tgc cag 500

Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln

40

45

50

tgc cgc gcg ctg ggc tgc ggc atg gcg gtc gac tgc tcc acg ctg acc 548

Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr

55

60

65

70

tcc aag tgt ctg ctg ctc aag gcg cgc atg agc gcc ccc aag aac gcc 596

Ser Lys Cys Leu Leu Leu Lys Ala Arg Met Ser Ala Pro Lys Asn Ala

75

80

85

cgc acg ctg gtg cgg ccg agt gag cac gcg ctc gtg gac aac gat ggc 644

Arg Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala Leu Val Asp Asn Asp Gly

90

95

100

ctc tac gac ccc gac tgc gac ccc gag ggc cgc ttc aag gcg cgc cag Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln 105 110 115	692
tgc aac cag acg tgc gtg tgc tgg tgc gtg aac tgc gtg ggc gtg cgc Cys Asn Gln Thr Ser Val Cys Trp Cys Val Asn Ser Val Gly Val Arg 120 125 130	740
cgc acg gac aag ggc gac ctg agc cta cgc tgc gat gag ctg gtg cgc Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg Cys Asp Glu Leu Val Arg 135 140 145 150	788
acc cac cac atc ctc att gac ctg cgc cac cgc ccc acc gcc ggc gcc Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala 155 160 165	836
ttc aac cac tca gac ctg gac gcc gag ctg agg cgg ctc ttc cgc gag Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu 170 175 180	884
cgc tat cgg ctg cac ccc aag ttc gtg gcg gcc gtg cac tac gag cag Arg Tyr Arg Leu His Pro Lys Phe Val Ala Ala Val His Tyr Glu Gln 185 190 195	932
ccc acc atc cag atc gag ctg cgg cag aac acg tct cag aag gcc gcc Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn Thr Ser Gln Lys Ala Ala 200 205 210	980
ggt gac gtg gat atc ggc gat gcc gcc tac tac ttc gag agg gac atc Gly Asp Val Asp Ile Gly Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Glu Arg Asp Ile 215 220 225 230	1028
aag ggc gag tct cta ttc cag ggc cgc ggc ggc ctg gac ttg cgc gtg Lys Gly Glu Ser Leu Phe Gln Gly Arg Gly Gly Leu Asp Leu Arg Val 235 240 245	1076
cgc gga gaa ccc ctg cag gtg gag cgc acg ctc atc tat tac ctg gac Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg Thr Leu Ile Tyr Tyr Leu Asp 250 255 260	1124
gag att ccc ccg aag ttc tcc atg aag cgc ctc acc gcc ggc ctc atc Glu Ile Pro Pro Lys Phe Ser Met Lys Arg Leu Thr Ala Gly Leu Ile 265 270 275	1172
gcc gtc atc gtg gtg gtc gtg gtg gcc ctc gtc gcc ggc atg gcc gtc Ala Val Ile Val Val Val Val Val Ala Leu Val Ala Gly Met Ala Val 280 285 290	1220
ctg gtg atc acc aac cgg aga aag tgc ggg aag tac aag aag gtg gag Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys Ser Gly Lys Tyr Lys Lys Val Glu 295 300 305 310	1268
atc aag gaa ctg ggg gag ttg aga aag gaa ccg agc ttg tag Ile Lys Glu Leu Gly Glu Leu Arg Lys Glu Pro Ser Leu 315 320	1310
gtacccggcg gggcagggga tggggtgggg taccggattt cggtatcgtc ccagacccaa	1370
gtgagtcacg cttcctgatt cctcggcgca aaggagacgt ttatcctttc aaattcctgc	1430
cttccccctc ctttttgcgc acacaccagg tttaatagat cctggcctca gggctctcctt	1490
tctttctcac ttctgtcttg aaggaagcat ttctaaaatg tatccctttt cgggtccaaca	1550

```

acaggaaacc tgactggggc agtgaaggaa gggatggcat agcgttatgt gtaaaaaaca 1610
agtatctgta tgacaacccg ggatcgtttg caagtaactg aatccattgc gacattgtga 1670
aggcttaa at gagtttagat gggaaatagc gttgttatcg ccttgggttt aaattatttg 1730
atgagttcca cttgtatcat ggcctacccg aggagaagag gagtttggtta actgggccta 1790
tgtagtagcc tcatttacca tcgtttgtat tactgaccac atatgcttgt cactgggaaa 1850
gaagcctgtt tcagctgcct gaacgcagtt tggatgtctt tgaggacaga cattgcccgg 1910
aaactcagtc tatttattct tcagcttgcc cttactgcca ctgatattgg taatgttctt 1970
ttttgtaaaa tgtttgtaca tatgttgtct ttgataatgt tgctgtaatt ttttaaaata 2030
aaacacgaat ttaataaa atgggaaagg cacaaccag aaaaaaaaaa 2080

```

```

<210> 2
<211> 323
<212> Бeлoк
<213> homo sapiens

```

```

<400> 2

```

```

Met Ala Arg Gly Pro Gly Leu Ala Pro Pro Pro Leu Arg Leu Pro Leu
1          5          10          15

```

```

Leu Leu Leu Val Leu Ala Ala Val Thr Gly His Thr Ala Ala Gln Asp
          20          25          30

```

```

Asn Cys Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly
          35          40          45

```

```

Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val
          50          55          60

```

```

Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser Lys Cys Leu Leu Leu Lys Ala Arg Met
65          70          75          80

```

```

Ser Ala Pro Lys Asn Ala Arg Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala
          85          90          95

```

```

Leu Val Asp Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Pro Glu Gly
          100          105          110

```

```

Arg Phe Lys Ala Arg Gln Cys Asn Gln Thr Ser Val Cys Trp Cys Val
          115          120          125

```

```

Asn Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg
          130          135          140

```

```

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His

```

145 150 155 160
 Arg Pro Thr Ala Gly Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu
 165 170 175
 Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His Pro Lys Phe Val Ala
 180 185 190
 Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
 195 200 205
 Thr Ser Gln Lys Ala Ala Gly Asp Val Asp Ile Gly Asp Ala Ala Tyr
 210 215 220
 Tyr Phe Glu Arg Asp Ile Lys Gly Glu Ser Leu Phe Gln Gly Arg Gly
 225 230 235 240
 Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg Thr
 245 250 255
 Leu Ile Tyr Tyr Leu Asp Glu Ile Pro Pro Lys Phe Ser Met Lys Arg
 260 265 270
 Leu Thr Ala Gly Leu Ile Ala Val Ile Val Val Val Val Val Ala Leu
 275 280 285
 Val Ala Gly Met Ala Val Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys Ser Gly
 290 295 300
 Lys Tyr Lys Lys Val Glu Ile Lys Glu Leu Gly Glu Leu Arg Lys Glu
 305 310 315 320
 Pro Ser Leu

<210> 3
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтетическая ДНК
 <400> 3
 ttcctccgcc ccaccatggc

<210> 4
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	4	
	ctcgagcaag ctcggttcct ttctc	25
<210>	5	
<211>	29	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	5	
	ctcgagctcg tccaggtaat agatgagcg	29
<210>	6	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	6	
	gatccactag tcgscgagtgg tgg	23
<210>	7	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	7	
	aattccасса ctgscgаста gтg	23
<210>	8	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	8	
	tcctcgtgtc ccactcccgg	20
<210>	9	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	9	

ctcgagtgsa ttgagttccc tatgc 25

<210> 10
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая ДНК

<400> 10
cctgagcsta cgctgcgacg aagtgggtgcg 30

<210> 11
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая ДНК

<400> 11
cgcaccattt cgtcgcagcg taggctcagg 30

<210> 12
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая ДНК

<400> 12
gactgctcca cgctgacttc caagtgcctg 30

<210> 13
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая ДНК

<400> 13
caggcatttg gaagtcagcg tggagcagtc 30

<210> 14
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая ДНК

<400> 14
ctcgtggasa acgatggcct ctacgacccg 30

<210> 15

<211>	30	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	15	
	cgggtcgtag aggccatcgt tgtccacgag	30
<210>	16	
<211>	31	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	16	
	ссaaagcctg cgctgcgatg agctgggtgcg c	31
<210>	17	
<211>	31	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	17	
	gscgaccagc tcatcgcagc gcaggctttg g	31
<210>	18	
<211>	30	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	18	
	agcttcstat ccgcggtgca ctacgagcag	30
<210>	19	
<211>	30	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	19	
	ctgctcgtag tgcaccgcgg ataggaagct	30
<210>	20	
<211>	30	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	

<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	20	
	gacattaaaag gscgagtctct attccagggc	30
<210>	21	
<211>	30	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	21	
	gscctggaat agagactcgc ctttaatgtc	30
<210>	22	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	22	
	ctactccacc ccaccctggc g	21
<210>	23	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	23	
	ctcgagcaag ctaggttcgc ttctc	25
<210>	24	
<211>	12	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	24	
	tccakagttcca	12
<210>	25	
<211>	12	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая ДНК	
<400>	25	

gctgtcctga tc	12
<210> 26	
<211> 45	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Синтетическая ДНК	
<400> 26	
стаатасгас тсастатагг гсаагсagtг gтатсаасгс agagt	45
<210> 27	
<211> 22	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Синтетическая ДНК	
<400> 27	
стаатасгас тсастатагг гс	22
<210> 28	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Синтетическая ДНК	
<400> 28	
gggaartarc ccttgaccag гса	23
<210> 29	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Синтетическая ДНК	
<400> 29	
gggaartagc ctttgасааг гса	23
<210> 30	
<211> 27	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Синтетическая ДНК	
<400> 30	
састгссатс аатvctccac ttгаса	27
<210> 31	

<211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Синтетическая ДНК

 <400> 31
 cgactggagc асгаггасас tga 23

<210> 32
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Синтетическая ДНК

 <400> 32
 gccagtggat агасагатгг 20

<210> 33
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Синтетическая ДНК

 <400> 33
 gatggataca gttgggtgcag с 21

<210> 34
 <211> 402
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(402)

 <400> 34
 atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gtg agg 96
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30

cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

acc atc tac tgg ata aac tgg gtg aaa cag agg cct gga caa ggc ctt 192
 Thr Ile Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

gag tgg atc gga aat att tat cct tct gat agt tat act aac tac aat 240
 Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn

65	70	75	80	
caa aag ttc aag gac aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc				288
Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser	85	90	95	
aca gcc tac atg cag ctc agc agc ccg aca tct gag gac tct gcg gtc				336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	100	105	110	
tat tac tgt aca aga acg tct atg gcg gac tac tgg ggc caa ggc acc				384
Tyr Tyr Cys Thr Arg Thr Ser Met Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	115	120	125	
act ctc aca gtc tcc tca				402
Thr Leu Thr Val Ser Ser	130			

<210> 35
 <211> 134
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 35

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

<210> 36
 <211> 5

<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 36

Ile Tyr Trp Ile Asn
1 5

<210> 37
<211> 17
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 37

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

Asp

<210> 38
<211> 6
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 38

Thr Ser Met Ala Asp Tyr
1 5

<210> 39
<211> 381
<212> ДНК
<213> homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(381)

<400> 39
atg gta tcc aca cct cag ttc ctt gta ttt ttg ctt ttc tgg att cca 48
Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro
1 5 10 15

gcc tcc aga ggt gac atc ttg ctg act cag tct cca gcc atc ctg tct 96
Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
20 25 30

gtg agt cca gga gaa aga gtc agt ttc tcc tgc agg gcc agt cag agc 144
Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

att ggc aca agc ata cac tgg tat cag caa aga aca aat ggt tct cca 192
Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro
50 55 60

agg ctt ctc ata aag tat gct tct gag tct atc tct ggg atc cct tcc 240
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser

65		70		75		80	
agg ttt agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttt act ctt agc atc aac							288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn							
	85			90		95	
agt gtg gag tct gaa gat att gca gat tat tac tgt caa caa agt aat							336
Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn							
	100			105		110	
agc tgg cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa							381
Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys							
	115			120		125	

<210> 40
 <211> 127
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 40

Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro
1 5 10 15

Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
20 25 30

Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

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

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
85 90 95

Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
100 105 110

Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 41
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 41

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His
1 5 10

<210> 42
<211> 7
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 42

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 43

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 44
<211> 402
<212> ДНК
<213> homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(402)

<400> 44
atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag caa cct ggg tct gag ctg gtg agg 96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg
20 25 30
cct gga gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45
acc agc tac tgg atg cac tgg gtg aag cag agg cat gga caa ggc ctt 192
Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg His Gly Gln Gly Leu
50 55 60
gag tgg att gga aat att tat cct ggt ggt ggt tat act aac tac gat 240
Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asp
65 70 75 80
gag aag ttc aag agc aag ggc aca ctg act gta gac aca tcc tcc agc 288
Glu Lys Phe Lys Ser Lys Gly Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser
85 90 95
aca gcc tac atg cac ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc 336
Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110
tat tac tgt aca aga tca tcc gtt ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc 384
Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Ser Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115

120

125

402

act ctc aca gtc tcc tca
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130

<210> 45
 <211> 134
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 45

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg His Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asp
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Ser Lys Gly Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Ser Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130

<210> 46
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 46

Ser Tyr Trp Met His
 1 5

<210> 47
 <211> 17
 <212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 47

Asn Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 48

<211> 6

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 48

Ser Ser Val Phe Asp Tyr
1 5

<210> 49

<211> 381

<212> ДНК

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(381)

<400> 49

atg gta tcc aca cct cag ttc ctt gta ttt ttg ctt ttc tgg att cca 48
Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro
1 5 10 15

gcc tcc aga ggt gac atc ttg ctg act cag tct cca gcc atc ctg tct 96
Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
20 25 30

gtg agt cca gga gaa aga gtc agt ttc tcc tgc agg gcc agt cag aac 144
Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn
35 40 45

att ggc aca agc ata cac tgg ttt cag caa aga aca aat ggt tct cca 192
Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Phe Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro
50 55 60

agg ctt ctc ata aag tat gct tct gag tct atc tct ggg atc cct tcc 240
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80

agg ttt agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttt act ctt agc atc aac 288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
85 90 95

agt gtg gag tct gaa gat att gca gat tat tac tgt caa caa agt aat 336
Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
100 105 110

agc tgg cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa 381
Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115

120

125

<210> 50
 <211> 127
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 50

Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro
 1 5 10 15

Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
 20 25 30

Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn
 35 40 45

Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Phe Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro
 50 55 60

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
 85 90 95

Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 100 105 110

Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 51
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 51

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Ser Ile His
 1 5 10

<210> 52
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 52

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5

<210> 53
<211> 9
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 53

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 54
<211> 396
<212> ДНК
<213> homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(396)

<400> 54
atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gtg agg 96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30
cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45
acc agc tac tgg ata acc tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt 192
Thr Ser Tyr Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60
gag tgg atc gga aat att tat cct tct gat agt tat act aac tac aat 240
Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80
caa aag ttc agg gac aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agt 288
Gln Lys Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95
aca gcc tac atg cag ctc agc agc ccg aca tct gag gac tct gcg gtc 336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110
tat tac tgt tca gcc ctc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc 384
Tyr Tyr Cys Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
115 120 125
aca gtc tcc tca 396
Thr Val Ser Ser
130

<210> 55
<211> 132
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 55

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
115 120 125

Thr Val Ser Ser
130

<210> 56

<211> 5

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 56

Ser Tyr Trp Ile Thr
1 5

<210> 57

<211> 17

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 57

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

Asp

<210> 58
<211> 4
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 58

Leu Phe Asp Tyr
1

<210> 59
<211> 381
<212> ДНК
<213> homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(381)

<400> 59
atg gta tcc aca cct cag ttc ctt gta ttt ttg ctt ttc tgg att cca 48
Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro
1 5 10 15
gcc tcc aga ggt gac atc ttg ctg act cag tct cca gcc atc ctg tct 96
Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
20 25 30
gtg agt cca gga gaa aga gtc agt ttc tcc tgc agg gcc agt cag agc 144
Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45
att ggc aca agc ata cac tgg tat cag caa aga aca aat ggt tct cca 192
Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro
50 55 60
agg ctt ctc ata aag tat gct tct gag tct atc tct ggg atc cct tcc 240
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80
agg ttt agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttt att ctt agc atc aac 288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Ser Ile Asn
85 90 95
agt gtg gag tct gaa gat att gca gat tat tac tgt caa caa agt aat 336
Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
100 105 110
agc tgg cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa 381
Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 60
<211> 127
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 60

Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro
1 5 10 15

Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser
20 25 30

Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

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

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Ser Ile Asn
85 90 95

Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
100 105 110

Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 61
<211> 11
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 61

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His
1 5 10

<210> 62
<211> 7
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 62

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 63

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 64

<211> 423
<212> ДНК
<213> homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(423)

<400> 64
atg gga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggc 48
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

gtc cac tct gag gtc cag ctt cag cag tca gga cct gag ctg gtg aaa 96
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

cct ggg gcc tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct gga tac aca ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

act gac tac aat atg cac tgg gtg aag cag agc cat gga aag aac ctt 192
Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu
50 55 60

gaa tgg att gga tat att tat cct tac aat ggt ggt act ggc tac aac 240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn
65 70 75 80

cag agg ttc aag agc agg gcc aca atg act gta gac aaa tcc tcc agc 288
Gln Arg Phe Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

aca gcc tac atg gag ctc cgc agc ctg aca tct gat gac tct gca gtc 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val
100 105 110

tat tac tgt gca aga gaa gac tac ggt agt agc ccc tct tat gct atg 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Tyr Ala Met
115 120 125

gac tat tgg ggt caa gga acc tca gtc atc gtc tcc tca 423
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Ile Val Ser Ser
130 135 140

<210> 65
<211> 141
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 65
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Arg Phe Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Tyr Ala Met
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Ile Val Ser Ser
130 135 140

<210> 66
<211> 5
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 66

Asp Tyr Asn Met His
1 5

<210> 67
<211> 17
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 67

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 68
<211> 13
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 68

Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 69

<211> 390
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(390)

<400> 69
 atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 agt ctt gga gat cag gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt 144
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 gta cac ggt aat gga aac acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca 192
 Val His Gly Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg acg gat ttc aca 288
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc 336
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 100 105 110
 tct caa act aca cat gtt ccc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa 384
 Ser Gln Thr Thr His Val Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125
 ata aaa 390
 Ile Lys
 130

<210> 70
 <211> 130
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 70
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

Val His Gly Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
100 105 110

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Ile Lys
130

<210> 71
<211> 16
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 71

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Gly Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 72
<211> 7
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 72

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 73
<211> 8
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 73

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Thr
1 5

<210> 74
<211> 402
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Рекомбинантная ДНК

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(402)

<400> 74
atg ggg tgg agc tgc att atc ctg ttt ctt gtc gca act gca aca ggc 48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

gtt cac tca cag gtt cag cta gtc cag tct gga gct gag gtg aag aaa 96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

cca ggg gca tct gtc aaa gtg agc tgt aag gcc tct ggc tat acg ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

acg ata tac tgg atc aat tgg gtg agg caa gct cct gga caa cgg ttg 192
Thr Ile Tyr Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
50 55 60

gaa tgg att ggc aac atc tat ccc tca gac tcc tac acc aac tac aat 240
Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

cag aag ttc aag gac aaa gcc act ctc acc gta gat acc agt gcc tcc 288
Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser
85 90 95

aca gcc tat atg gag ctg agc agt tta cgc agc gaa gat aca gcg gtg 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

tac tac tgc acc aga acc tcc atg gct gac tat tgg ggt cag ggt aca 384
Tyr Tyr Cys Thr Arg Thr Ser Met Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

ctg gtg act gtg agc tcc 402
Leu Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 75
<211> 134
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> синтетическая конструкция (рекомбинантный белок)

<400> 75
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	
		35					40					45				
Thr	Ile	Tyr	Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	
		50					55					60				
Glu	Trp	Ile	Gly	Asn	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	
		65					70					75				
Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	
				85							90			95		
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	
				100							105			110		
Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Thr	Ser	Met	Ala	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
				115									125			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				130												
<210>		76														
<211>		381														
<212>		ДНК														
<213>		Искусственная														
<220>																
<223>		Рекомбинантная ДНК														
<220>																
<221>		CDS														
<222>		(1) .. (381)														
<400>		76														
atg	gta	agc	aca	ccc	cag	ttc	ctc	gtt	ttc	ctc	ctg	ttt	tgg	att	ccc	
Met	Val	Ser	Thr	Pro	Gln	Phe	Leu	Val	Phe	Leu	Leu	Phe	Trp	Ile	Pro	
1					5					10					15	
gca	agt	aga	ggg	gag	atc	gtc	ttg	act	cag	agt	cct	gcc	aca	ctg	tct	
Ala	Ser	Arg	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	
				20									30			
ctt	tca	cca	gga	gaa	agg	gcg	aca	ctt	agc	tgt	cga	gct	tct	cag	agc	
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	
				35									45			
att	ggc	acg	tcc	ata	cac	tgg	tat	cag	cag	aaa	ccg	gga	caa	gct	cca	
Ile	Gly	Thr	Ser	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	
				50									60			
cgg	tta	ctg	atc	aag	tat	gcc	tcc	gaa	agc	atc	tct	ggg	att	cct	gca	
Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	
				70									75			
cgc	ttt	agc	gga	agc	ggg	agt	ggg	acc	gac	ttc	act	ctg	acc	ata	tcc	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	

	85		90		95	
tca cta gaa ccc gag gat ttt gcc gtg tac tac tgc cag cag tcc aac						336
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn						
	100		105		110	

tca tgg cct ttc acc ttt ggc caa ggc acc aaa gtg gag atc aag						381
Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys						
	115		120		125	

<210> 77
 <211> 127
 <212> Белок
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> синтетическая конструкция (рекомбинантный белок)

 <400> 77

Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe Trp Ile Pro
1 5 10 15

Ala Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
100 105 110

Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 78
 <211> 423
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Рекомбинантная ДНК

<220>
 <221> CDS

<222> (1)..(423)

<400> 78

atg	gga	tgg	tct	tgg	atc	ttt	ctc	ttc	ctg	ctg	tct	ggc	aca	gct	gga	48
Met	Gly	Trp	Ser	Trp	Ile	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	
1				5					10					15		

gtg	cat	tcc	caa	gtt	cag	ctg	gtc	cag	tcc	gga	gct	gaa	gtt	aaa	aag	96
Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	
			20					25					30			

ccc	ggg	gcc	agc	gtc	aaa	gtc	tcc	tgc	aag	gca	tcc	ggg	tat	act	ttt	144
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	
		35					40					45				

acc	gat	tat	aac	atg	cac	tgg	gtg	cgc	caa	gca	ccc	ggc	cag	ggc	ctg	192
Thr	Asp	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	
	50					55					60					

gag	tgg	att	ggc	tat	atc	tat	cct	tat	aat	gga	ggg	acc	ggc	tac	aac	240
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	Gly	Tyr	Asn	
65					70				75						80	

cag	aga	ttc	aag	agc	aga	gcc	acc	atg	aca	gtg	gat	aaa	tct	acc	agc	288
Gln	Arg	Phe	Lys	Ser	Arg	Ala	Thr	Met	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	
			85						90					95		

act	gcc	tac	atg	gag	ctg	aga	agc	ctg	cgg	agc	gac	gac	aca	gcc	gtg	336
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	
			100					105					110			

tac	tac	tgt	gcc	cgc	gag	gat	tac	gga	agc	agc	cca	agc	tac	gcc	atg	384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Asp	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Met	
		115					120					125				

gat	tac	tgg	ggc	caa	ggc	act	atg	gtg	acc	gtg	agc	agc				423
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
	130					135					140					

<210> 79

<211> 141

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> синтетическая конструкция (рекомбинантный белок)

<400> 79

Met	Gly	Trp	Ser	Trp	Ile	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly
1				5					10					15	

Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		

Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
		35					40					45			

Thr	Asp	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	50					55					60				

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Arg Phe Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Tyr Ala Met
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 80
<211> 423
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Рекомбинантная ДНК

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(423)

<400> 80
atg ggc tgg tct tgg atc ttc ctc ttc ctg ctg agc ggg acc gct gga 48
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15
gtc cat tct caa gtc caa ctg gtc cag tcc ggg gct gaa gtg aaa aaa 96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30
cca gga gca tcc gtt aag gtg tcc tgt aag gca agc gga tac acc ttt 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45
acc gac tat aac atg cac tgg gtg agg cag gcc ccc gga cag ggg ctg 192
Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60
gag tgg atc ggc tat att tat cct tac aac ggg ggc act ggc tat aat 240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn
65 70 75 80
cag aga ttt aag agc cgc gct acc atg acc gtg gac acc tcc act tct 288
Gln Arg Phe Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95
aca gcc tat atg gag ctg aga agc ctg cgg agc gat gat aca gcc gtg 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

tac	tac	tgc	gcc	aga	gaa	gat	tac	ggc	agc	agc	ccc	agc	tac	gcc	atg	384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Asp	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Met	
		115					120					125				

gac	tac	tgg	ggc	cag	ggc	aca	atg	gtt	act	gtg	agc	agc	423
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
	130					135					140		

<210> 81
 <211> 141
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетическая конструкция (рекомбинантный белок)

<400> 81

Met	Gly	Trp	Ser	Trp	Ile	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly
1				5					10					15	

Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		

Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
		35					40					45			

Thr	Asp	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	50					55					60				

Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	Gly	Tyr	Asn
65					70					75					80

Gln	Arg	Phe	Lys	Ser	Arg	Ala	Thr	Met	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser
				85					90					95	

Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		

Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Asp	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Met
		115					120					125			

Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser
	130					135					140	

<210> 82
 <211> 390
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Рекомбинантная ДНК

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(390)

<400> 82
 atg aag ctc cca gtg cgc ctc ctg gtc ctg atg ttc tgg att ccc gct 48
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 tcc tct agc gat atc gtc atg acc caa tcc cca ctg tct ctg cct gtg 96
 Ser Ser Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 aca cca ggc gaa cct gca tct att agc tgt aga agc agc cag tcc ctg 144
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 gtg cac gga aac gga aac acc tat ctg cac tgg tac ctg caa aaa cct 192
 Val His Gly Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 gga cag agc ccc cag ctg ctg atc tac aaa gtc agc aat aga ttt agc 240
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 ggg gtg ccc gac agg ttt agc ggc agc ggc agc ggc aca gat ttc acc 288
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 ctg aaa atc tcc cgg gtg gaa gcc gag gac gtt ggg gtt tac tat tgc 336
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 agc cag aca acc cat gtg ccc act ttc ggg ggc ggc act aag gtg gag 384
 Ser Gln Thr Thr His Val Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
 115 120 125
 atc aag 390
 Ile Lys
 130

<210> 83
 <211> 130
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетическая конструкция (рекомбинантный белок)

<400> 83
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

Val	His	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro
50						55					60				
Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
65					70					75					80
Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
				85					90					95	
Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys
			100					105					110		
Ser	Gln	Thr	Thr	His	Val	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
		115					120					125			
Ile	Lys														
	130														

<210> 84
 <211> 563
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (102)..(458)

<400> 84	
aaccacatcc ctccctcagaa gccccagag cacaactcct taccatggac tggacctgga	60
ggatcctctt tttggtggca gcagccacag gtgcccactc c cag gtc cag ctt gtg	116
	Gln Val Gln Leu Val
	1 5
cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc	164
Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser	
	10 15 20
tgc aag gct tct gga tac acc ttc act aac tat gct ctg cat tgg gtg	212
Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Ala Leu His Trp Val	
	25 30 35
cgc cag gcc ccc gga caa agg ctt gag tgg atg gga tgg atc aac act	260
Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr	
	40 45 50
ggc aat ggt aac aca aaa tat tca cag aag ttc cag ggc aga gtc acc	308
Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr	
	55 60 65
ctt acc agt gac aca tcc gcg agc aca gcc tac atg gag atg agc agc	356
Leu Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Met Ser Ser	
	70 75 80 85
ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac tgt gcg agg agc agt ggc	404
Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ser Gly	
	90 95 100

tgg tac gtt tgg ttc gac ccc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc	452
Trp Tyr Val Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
105 110 115	

tcc tca gcttccacca agggcccatc ggttttcccc ctggcgcctt gctccaggag	508
Ser Ser	

cacctctggg ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaa	563
---	-----

<210> 85
 <211> 119
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 85

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 Tyr	
20 25 30	

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 86
 <211> 384
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(384)

<400> 86

atg gaa gtc ctc gtg cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca	48
Met Glu Val Leu Val Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro	

1	5	10	15	
gat acc acc gga gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct				96
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser	20	25	30	
ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt				144
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser	35	40	45	
gtt agc agc tac tta gcc tgg tat caa cag aaa cct gcc cag gct ccc				192
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro	50	55	60	
agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act gcc atc cca gcc				240
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala	65	70	75	80
agg ttc agt gcc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc				288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	85	90	95	
agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc				336
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser	100	105	110	
aac tgg cct cgg tcg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cga				384
Asn Trp Pro Arg Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg	115	120	125	

<210> 87
 <211> 128
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 87

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

Asn	Trp	Pro	Arg	Ser	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
		115					120					125			

<210> 88
 <211> 601
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (112) .. (477)

<400> 88	
acccaaaaaac cacacccctc cttgggagaa tcccctagat cacagctcct caccatggac	60
tggacctgga gcatacctttt cttggtggca gcagcaacag gtgccactc c cag gtt	117
	Gln Val
	1
cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc tca gtg	165
Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val	
5 10 15	
aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt acc agt tat ggt atc	213
Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile	
20 25 30	
agt tgg gtg cgc cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg gga ttg	261
Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Leu	
35 40 45 50	
atc agc gct tac aat ggt aac aca aac tat gca cag aag ctc cag ggc	309
Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly	
55 60 65	
aga gtc acc atg acc gta gac acg tct acg agc aca gcc tat atg gaa	357
Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu	
70 75 80	
ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtc tat tac tgt gcg aga	405
Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg	
85 90 95	
gat gga ata gca gtg gcg acc aaa gat gct ttt gat atc tgg ggc caa	453
Asp Gly Ile Ala Val Ala Thr Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln	
100 105 110	
ggg aca atg gtc acc gtc tct tca gcacccacca aggctccgga tgtgttcccc	507
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
115 120	
atcatatcag ggtgcagaca cccaaaggat aacagccctg tggctcctggc atgcttgata	567
actgggtacc acccaacgtc cgtgactgtc acct	601

<210> 89
 <211> 122
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 89

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val 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 Gly Ile Ala Val Ala Thr Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 90

<211> 342

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(342)

<400> 90

gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctg cat agt 96
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat ttg ggt tct aat cgg gcc tcc ggg gtc cct 192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65	70	75	80	
agc agg gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc atg caa gct				288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala	85	90	95	
cta caa act ctg ggg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc				336
Leu Gln Thr Leu Gly Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile	100	105	110	
aaa cga				342
Lys Arg				

<210> 91
 <211> 114
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 91

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser			
20 25 30			

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
35 40 45			

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

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

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

Leu Gln Thr Leu Gly Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile			
100 105 110			

Lys Arg

<210> 92
 <211> 115
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> рекомбинантный белок

<400> 92

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 Ile Tyr
20 25 30

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

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala 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

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

Val Ser Ser
115

<210> 93
<211> 107
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> рекомбинантный белок

<400> 93

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 Ile Gly Thr Ser
20 25 30

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

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser 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 Ser Asn Ser Trp Pro Phe
85 90 95

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

<210> 94
<211> 122
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> рекомбинантный белок

<400> 94

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 Asp Tyr
20 25 30

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

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

Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys 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 Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 95
<211> 122
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> рекомбинантный белок

<400> 95

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 Asp Tyr
20 25 30

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

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

Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Val 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 Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 96

<211> 111

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> рекомбинантный белок

<400> 96

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Gly
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 97
<211> 134
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> синтетическая конструкция (рекомбинантный белок)

<400> 97

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ile Tyr Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Thr Ser Met Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 98
<211> 115
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> рекомбинантный белок

<400> 98

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 Ile Tyr
20 25 30

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

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala 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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 99
 <211> 420
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Рекомбинантная ДНК

<220>
 <221> CDS
 <222> (13)..(414)

<400> 99
 gaattcacca cc atg gga tgg tcc tgc att att ctc ttt ctc gtc gcc acc 51
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr
 1 5 10

gcc aca ggc gtg cac agc cag gtt caa ctg cag caa cct ggg gca gag 99
 Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu
 15 20 25

ctg gtt cgg cca ggg gcc tcc gtc aaa ctg tcc tgc aaa gct tct ggc 147
 Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 30 35 40 45

tac act ttc acc atc tac tgg atc aac tgg gtg aag cag agg ccc ggc 195
 Tyr Thr Phe Thr Ile Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
 50 55 60

cag ggc ctg gaa tgg atc gga aat atc tat cct agc gat tct tac aca 243
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr
 65 70 75

aat tac aac cag aag ttc aag gac aag gct acc ctg acc gtg gac aaa 291
 Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys
 80 85 90

tct agc tcc aca gcc tac atg cag ctg agc agc ccc act agc gag gat 339
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp

95	100	105	
agc gca gtg tat tat tgt acc aga acc agc atg gcc gac tat tgg gga			387
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Thr Ser Met Ala Asp Tyr Trp Gly			
110	115	120	125

cag ggc aca act ctg acc gtg agc agc gctagc	420
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	
130	

<210> 100
 <211> 399
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Рекомбинантная ДНК

<220>
 <221> CDS
 <222> (13) .. (393)

<400> 100	
accggtacca cc atg gtt agc aca cct caa ttt ctg gtc ttc ctg ctc ttc	51
Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Val Phe Leu Leu Phe	
1 5 10	

tgg att cct gcc agc aga gga gat atc ctc ctg aca caa agc ccc gca	99
Trp Ile Pro Ala Ser Arg Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala	
15 20 25	

atc ctg agc gtg tcc ccc gga gag cgc gtg agc ttt agc tgc cgg gcc	147
Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala	
30 35 40 45	

agc cag agc att gga acc agc atc cac tgg tat cag cag aga acc aac	195
Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn	
50 55 60	

ggg tct ccc agg ctg ctg att aaa tac gct tct gag tct att tcc ggg	243
Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly	
65 70 75	

atc cca agc aga ttc tcc ggc tct ggc agc ggc act gat ttt act ctg	291
Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu	
80 85 90	

tct atc aac agc gtg gag tcc gaa gac atc gcc gac tac tat tgt cag	339
Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln	
95 100 105	

cag agc aat tcc tgg cca ttc acc ttt ggc agc ggc acc aag ctg gaa	387
Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu	
110 115 120 125	

atc aag cgtacg	399
Ile Lys	

<210> 101
 <211> 30

<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 101

Asn	Lys	Met	Thr	Val	Cys	Ser	Pro	Asp	Gly	Pro	Gly	Gly	Arg	Cys	Gln
1				5					10					15	

Cys	Arg	Ala	Leu	Gly	Ser	Gly	Met	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Thr
			20					25					30

<210> 102
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 102

Thr	Val	Cys	Ser	Pro	Asp	Gly	Pro	Gly	Gly	Arg	Cys	Gln	Cys	Arg	Ala
1				5					10					15	

Leu	Gly	Ser	Gly	Met	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Thr	Leu	Thr	Ser
			20					25					30

<210> 103
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 103

Thr	Asn	Lys	Met	Thr	Val	Cys	Ser	Pro	Asp	Gly	Pro	Gly	Gly	Arg	Cys
1				5					10					15	

Gln	Cys	Arg	Ala	Leu	Gly	Ser	Gly	Met	Ala	Val	Asp	Cys	Ser
			20					25					30

<210> 104
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 104

Met	Thr	Val	Cys	Ser	Pro	Asp	Gly	Pro	Gly	Gly	Arg	Cys	Gln	Cys	Arg
1				5					10					15	

Ala	Leu	Gly	Ser	Gly	Met	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Thr	Leu	Thr
			20					25					30

<210> 105
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 105

Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys
1 5 10 15

Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu
20 25 30

<210> 106
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 106

Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg
1 5 10 15

Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys
20 25 30

<210> 107
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 107

Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu
1 5 10 15

Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser Lys
20 25 30

<210> 108
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 108

Cys Ala Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg
1 5 10 15

Cys Ala Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg
20 25 30

Cys

<210> 109
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 109

Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly
1 5 10 15

Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp
20 25 30

<210> 110
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 110

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
20 25 30

Cys

<210> 111
<211> 32
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 111

His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Cys
1 5 10 15

His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Cys
20 25 30

<210> 112
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 112

Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His Pro Lys Phe Val Ala Ala
1 5 10 15

Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln
20 25 30

<210> 113
<211> 15
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 113

Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln
1 5 10 15

<210> 114
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 114

Cys Ala Gly Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 115
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 115

Cys Pro Lys Phe Val Ala Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln
1 5 10 15

Cys Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 116
<211> 23
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 116

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
1 5 10 15

Cys Gly Leu Asp Leu Arg Val
20

<210> 117
<211> 15
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 117

Phe Gln Gly Arg Gly Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro
1 5 10 15

<210> 118
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 118

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
20 25 30

Cys

<210> 119
<211> 23
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 119

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
1 5 10 15

Cys Arg Gly Glu Pro Leu Gln
20

<210> 120
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 120

Cys Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn Thr Ser Gln Lys Ala Ala
1 5 10 15

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
20 25 30

Cys

<210> 121
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 121

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

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

<400> 122

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 123
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 123

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
1 5 10 15

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
20 25 30

Cys

<210> 124
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 124

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
1 5 10 15

Cys Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 125
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 125

Cys	Asp	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Leu	Phe	Arg	Glu	Arg	Tyr	Arg	Leu	His
1				5					10					15	

Cys	Asp	Glu	Leu	Val	Arg	Thr	His	His	Ile	Leu	Ile	Asp	Leu	Arg	His
			20					25					30		

Cys

<210> 126
<211> 17
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 126

Cys	Val	His	Tyr	Glu	Gln	Pro	Thr	Ile	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Gln	Asn
1				5					10					15	

Cys

<210> 127
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 127

Cys	Ala	Phe	Asn	His	Ser	Asp	Leu	Asp	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Leu	Phe
1				5					10					15	

Cys	Val	His	Tyr	Glu	Gln	Pro	Thr	Ile	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Gln	Asn
			20					25					30		

Cys

<210> 128
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 128

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 129

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 129

Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
1 5 10 15

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
20 25 30

Cys

<210> 130

<211> 32

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 130

Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn Cys
1 5 10 15

Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg Cys
20 25 30

<210> 131

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 131

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
1 5 10 15

Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
20 25 30

Cys

<210> 132
<211> 32
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 132

Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Cys
1 5 10 15

Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Cys
20 25 30

<210> 133
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 133

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
1 5 10 15

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
20 25 30

Cys

<210> 134
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 134

Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys
1 5 10 15

Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser
20 25 30

<210> 135
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 135

Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln
1 5 10 15

Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr

20

25

30

<210> 136
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 136

Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys
 1 5 10 15

Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu
 20 25 30

<210> 137
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 137

Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr
 20 25 30

<210> 138
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 138

Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp
 20 25 30

<210> 139
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 139

Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala
 1 5 10 15

Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser
 20 25 30

<210> 140

<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 140

Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly
1 5 10 15

Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val
20 25 30

<210> 141
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 141

Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg
1 5 10 15

Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys
20 25 30

<210> 142
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 142

Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu
1 5 10 15

Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser Lys
20 25 30

<210> 143
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 143

Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly
1 5 10 15

Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser Lys Cys
20 25 30

<210> 144
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 144

Cys Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro
1 5 10 15

Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala
20 25 30

<210> 145

<211> 30

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 145

Asn Cys Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly
1 5 10 15

Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met
20 25 30

<210> 146

<211> 30

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 146

Asp Asn Cys Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp
1 5 10 15

Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly
20 25 30

<210> 147

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 147

Cys Thr Val Ala Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Ala Gln Ala Arg
1 5 10 15

Cys Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Ala Ser Thr Leu Thr Ser Lys
20 25 30

Cys

<210> 148

<211> 30

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 148

Gln Asp Asn Cys Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro
1 5 10 15

Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser
20 25 30

<210> 149

<211> 30

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 149

Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser
1 5 10 15

Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser Lys Cys Leu
20 25 30

<210> 150

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 150

Cys Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg
1 5 10 15

Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Ala Ser Thr
20 25 30

Cys

<210> 151

<211> 15

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 151

Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg
1 5 10 15

<210> 152

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 152

Cys Ala Pro Lys Asn Ala Arg Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala
1 5 10 15

Cys Ala Arg Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala Leu Val Asp Asn
20 25 30

Cys

<210> 153
<211> 32
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 153

His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Cys
1 5 10 15

His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Cys
20 25 30

<210> 154
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 154

Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala
1 5 10 15

Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser
20 25 30

<210> 155
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 155

Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln
1 5 10 15

Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr
20 25 30

<210> 156
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 156

Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys
1 5 10 15

Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser
20 25 30

<210> 157
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 157

Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr
20 25 30

<210> 158
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 158

Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys
1 5 10 15

Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu
20 25 30

<210> 159
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 159

Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly
1 5 10 15

Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp
20 25 30

<210> 160
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 160

Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg
1 5 10 15

Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys
20 25 30

<210> 161
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 161

Cys Ala Gly Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 162
<211> 17
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 162

Cys Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly
1 5 10 15

Cys

<210> 163
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 163

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 164
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 164

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 165
<211> 32
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 165

His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Cys
1 5 10 15

His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Cys
20 25 30

<210> 166
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 166

Cys Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 167
<211> 19
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 167

Cys Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His
1 5 10 15

Cys Pro Lys

<210> 168
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 168

Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu
1 5 10 15

Gly Ser Gly Met Ala Val Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser Lys
20 25 30

<210> 169

<211> 30

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 169

Asp Leu Ser Leu Arg Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu
1 5 10 15

Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala Phe Asn His
20 25 30

<210> 170

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 170

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
1 5 10 15

Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
20 25 30

Cys

<210> 171

<211> 17

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 171

Cys Phe Gln Gly Arg Gly Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro
1 5 10 15

Cys

<210> 172

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 172

Cys Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His
1 5 10 15

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
20 25 30

Cys

<210> 173

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 173

Cys Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 174

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 174

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 175

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 175

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala

20

25

30

Cys

<210> 176
 <211> 33
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 176

Cys Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His
 1 5 10 15

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
 20 25 30

Cys

<210> 177
 <211> 33
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 177

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
 1 5 10 15

Cys Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg Thr Leu Ile Tyr Tyr Leu
 20 25 30

Cys

<210> 178
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 178

Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu
 1 5 10 15

<210> 179
 <211> 33
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 179

Cys Thr Val Ala Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Ala Gln Ala Arg

1	5	10	15
Cys Val His	Tyr Glu Gln Pro Thr	Ile Gln Ile Glu Leu Arg	Gln Asn
	20	25	30

Cys

<210> 180
 <211> 33
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 180

Cys His His	Ile Leu Ile Asp Leu Arg	His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
1	5	10 15

Cys Val His	Tyr Glu Gln Pro Thr	Ile Gln Ile Glu Leu Arg	Gln Asn
	20	25	30

Cys

<210> 181
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 181

Leu Ser Leu Arg	Cys Asp Glu Leu Val	Arg Thr His His Ile Leu Ile
1	5	10 15

Asp Leu Arg	His Arg Pro Thr Ala Gly	Ala Phe Asn His Ser
	20	25 30

<210> 182
 <211> 33
 <212> Белок
 <213> homo sapiens

<400> 182

Cys Asp Glu Leu Val	Arg Thr His His Ile Leu Ile	Asp Leu Arg His
1	5	10 15

Cys His Ser	Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg	Arg Leu Phe Arg Glu Arg
	20	25 30

Cys

<210> 183
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 183

Cys Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
1 5 10 15

Cys Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr
20 25 30

Cys

<210> 184
<211> 15
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 184

Pro Asp Cys Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Cys Asn
1 5 10 15

<210> 185
<211> 31
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 185

Cys Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Cys Pro
1 5 10 15

Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Cys
20 25 30

<210> 186
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 186

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
1 5 10 15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
20 25 30

Cys

<210> 187
<211> 15
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 187

Val Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala
1 5 10 15

<210> 188
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 188

Cys Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
1 5 10 15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
20 25 30

Cys

<210> 189
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 189

Cys Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr
1 5 10 15

Cys Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
20 25 30

Cys

<210> 190
<211> 15
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 190

Asp Cys Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Cys Asn Gln
1 5 10 15

<210> 191
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 191

Cys Thr Val Ala Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Ala Gln Ala Arg
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 192

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 192

Cys Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln
1 5 10 15

Cys Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln
20 25 30

Cys

<210> 193

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 193

Cys Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr Ser Val Ala Trp
1 5 10 15

Cys Ala Arg Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala Leu Val Asp Asn
20 25 30

Cys

<210> 194

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 194

Cys Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr
1 5 10 15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
20 25 30

Cys

<210> 195
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 195

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
1 5 10 15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
20 25 30

Cys

<210> 196
<211> 15
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 196

Cys Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu
1 5 10 15

<210> 197
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 197

Cys Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr Ser Val Ala
1 5 10 15

Cys Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr Ser Val Ala
20 25 30

Cys

<210> 198
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 198

Cys Thr Val Ala Ser Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Ala Gln Ala Arg
1 5 10 15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
20 25 30

Cys

<210> 199
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 199

Cys Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala
1 5 10 15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
20 25 30

Cys

<210> 200
<211> 31
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 200

Asp Pro Asp Cys Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Cys Asn
1 5 10 15

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

<210> 201
<211> 32
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 201

Cys Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr Ser Val
1 5 10 15

Cys Asp Glu Leu Val Arg His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Cys
20 25 30

<210> 202
<211> 33
<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 202

Cys Pro Asp Gly Pro Gly Gly Arg Ala Gln Ala Arg Ala Leu Gly Ser
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 203

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 203

Cys Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala Leu Val Asp Asn Asp Gly
1 5 10 15

Cys Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr Ser Val Ala Trp
20 25 30

Cys

<210> 204

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 204

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
1 5 10 15

Cys Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
20 25 30

Cys

<210> 205

<211> 33

<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 205

Cys Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala
1 5 10 15

Cys Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr Ser Val
20 25 30

Cys

<210> 206
<211> 15
<212> Бeлoк
<213> homo sapiens

<400> 206

Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
1 5 10 15

<210> 207
<211> 33
<212> Бeлoк
<213> homo sapiens

<400> 207

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
1 5 10 15

Cys Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn Gln Thr
20 25 30

Cys

<210> 208
<211> 15
<212> Бeлoк
<213> homo sapiens

<400> 208

Cys Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Cys Asn Gln Thr
1 5 10 15

<210> 209
<211> 33
<212> Бeлoк
<213> homo sapiens

<400> 209

Cys Val Asn Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser
1 5 10 15

Cys Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln
20 25 30

Cys

<210> 210
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 210

Cys	Ser	Val	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Asp	Lys	Gly	Asp	Leu	Ser	Leu	Arg
1				5					10					15	

Cys	Tyr	Asp	Pro	Asp	Ala	Asp	Pro	Glu	Gly	Arg	Phe	Lys	Ala	Arg	Gln
			20					25					30		

Cys

<210> 211
<211> 32
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 211

His	Ser	Asp	Leu	Asp	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Leu	Phe	Arg	Glu	Arg	Cys
1				5					10					15	

His	Ser	Asp	Leu	Asp	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Leu	Phe	Arg	Glu	Arg	Cys
			20					25					30		

<210> 212
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 212

Cys	Asp	Glu	Leu	Val	Arg	Thr	His	His	Ile	Leu	Ile	Asp	Leu	Arg	His
1				5					10					15	

Cys	Asp	Leu	Asp	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Leu	Phe	Arg	Glu	Arg	Tyr	Arg
			20					25					30		

Cys

<210> 213
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 213

Cys Val Asn Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser
1 5 10 15

Leu Arg Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile
20 25 30

<210> 214
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 214

Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg Cys Asp Glu Leu
1 5 10 15

Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro
20 25 30

<210> 215
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 215

Cys Val Glu Arg Thr Leu Ile Tyr Tyr Leu Asp Glu Ile Pro Pro Lys
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 216
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 216

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 217
<211> 33

<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 217

Cys Val Asn Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser
1 5 10 15

Cys Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala Arg Gln Ala Asn
20 25 30

Cys

<210> 218
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 218

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 219
<211> 30
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 219

Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg Cys Asp
1 5 10 15

Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
20 25 30

<210> 220
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 220

Cys Ala Gly Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg
1 5 10 15

Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 221
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 221

Cys	Ser	Val	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Asp	Lys	Gly	Asp	Leu	Ser	Leu	Arg
1				5					10					15	

Cys	Pro	Asp	Ala	Asp	Pro	Glu	Gly	Arg	Phe	Lys	Ala	Arg	Gln	Ala	Asn
			20					25					30		

Cys

<210> 222
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 222

Cys	Val	Arg	Pro	Ser	Glu	His	Ala	Leu	Val	Asp	Asn	Asp	Gly	Leu	Tyr
1				5					10					15	

Cys	Ser	Val	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Asp	Lys	Gly	Asp	Leu	Ser	Leu	Arg
			20					25					30		

Cys

<210> 223
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 223

Cys	Asp	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Leu	Phe	Arg	Glu	Arg	Tyr	Arg	Leu	His
1				5					10					15	

Cys	His	Ser	Asp	Leu	Asp	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Leu	Phe	Arg	Glu	Arg
			20					25					30		

Cys

<210> 224

<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 224

Cys Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg
1 5 10 15

Cys Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe
20 25 30

Cys

<210> 225
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 225

Cys Val Asn Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser
1 5 10 15

Cys Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Ala Asp Pro Glu Gly Arg Phe Lys Ala
20 25 30

Cys

<210> 226
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 226

Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
1 5 10 15

Cys His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg
20 25 30

Cys

<210> 227
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 227

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His

1 5 10 15
Cys His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His Arg Pro Thr Ala Gly Ala
20 25 30

Cys

<210> 228
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 228

Cys Ala Gly Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg
1 5 10 15

Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
20 25 30

Cys

<210> 229
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 229

Cys Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His
1 5 10 15

Cys Asp Glu Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
20 25 30

Cys

<210> 230
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 230

Cys Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
1 5 10 15

Cys Asp Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
20 25 30

Cys

<210> 231
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 231

Cys	His	His	Ile	Leu	Ile	Asp	Leu	Arg	His	Arg	Pro	Thr	Ala	Gly	Ala
1				5					10					15	

Cys	Val	His	Tyr	Glu	Gln	Pro	Thr	Ile	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Gln	Asn
			20					25					30		

Cys

<210> 232
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 232

Cys	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Asp	Lys	Gly	Asp	Leu	Ser	Leu	Arg	Ala	Asp
1				5					10					15	

Cys	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Asp	Lys	Gly	Asp	Leu	Ser	Leu	Arg	Ala	Asp
			20					25					30		

Cys

<210> 233
<211> 33
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 233

Cys	Gly	Leu	Asp	Leu	Arg	Val	Arg	Gly	Glu	Pro	Leu	Gln	Val	Glu	Arg
1				5					10					15	

Cys	His	His	Ile	Leu	Ile	Asp	Leu	Arg	His	Arg	Pro	Thr	Ala	Gly	Ala
			20					25					30		

Cys

<210> 234
<211> 33
<212> Белок

<213> homo sapiens

<400> 234

Cys	Asp	Leu	Asp	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Leu	Phe	Arg	Glu	Arg	Tyr	Arg
1				5					10					15	

Cys	Asp	Glu	Leu	Val	Arg	Thr	His	His	Ile	Leu	Ile	Asp	Leu	Arg	His
			20					25					30		

Cys

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против TROP-2 человека, в котором V-область Н-цепи антитела состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:92 или 98, и V-область L-цепи антитела состоит из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:93.

2. Антитело по п.1, в котором аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области Н-цепи антитела показаны в SEQ ID NO:36-38, соответственно, и/или аминокислотные последовательности CDR 1-3 V-области L-цепи антитела показаны в SEQ ID NO:41-43, соответственно.

3. Антитело по п.1 или 2, которое представляет собой гуманизированное антитело.

4. Антитело по любому из пп.1-3, которое обладает противоопухолевой активностью *in vivo*.

5. Антитело по любому из пп.1-4, которое проявляет активность, ингибирующую рост опухолей на 50% или больше, в дозе от 5 до 20 мг/кг массы тела.

6. Антитело по п.5, в котором частота введения для проявления ингибирующей рост опухоли активности составляет не более одного раза в неделю.

7. Антитело по любому из пп.1-4, которое проявляет активность, ингибирующую рост опухолей на 50% или больше, при однократном введении антитела в дозе 10 мг/кг массы тела.

8. Антитело по любому из пп.1-7, которое обладает противоопухолевой активностью по отношению к двум или более типам линий опухолевых клеток человека.

9. Антитело по любому из пп.1-8, в котором константа диссоциации (значение K_d) составляет $1,0 \times 10^{-10}$ М или меньше.

10. Антитело по любому из пп.1-9, которое является моноклональным антителом.

11. Антитело по любому из пп.4-10, в котором опухоль относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной

железы человека, рака яичника человека, рака легкого человека и рака желчных протоков человека.

12. Антитело по любому из пп.4-10, в котором опухоль относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака легкого человека, рака молочной железы человека и рака яичника человека.

13. Антитело по любому из пп.4-12, в котором опухоль представляет собой рекуррентную злокачественную опухоль или метастатическую злокачественную опухоль.

14. Антитело по любому из пп.8-13, в котором линии опухолевых клеток относятся по меньшей мере к двум типам, выбранным из группы, состоящей из линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека ВхРС-3, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека КР-3L, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека КР-2, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-1, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-45Н, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека РК-45Р, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека ТСС-PAN2, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека SUIT-2, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека САСО-2, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека DLD-1, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека НСТ 116, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека JIMT-1, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека НСС1143, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MCF-7, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MDA-MB-468, линии клеток злокачественной опухоли простаты человека DU145, линии клеток злокачественной опухоли простаты человека РС-3, линии клеток злокачественной

опухоли яичника человека SK-OV-3, линии клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3 и линии клеток злокачественной опухоли желчных протоков человека TFK-1.

15. Антитело по любому из пп.8-13, в котором линии опухолевых клеток относятся по меньшей мере к двум типам, выбранным из группы, состоящей из линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека PK-59, линии клеток злокачественной опухоли поджелудочной железы человека BxPC-3, линии клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека SW480, линии клеток злокачественной опухоли легкого человека Calu-3, линии клеток злокачественной опухоли молочной железы человека MDA-MB-468 и линии клеток злокачественной опухоли яичника человека SK-OV-3.

16. Фрагмент антитела, способный связываться с TROP-2 человека, полученный из антитела по любому из пп.1-15.

17. Фрагмент антитела по п.16, который содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:92 или 98, и/или аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:93.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство, который содержит антитело по любому из пп.1-15 и вещество, обладающее противоопухолевой активностью и/или активностью, вызывающей гибель клеток.

19. Конъюгат фрагмент антитела-лекарственное средство, который содержит фрагмент антитела по п.16 или 17 и вещество, обладающее противоопухолевой активностью и/или активностью, вызывающей гибель клеток.

20. Конъюгат по п. 18 или 19, в котором опухоль относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака яичника человека, рака легкого человека и рака желчных протоков человека.

21. Конъюгат по п. 18 или 19, в котором опухоль относится, по меньшей мере, к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака прямой и ободочной

кишки человека, рака легкого человека, рака молочной железы человека и рака яичника человека.

22. Конъюгат по любому из пп.18-21, в котором опухоль представляет собой рекуррентную злокачественную опухоль или метастатическую злокачественную опухоль.

23. Фармацевтическая композиция, применяемая при лечении опухоли, которая содержит по меньшей мере один тип средства, выбранный из группы, состоящей из антитела по любому из пп.1-15, фрагмента антитела по п.16 или 17 и конъюгата по любому из пп.18-22.

24. Композиция по п.23, которая не вызывает снижения массы в качестве побочного эффекта.

25. Фармацевтическая композиция, применяемая для диагностики опухоли, которая содержит по меньшей мере один тип средства, выбранный из группы, состоящей из антитела по любому из пп.1-15, фрагмента антитела по п.16 или 17 и конъюгата по любому из пп.18-22.

26. Композиция по любому из пп.23-25, в котором опухоль относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака яичника человека, рака легкого человека и рака желчных протоков человека.

27. Композиция по любому из пп.23-26, в котором опухоль представляет собой рекуррентную злокачественную опухоль или метастатическую злокачественную опухоль.

28. Противоопухолевое терапевтическое средство, которое содержит по меньшей мере один тип средства, выбранный из группы, состоящей из антитела по любому из пп.1-15, фрагмента антитела по п.16 или 17 и конъюгата по любому из пп.18-22.

29. Терапевтическое средство по п.28, которое не вызывает снижения массы в качестве побочного эффекта.

30. Терапевтическое средство по п.28 или 29, в котором опухоль относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака

молочной железы человека, рака яичника человека, рака легкого человека и рака желчных протоков человека.

31. Средство для диагностики опухоли, которое содержит по меньшей мере один тип средства, выбранного из группы, состоящей из антитела по любому из пп.1-15, фрагмента антитела по п. 16 или 17 и конъюгата по любому из пп.18-22.

32. Средство для диагностики по п.31, в котором опухоль относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака яичника человека, рака легкого человека и рака желчных протоков человека.

33. Способ выявления опухоли, который включает: обеспечение возможности для взаимодействия по меньшей мере одного типа средства, выбранного из группы, состоящей из антитела по любому из пп.1-15, фрагмента антитела по п.16 или 17 и конъюгата по любому из пп.18-22, с образцом, полученным из живого организма; и затем регистрацию сигнала(ов) вступившего во взаимодействие антитела и/или фрагмента антитела.

34. Способ по п.33, в котором опухоль относится по меньшей мере к одному типу, выбранному из группы, состоящей из рака поджелудочной железы человека, рака простаты человека, рака прямой и ободочной кишки человека, рака молочной железы человека, рака яичника человека, рака легкого человека и рака желчных протоков человека.

35. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп.1-15.

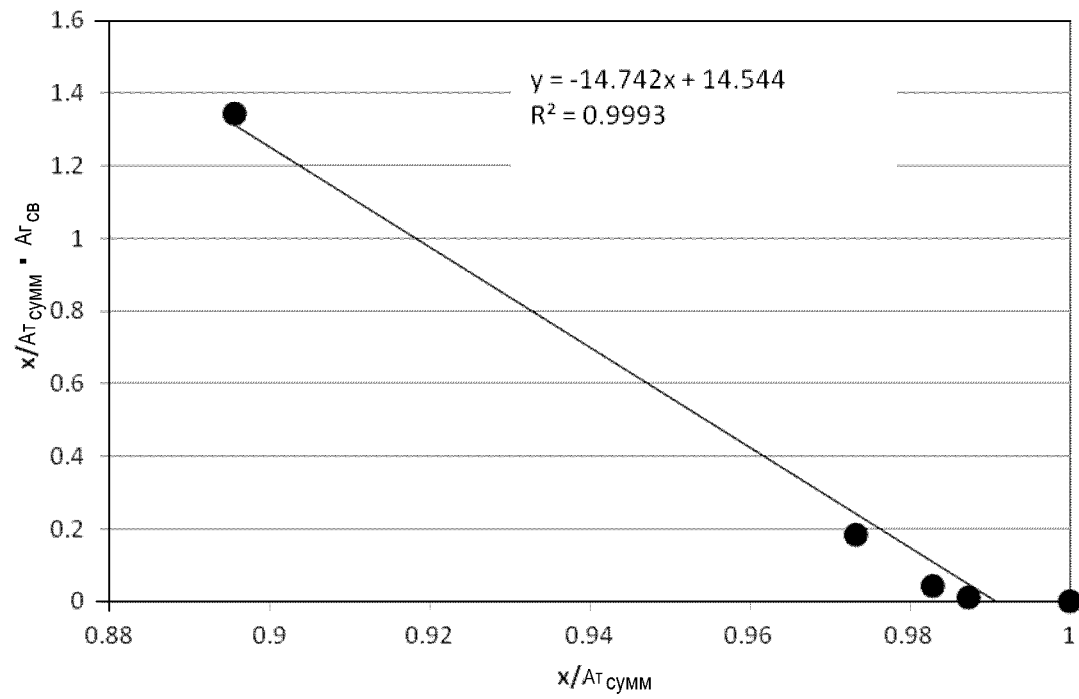
36. Полинуклеотид, кодирующий фрагмент антитела по п.16 или 17.

37. Рекомбинантный вектор, содержащий полинуклеотид по п.35 или 36.

38. Трансформант, содержащий рекомбинантный вектор по п.37.

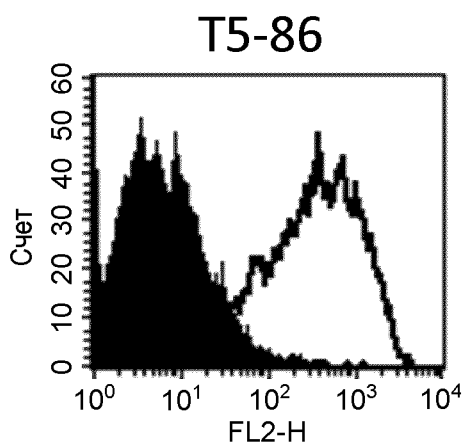
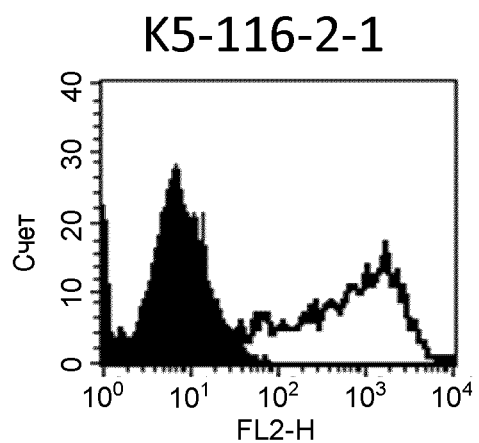
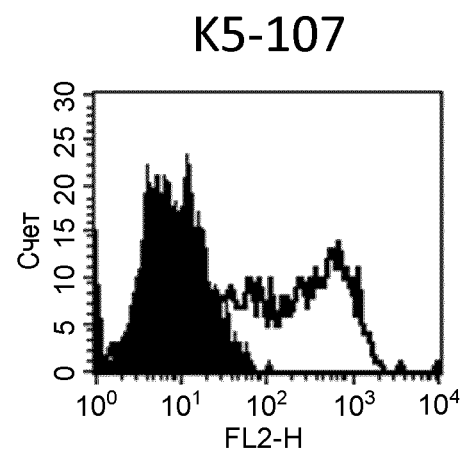
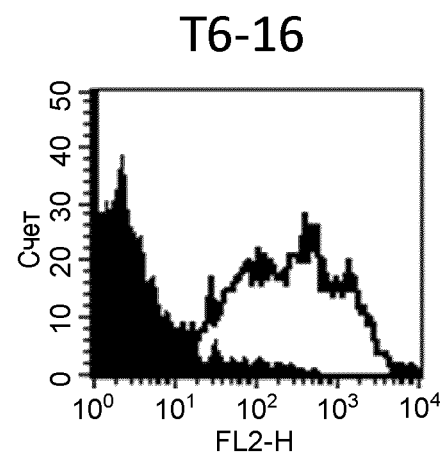
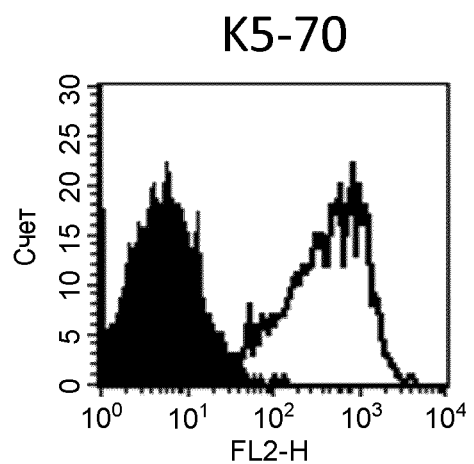
По доверенности

Аффинность



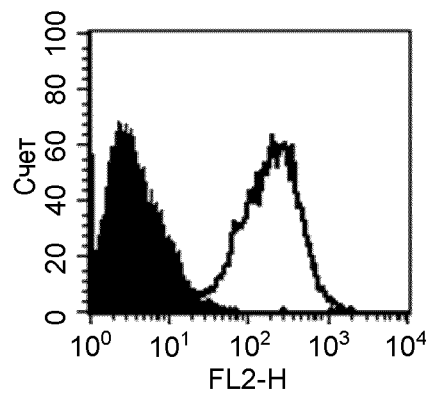
ФИГ.1

Фиг. 2

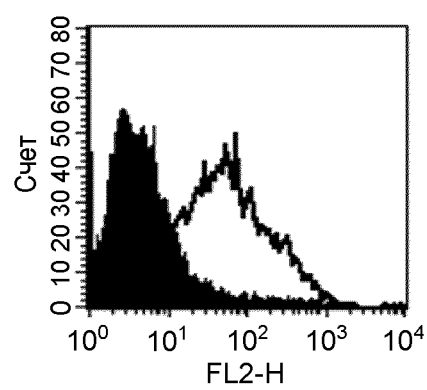


PK-59

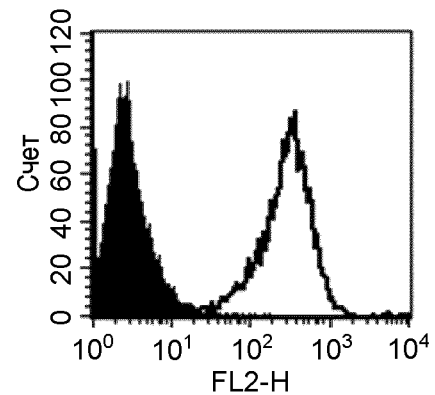
K5-70



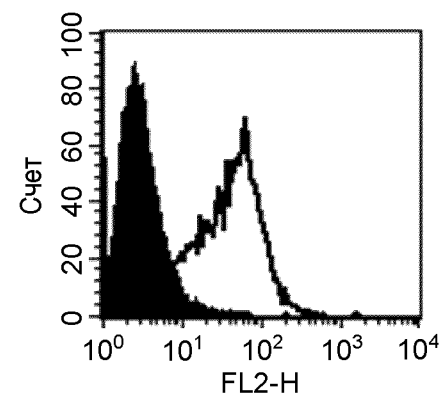
K5-116-2-1



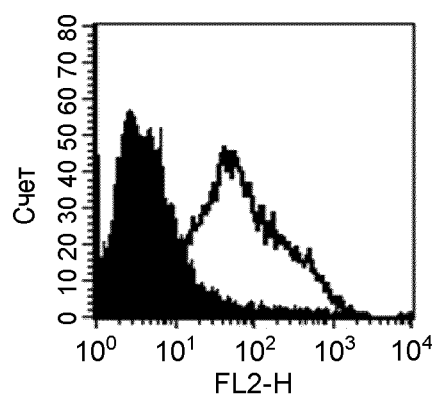
K5-107



T5-86



T6-16

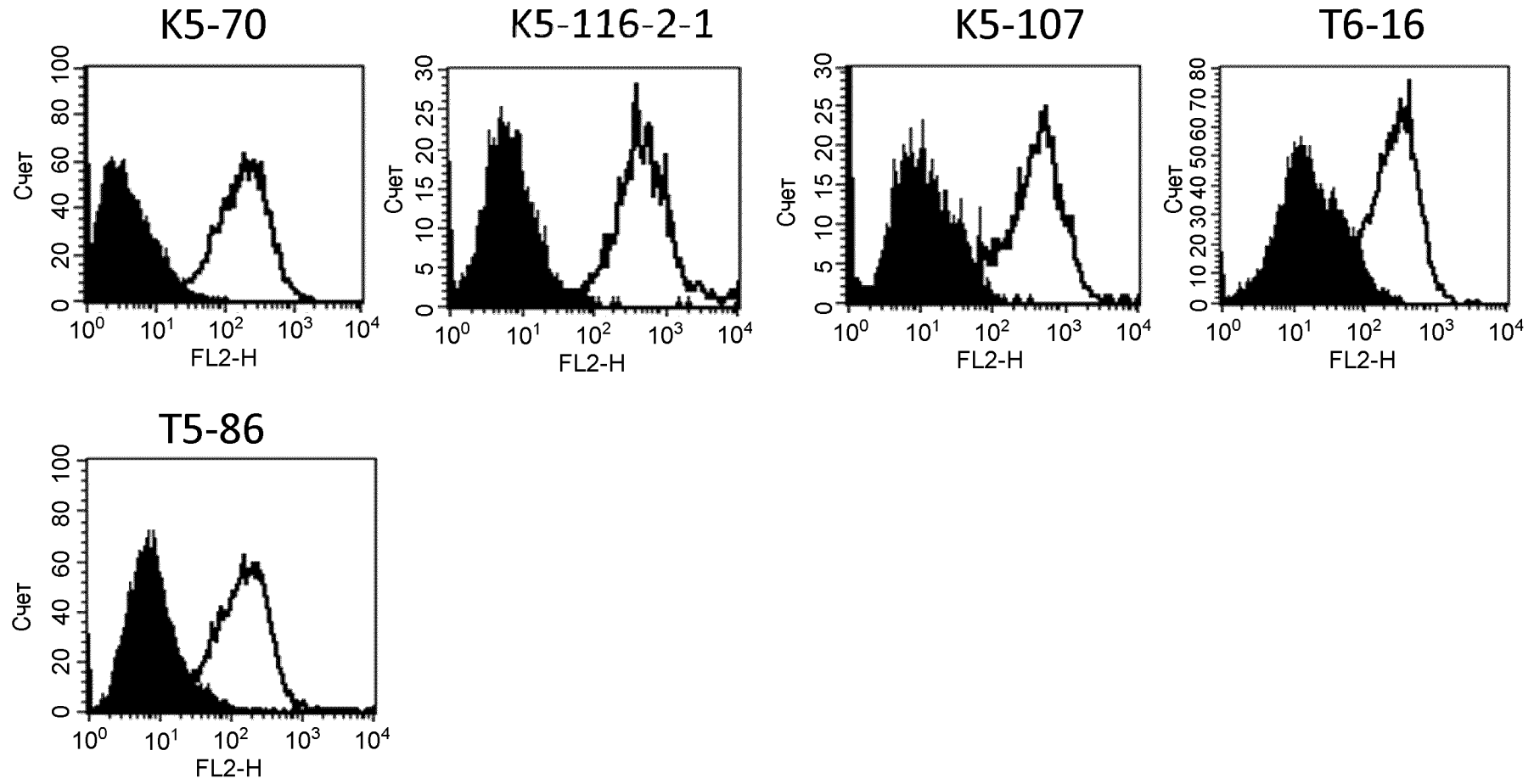


ФИГ.3

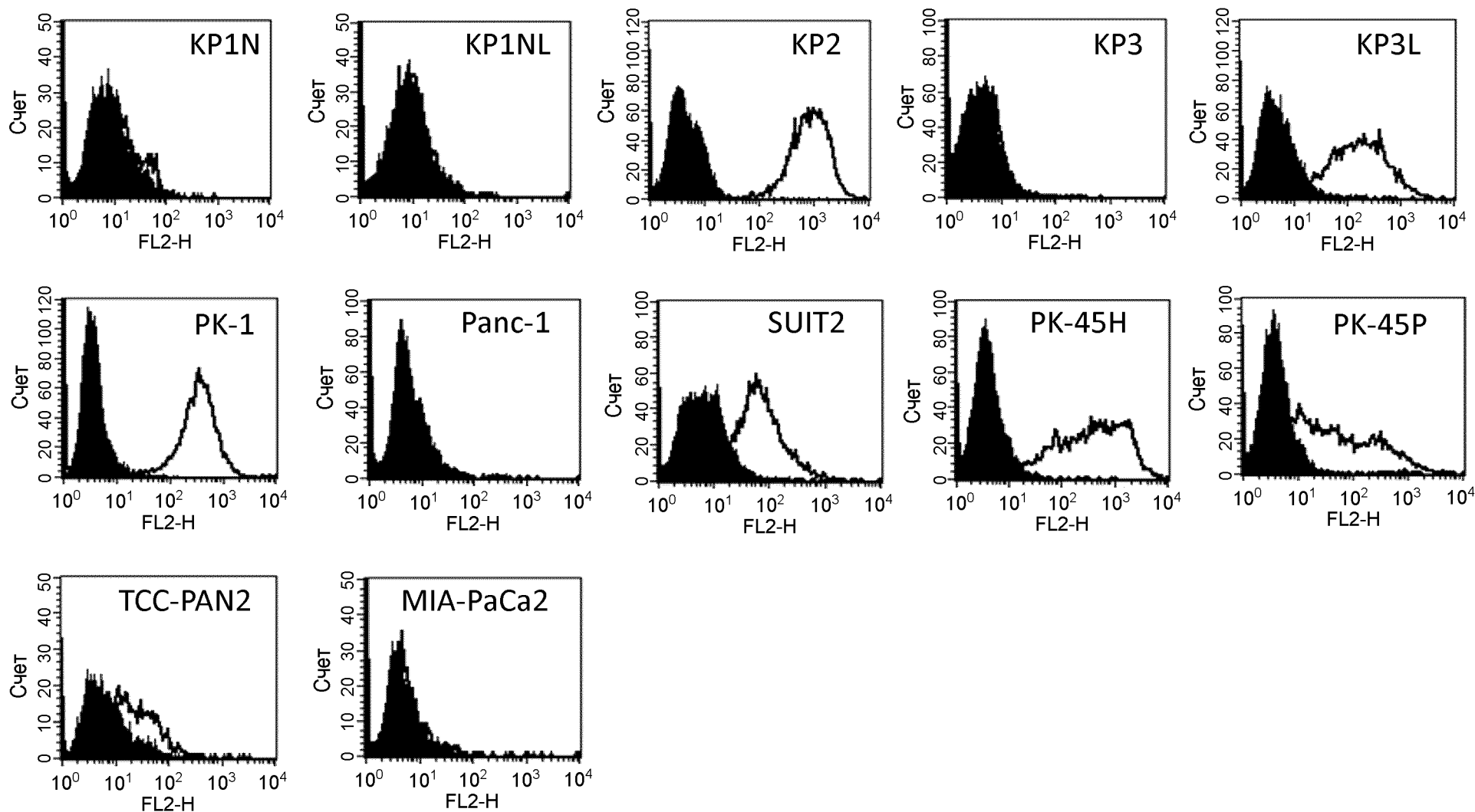
BxPC-3

Фиг. 4

4/74

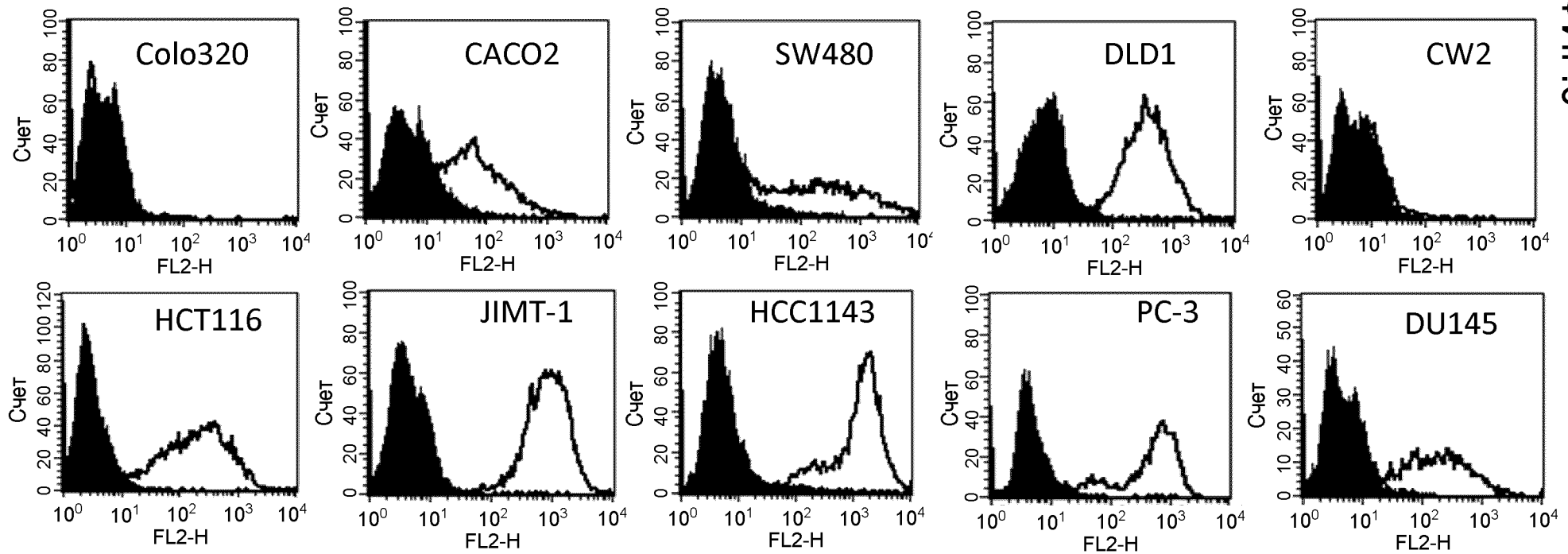


Другие линии злокачественных клеток



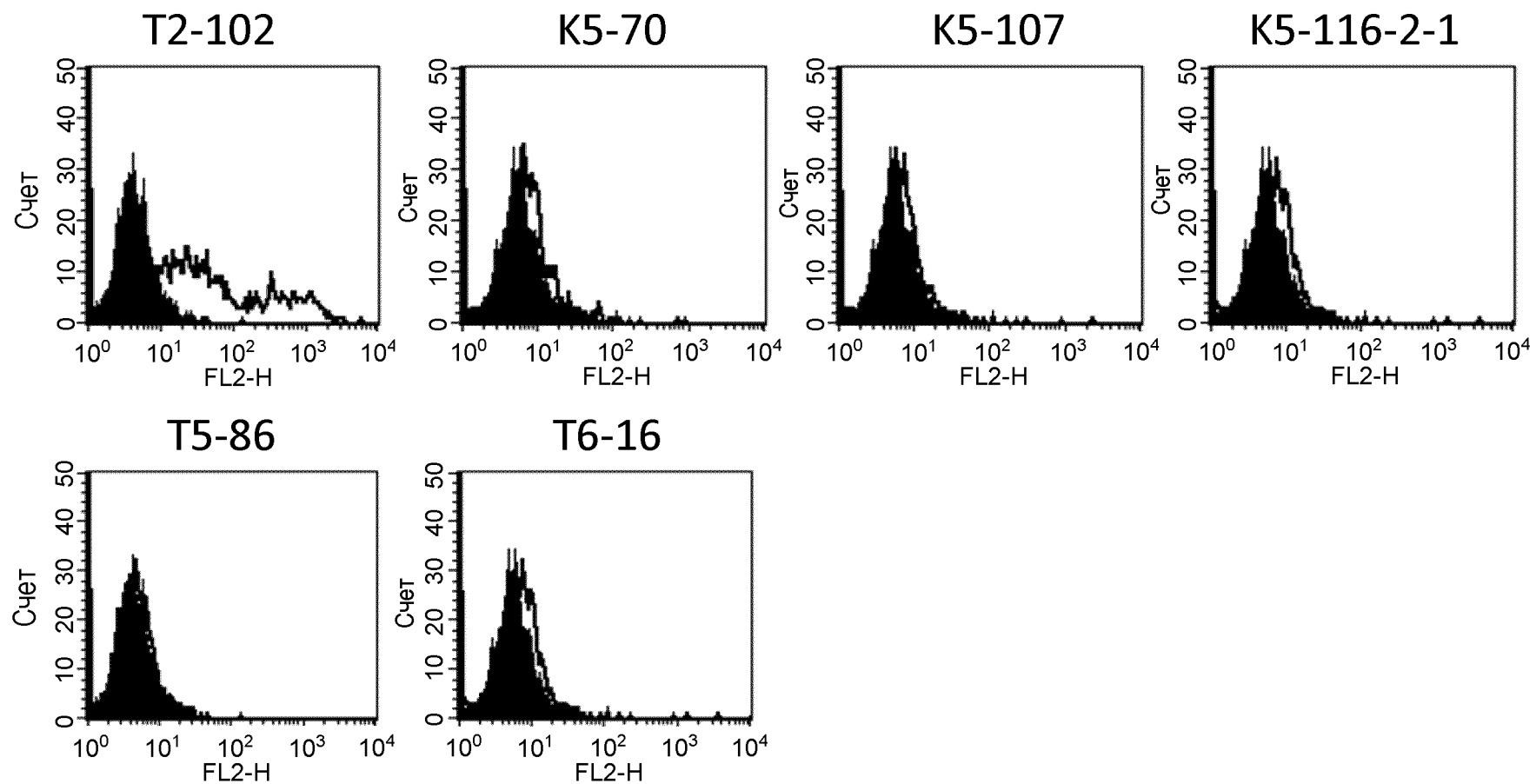
ФИГ. 5

Другие линии злокачественных клеток



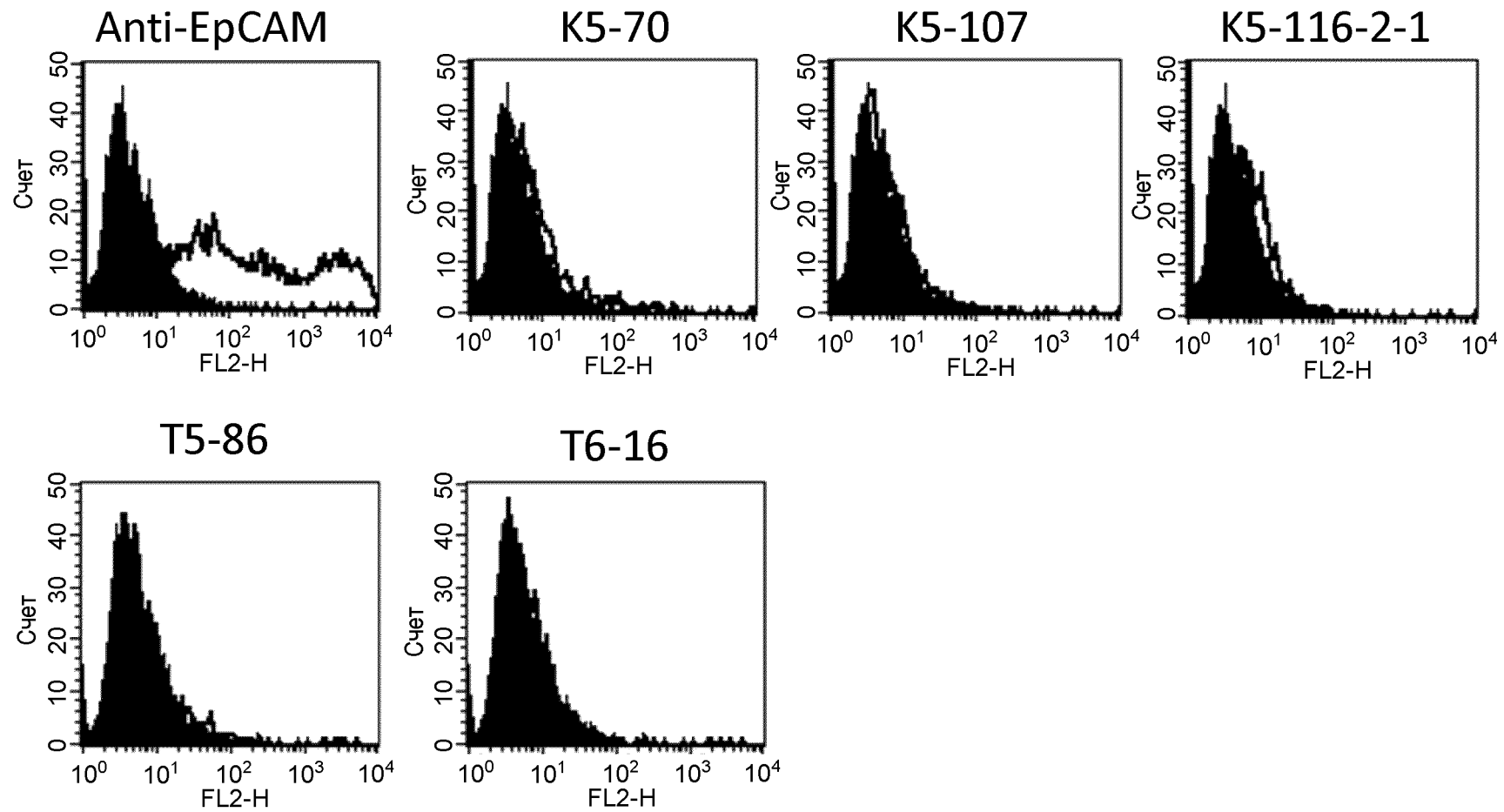
Фиг.6

Реактивность по отношению к TROP-2 мыши

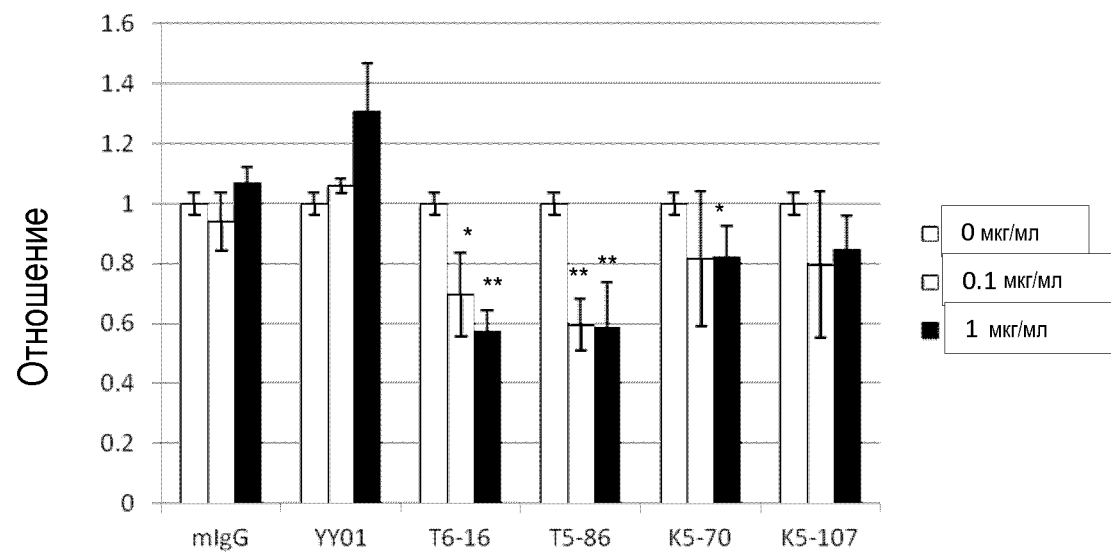


ФИГ. 7

Реактивность по отношению к EpCAM/hTROP-1

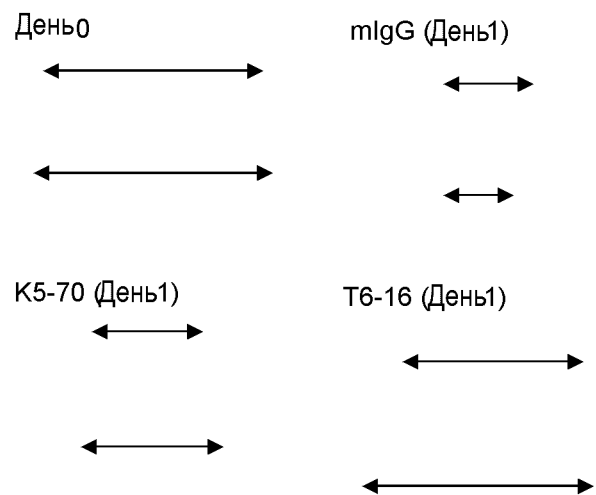


Фиг.8

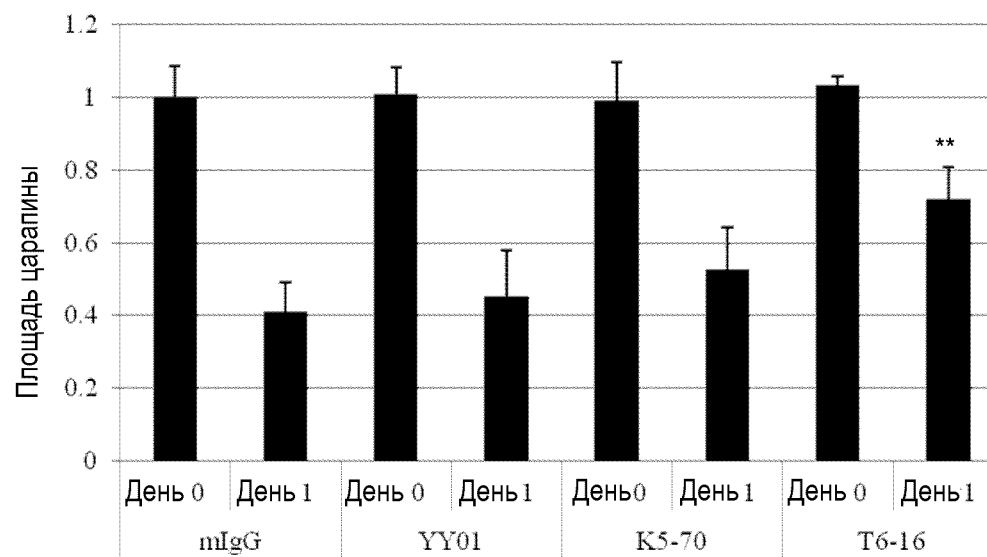


ФИГ.9

A

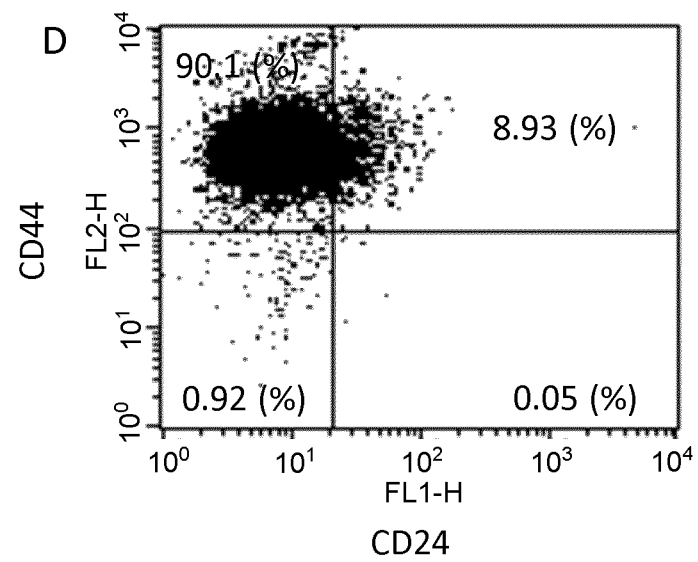
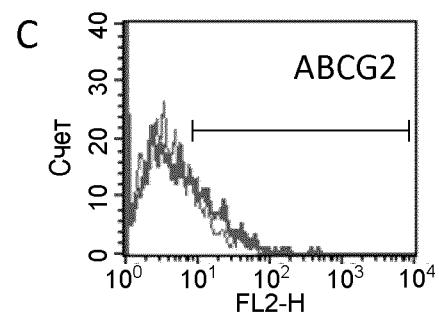
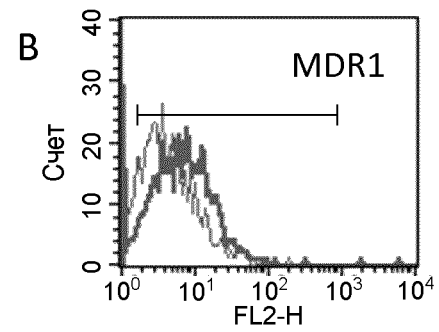
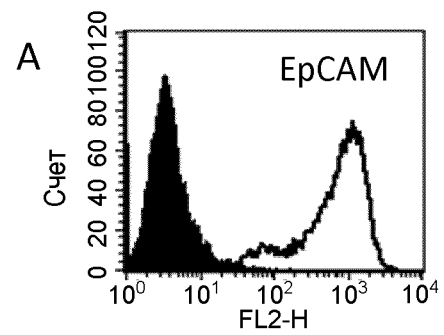


B



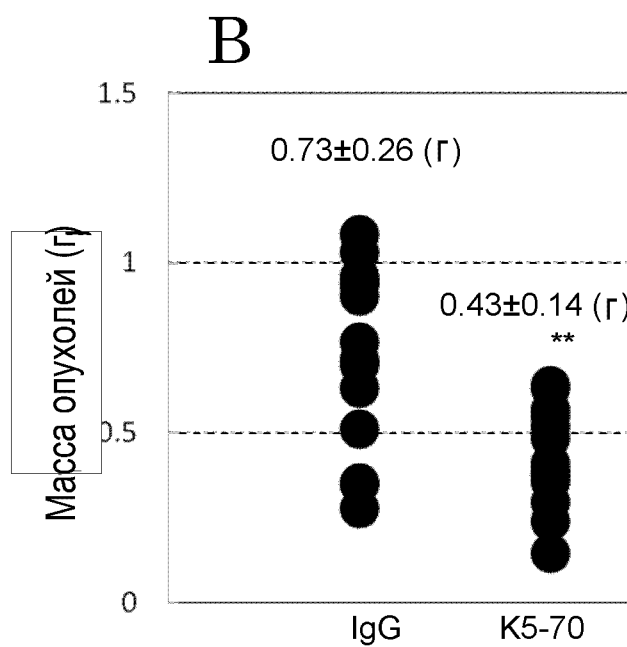
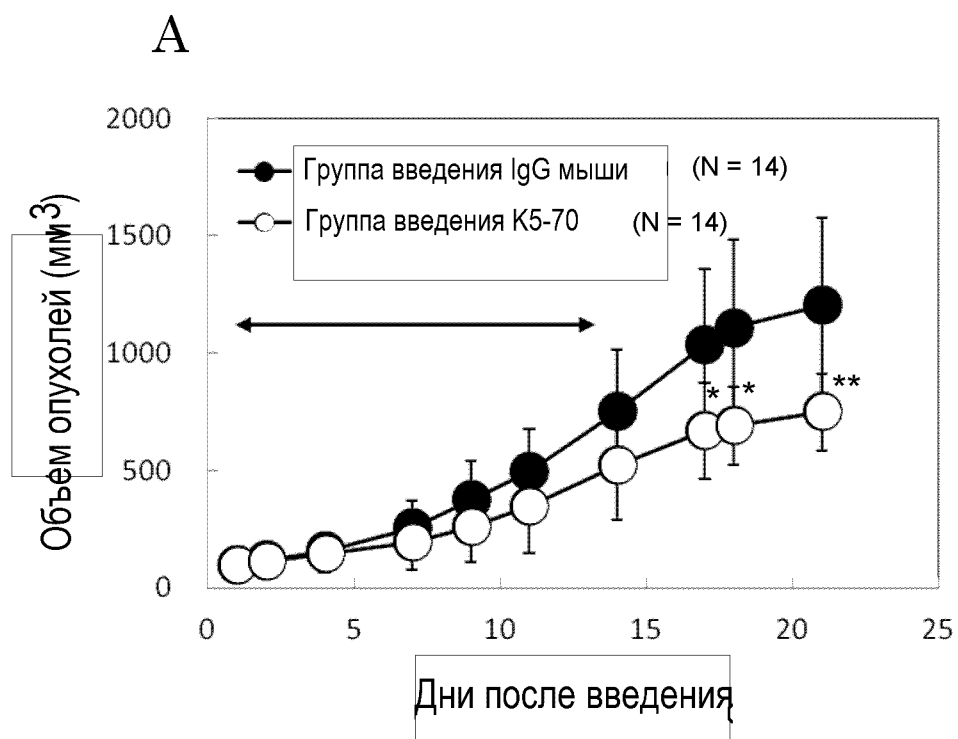
ФИГ.10

10/74



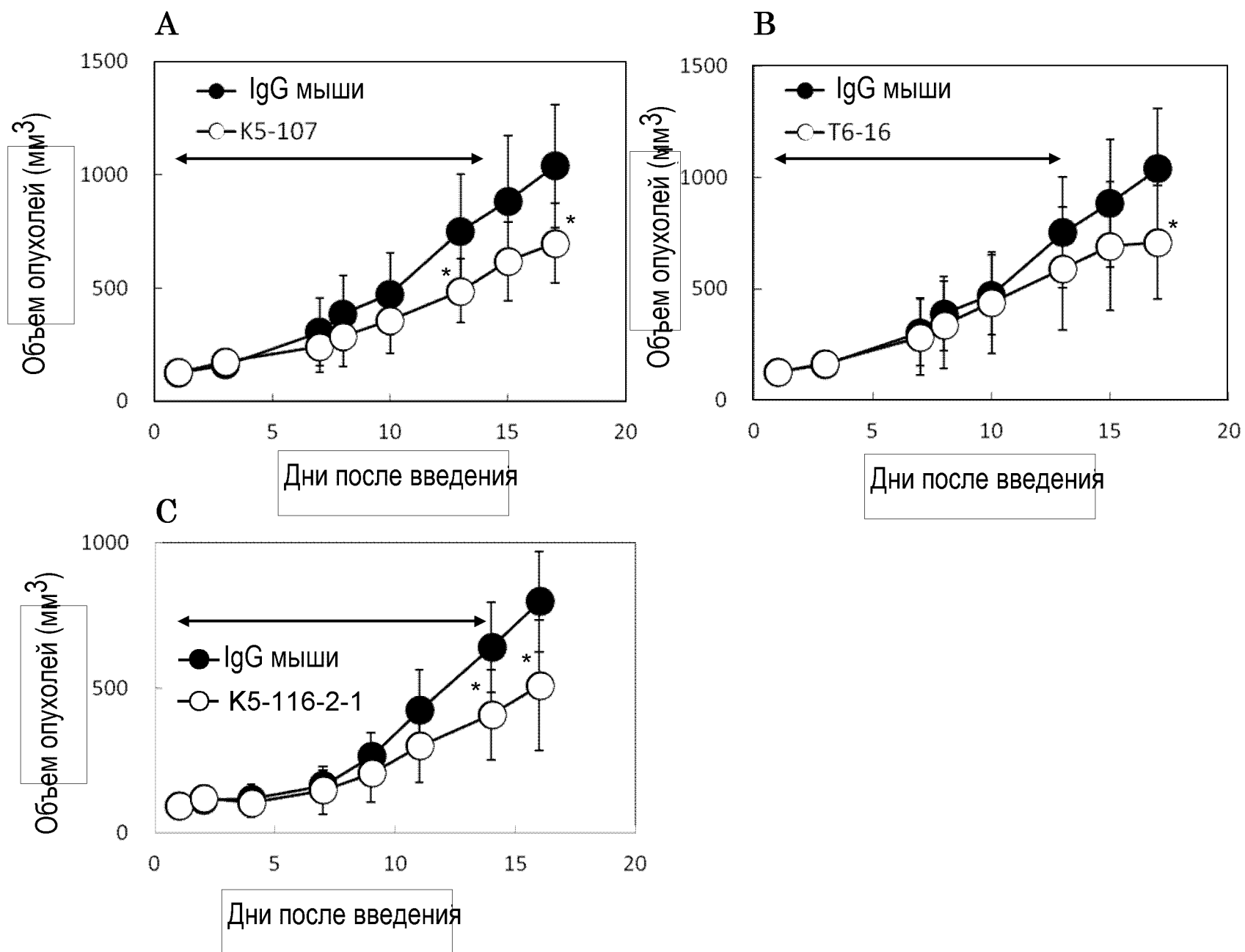
Фиг. 11

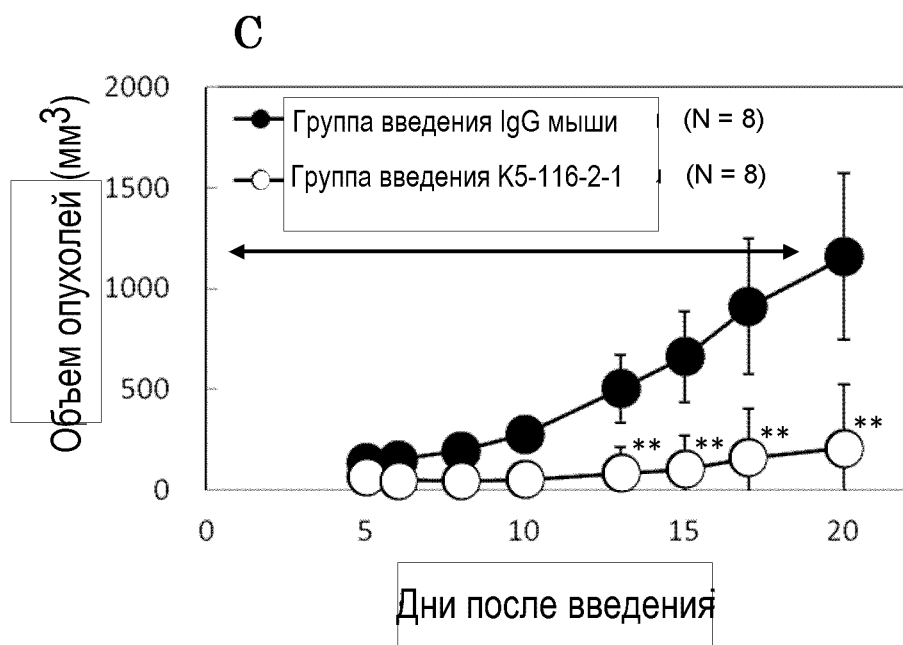
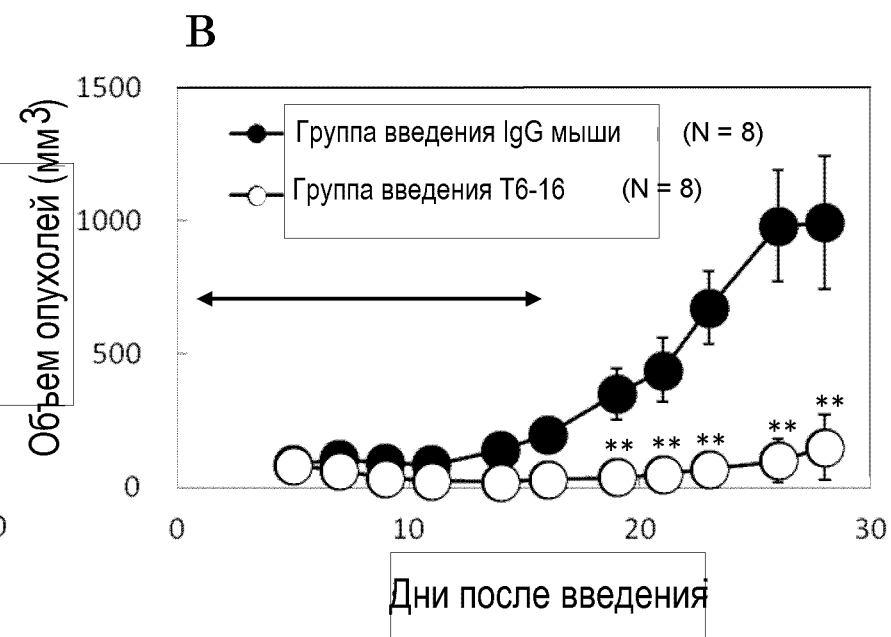
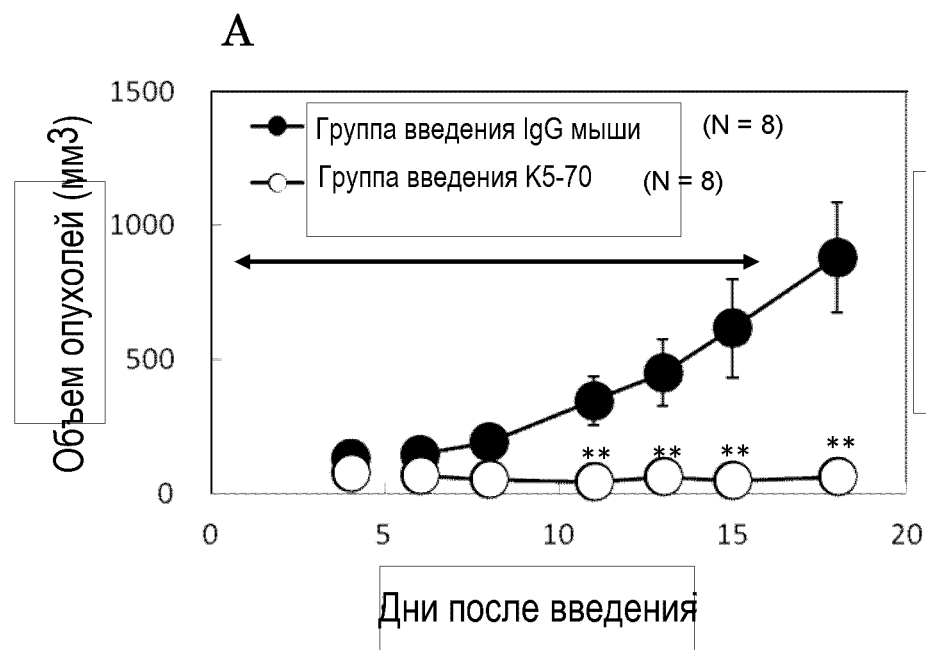
K5-70 / Лечение



ФИГ. 12

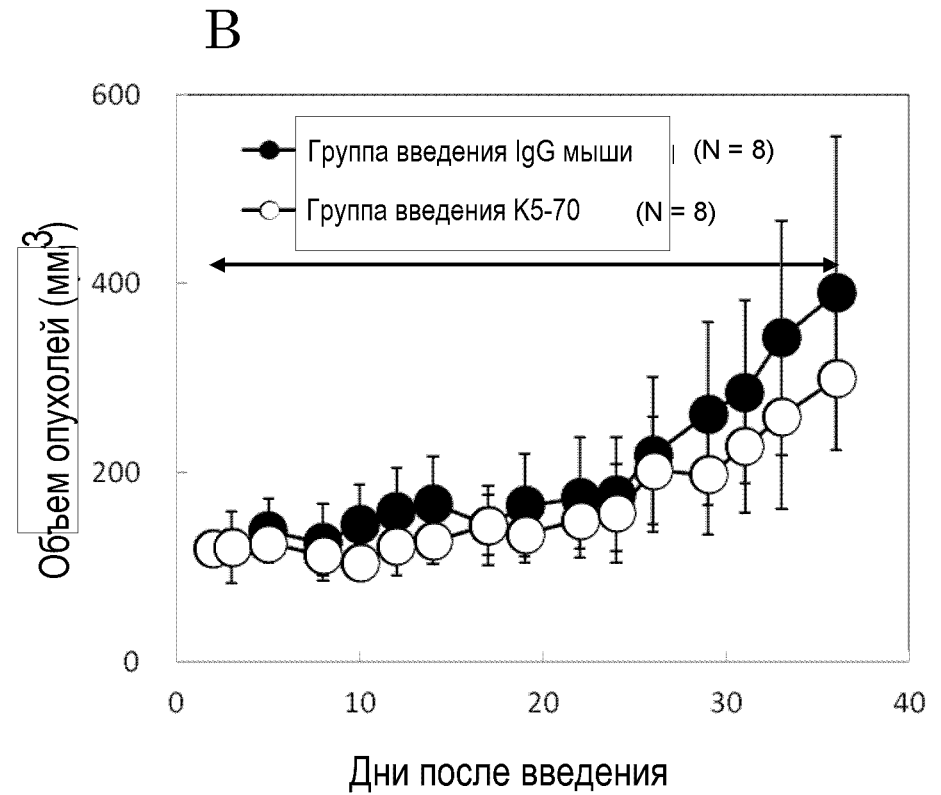
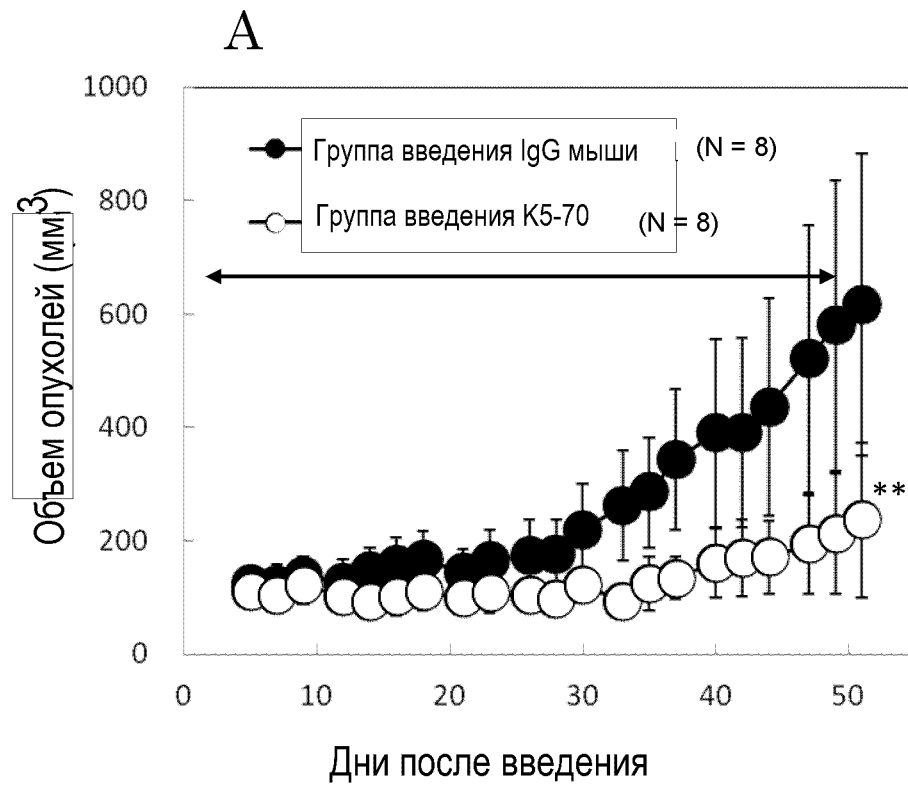
ФИГ.13



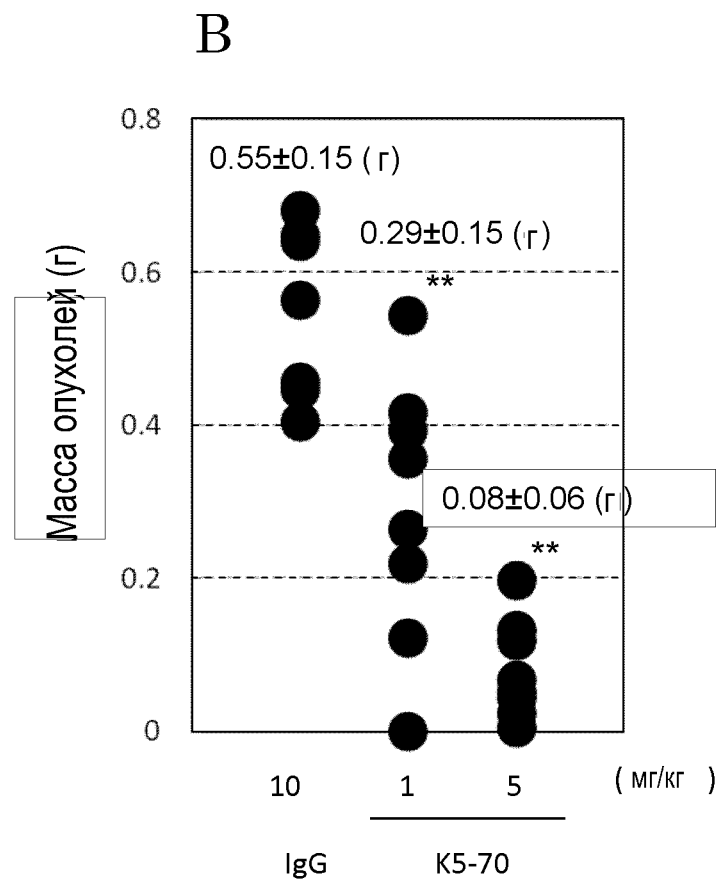
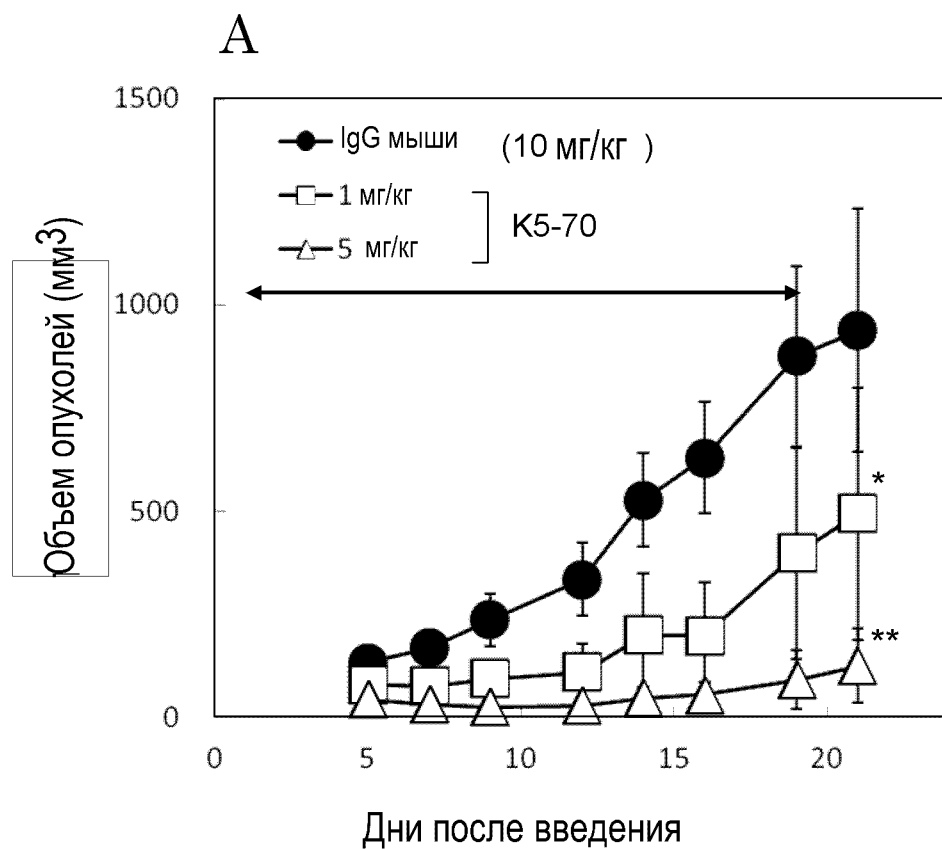


ФИГ. 14

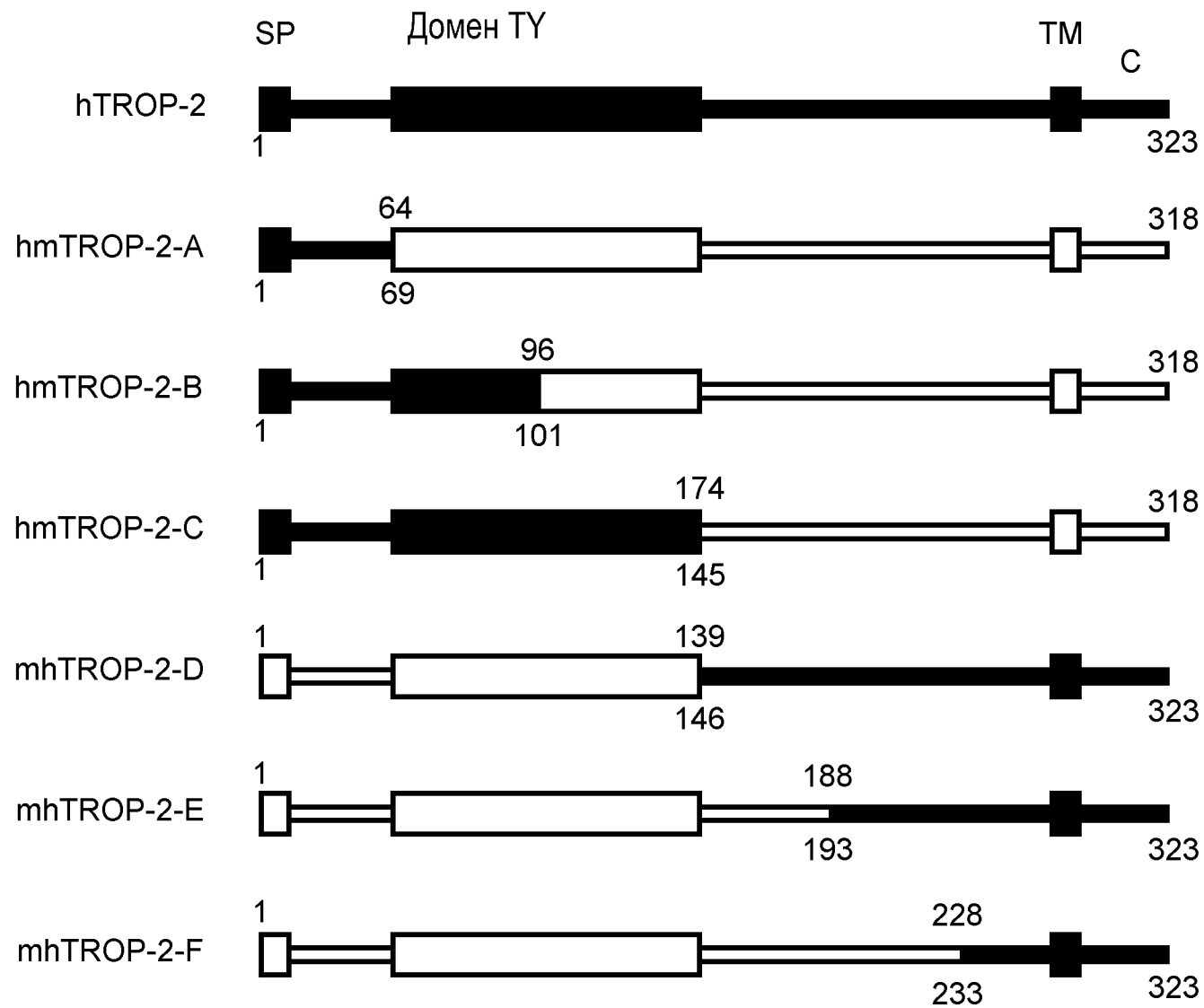
K5-70 /BxPC-3



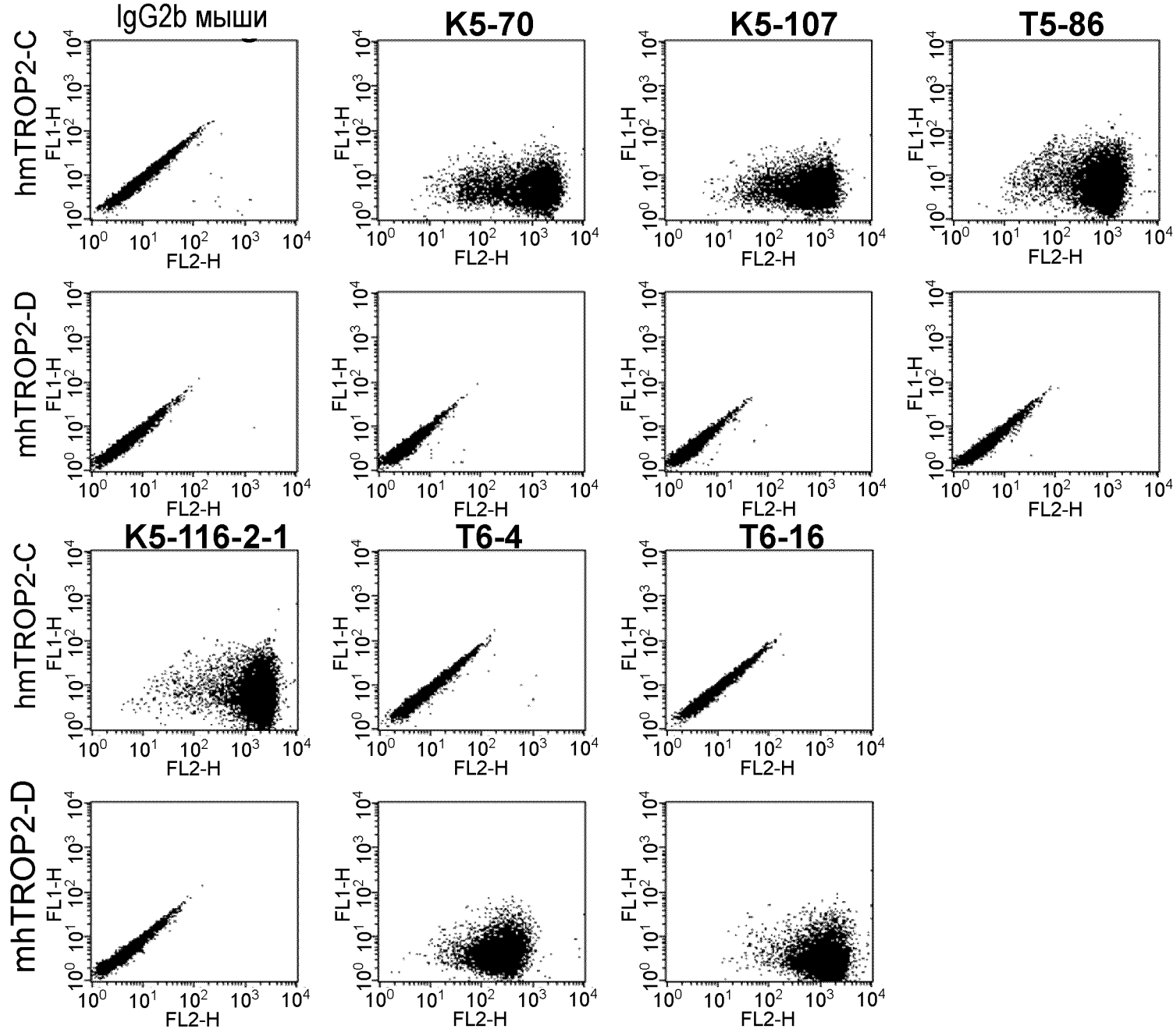
К5-70/ Зависимая от дозы профилактика



ФИГ.16

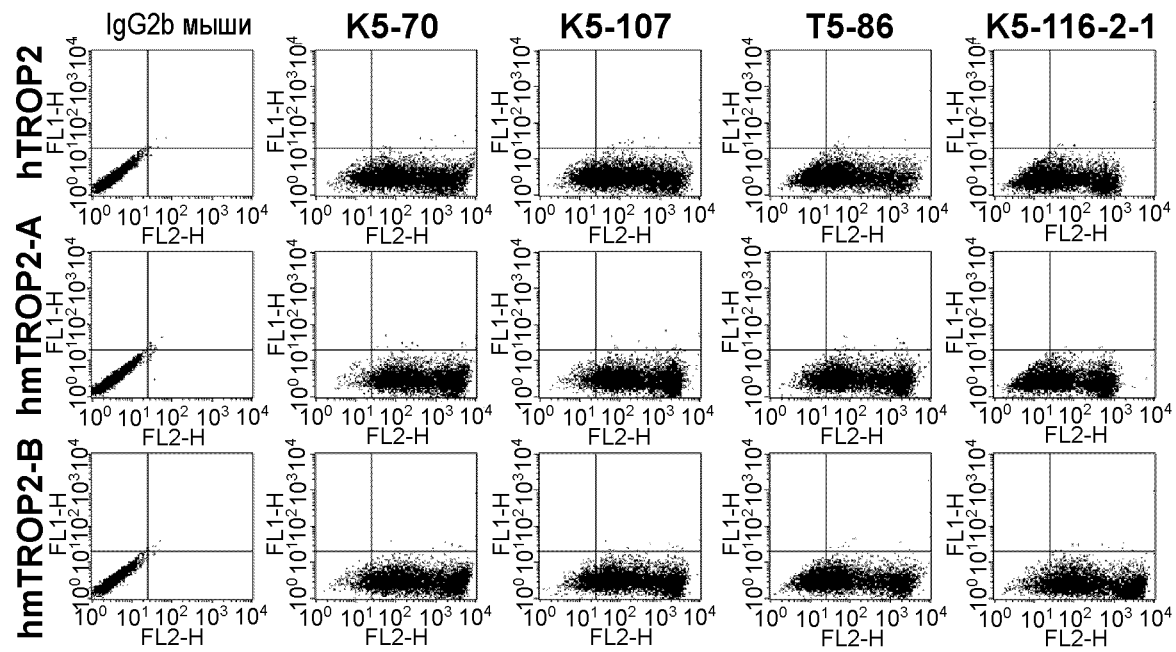


Фиг. 17

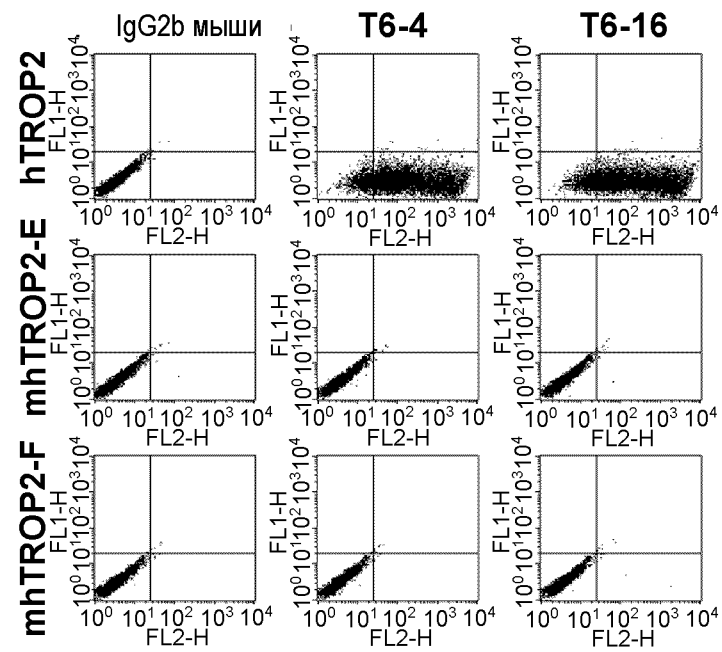


Фиг.18

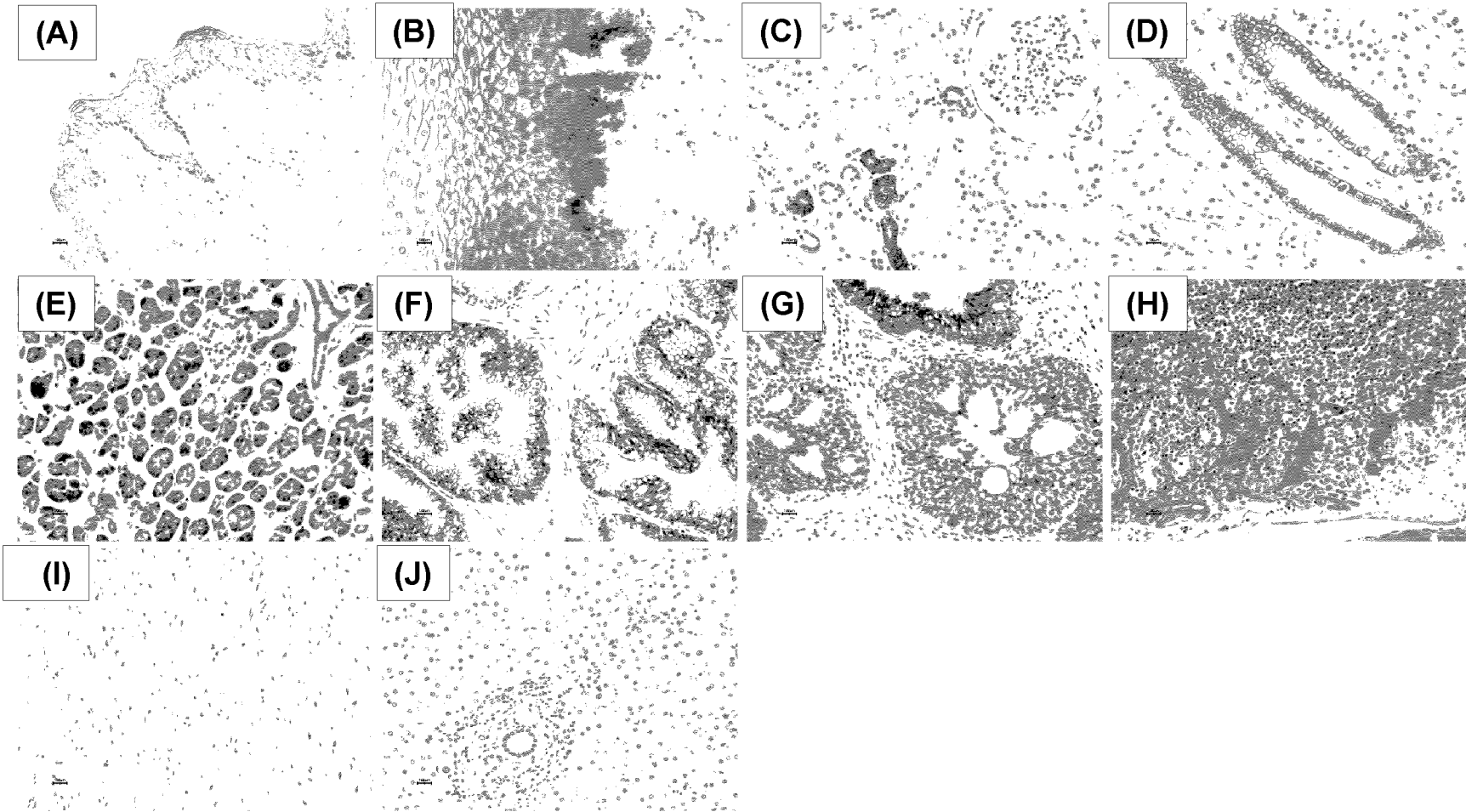
(A)

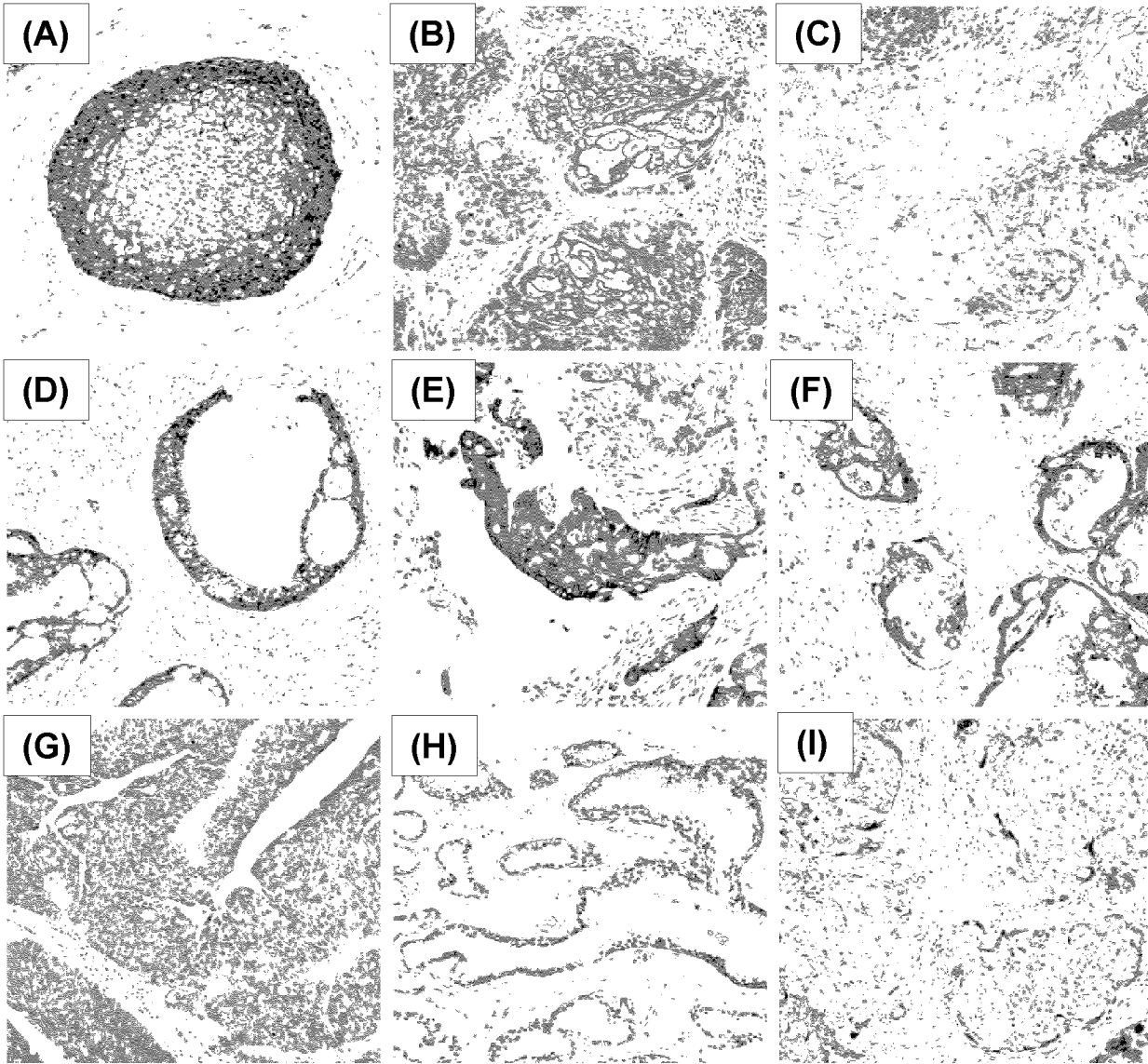


(B)

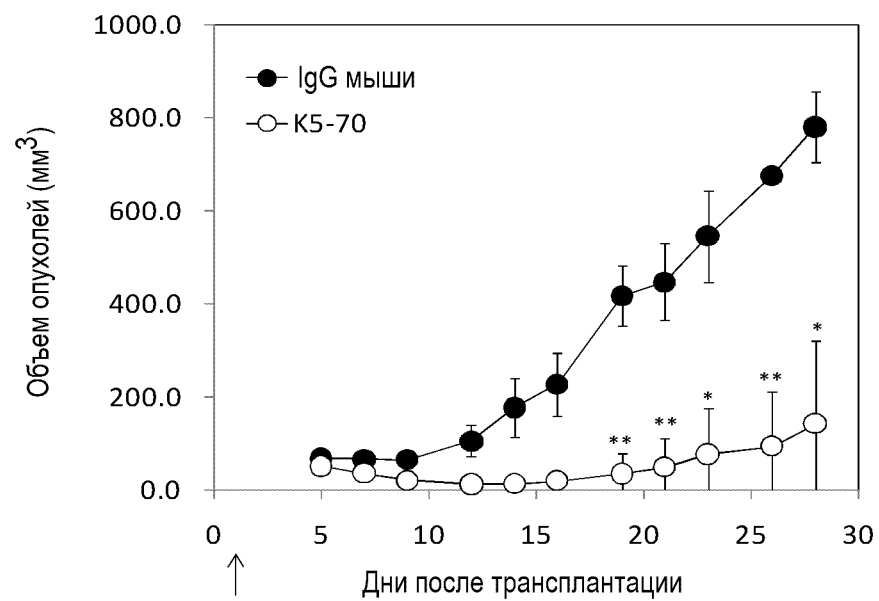


ФИГ. 19

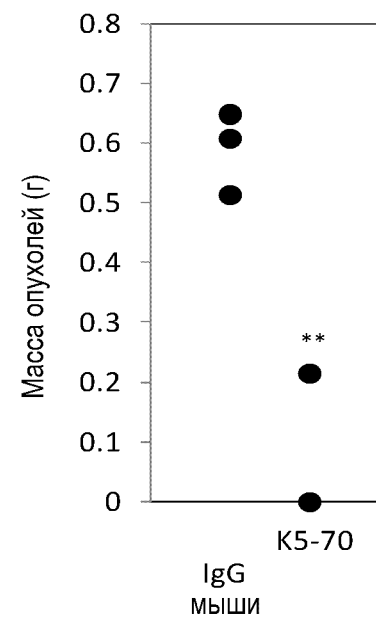
Φ NT.20

Φ ИГ.21

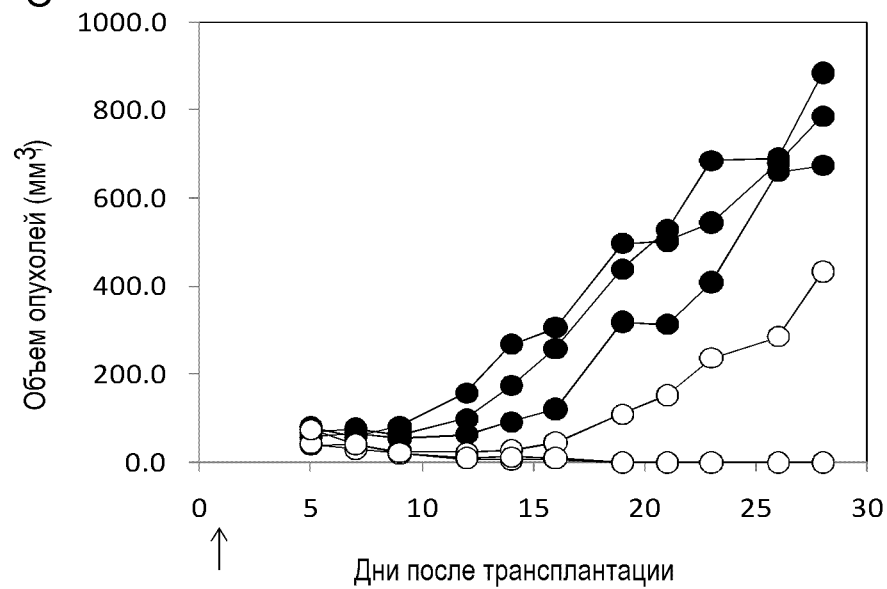
A



B

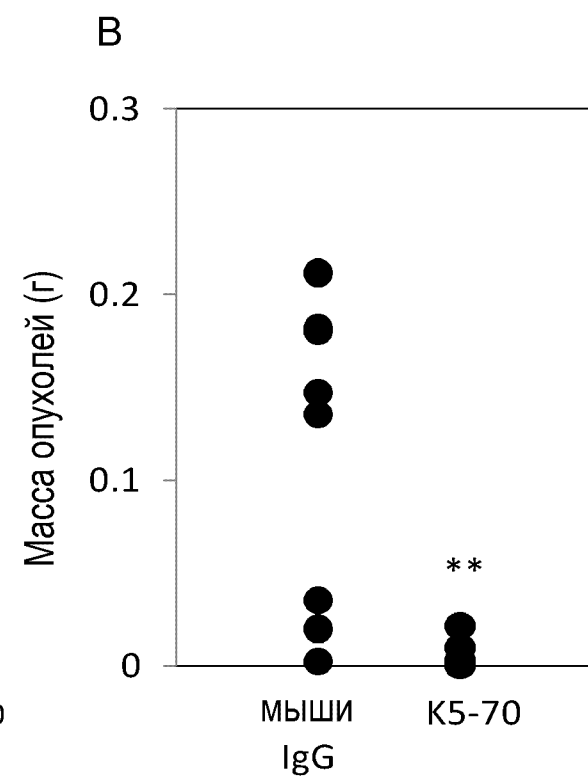
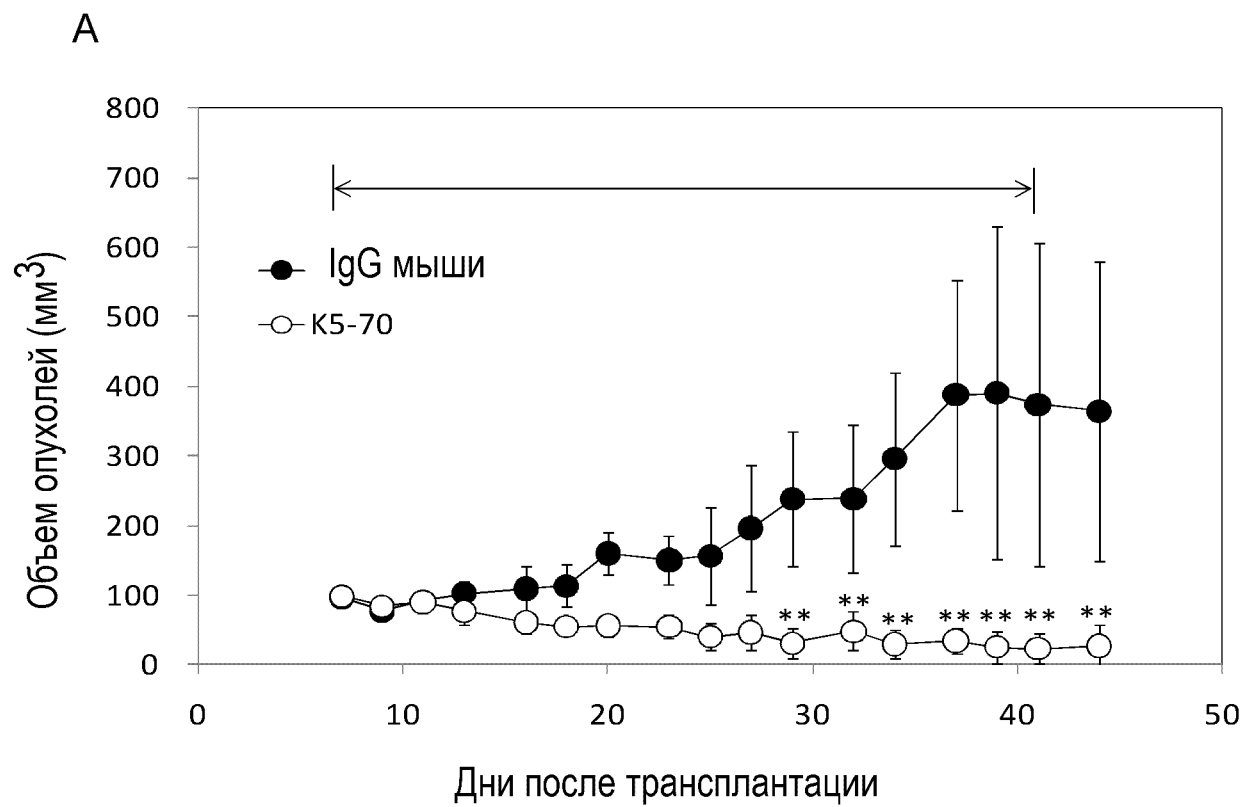


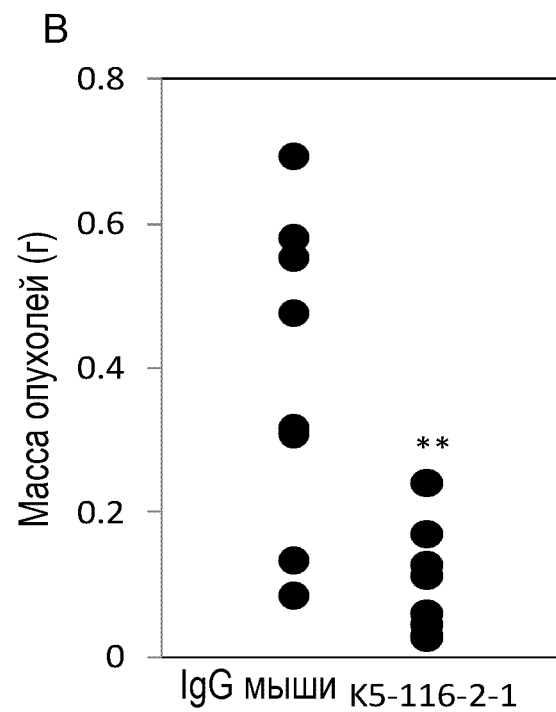
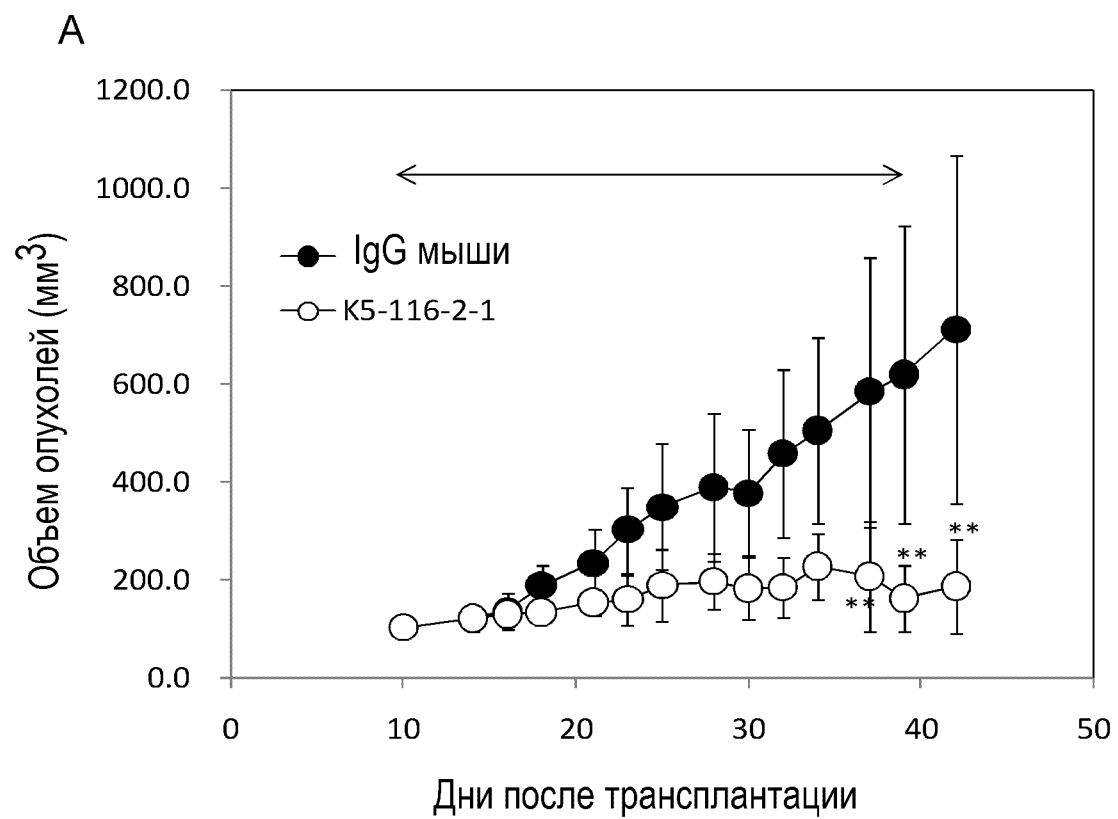
C



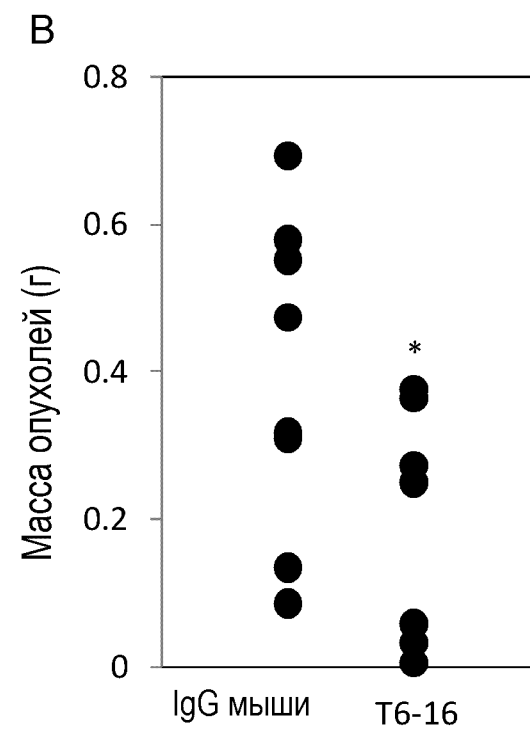
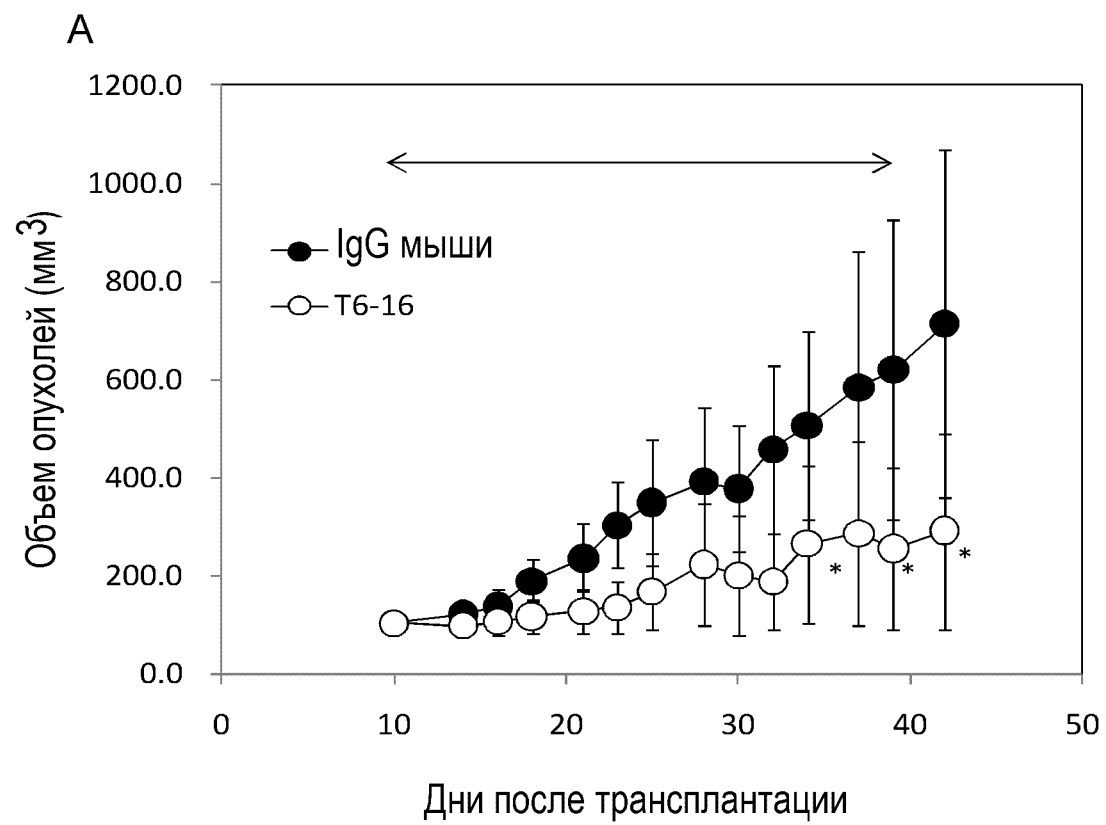
ФИГ. 22

22/74

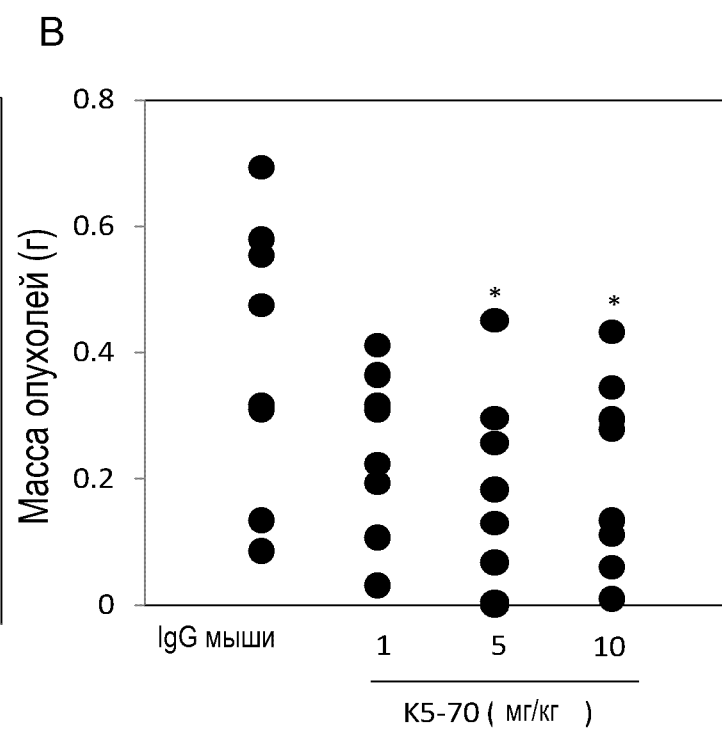
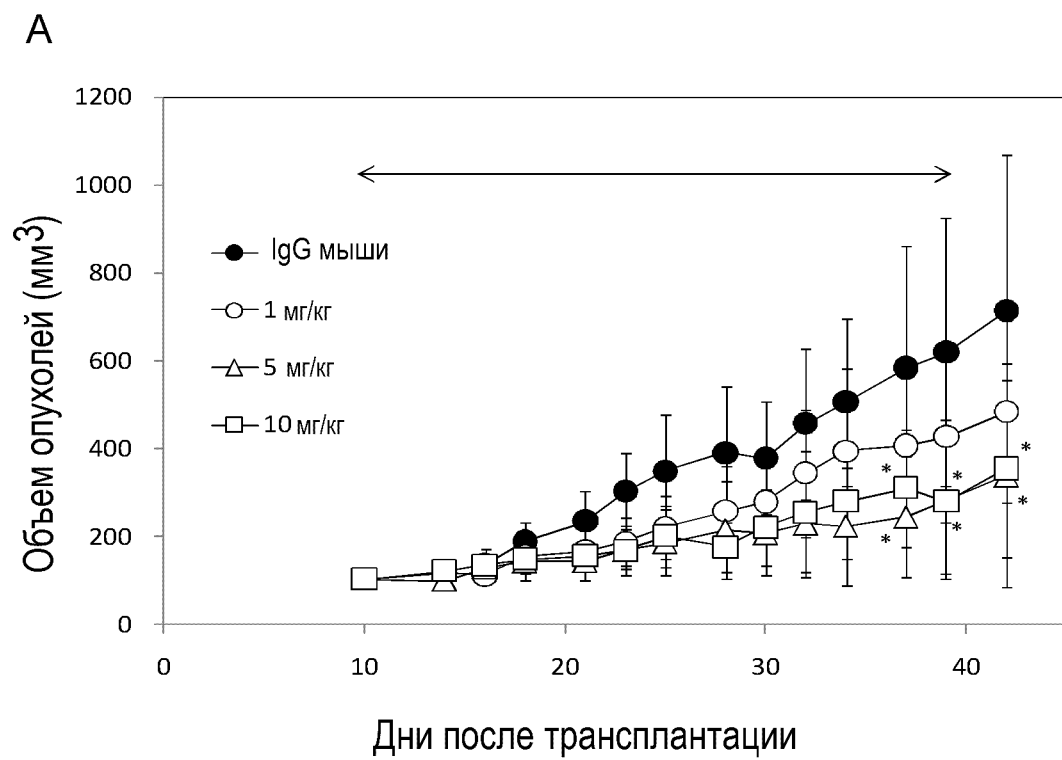




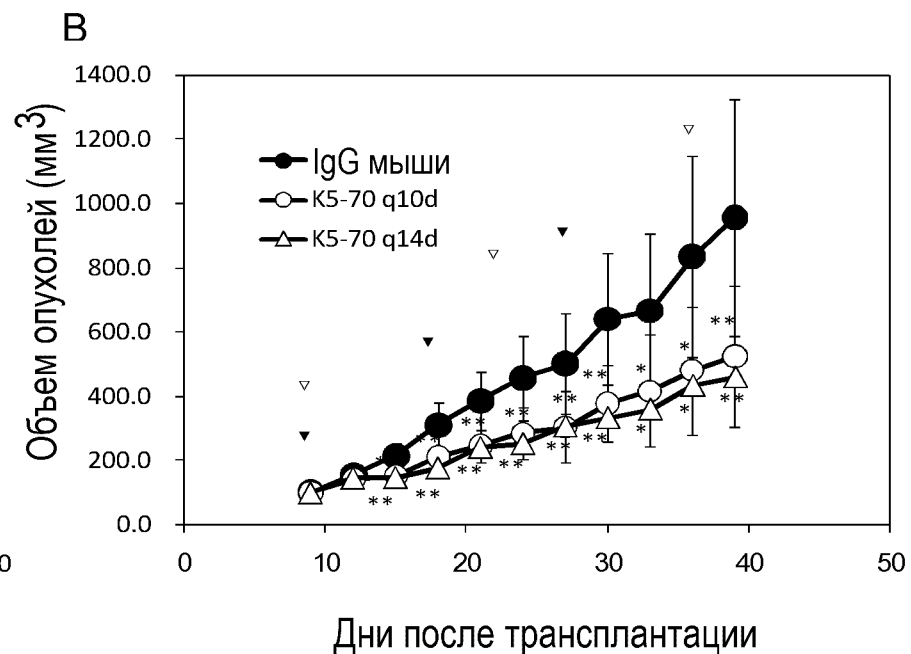
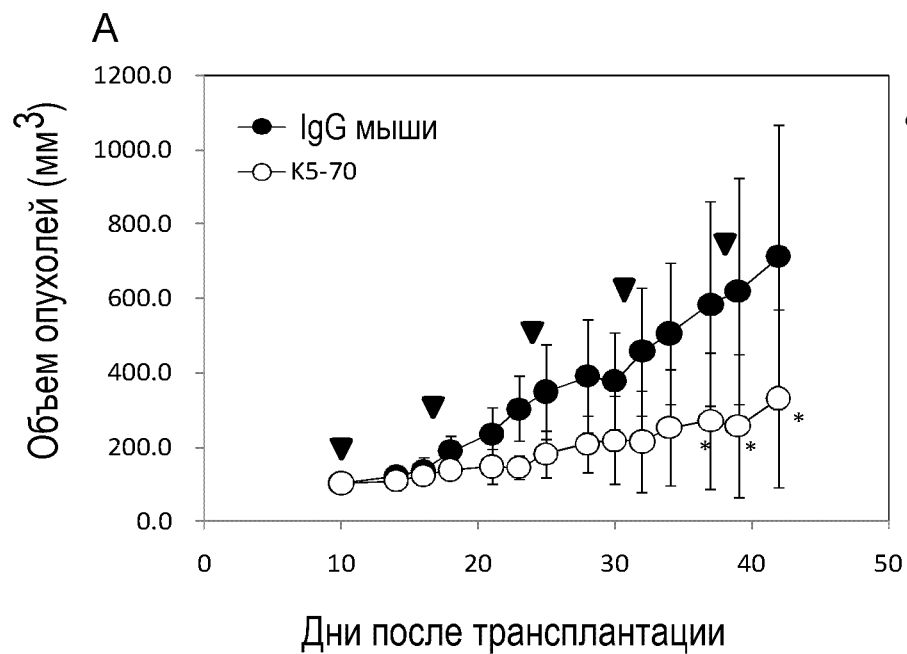
ФИГ. 24



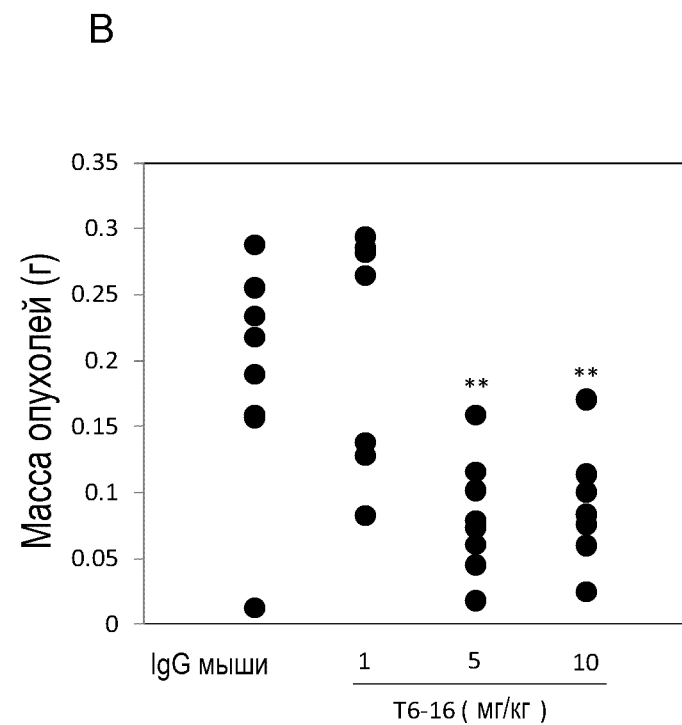
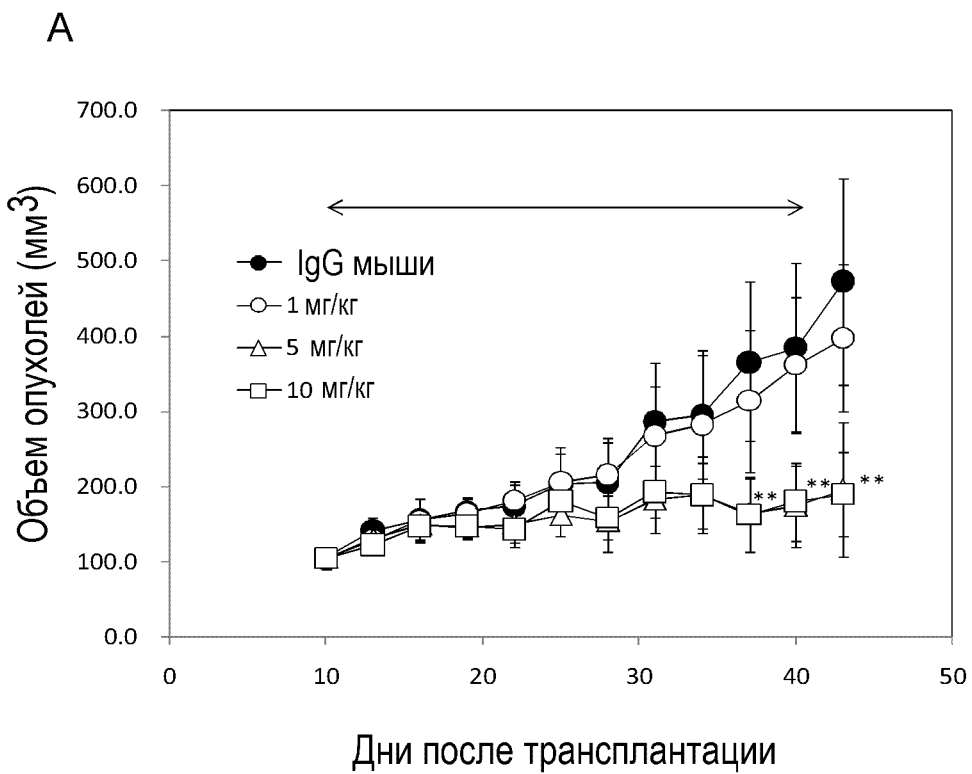
ФИГ. 25



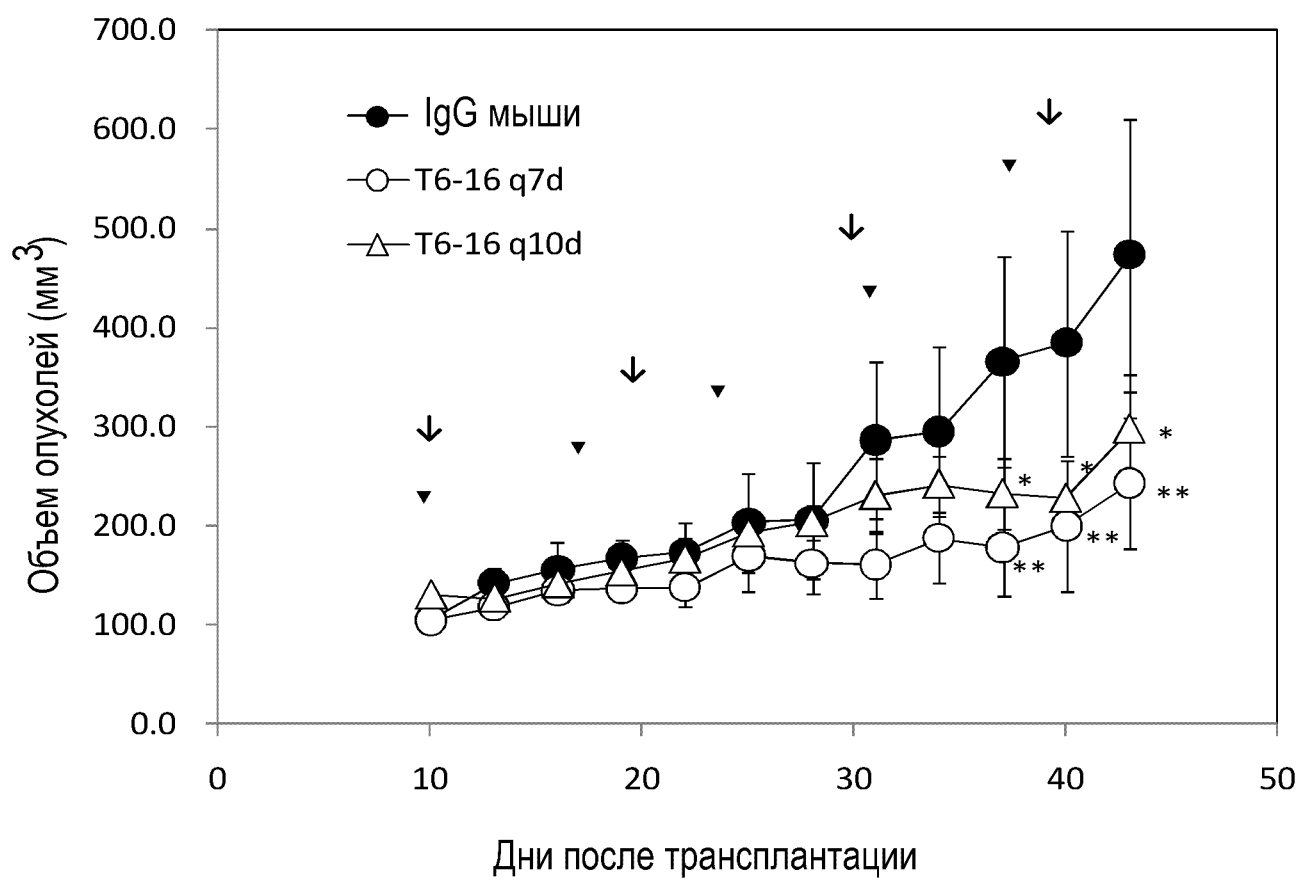
ФИГ. 26



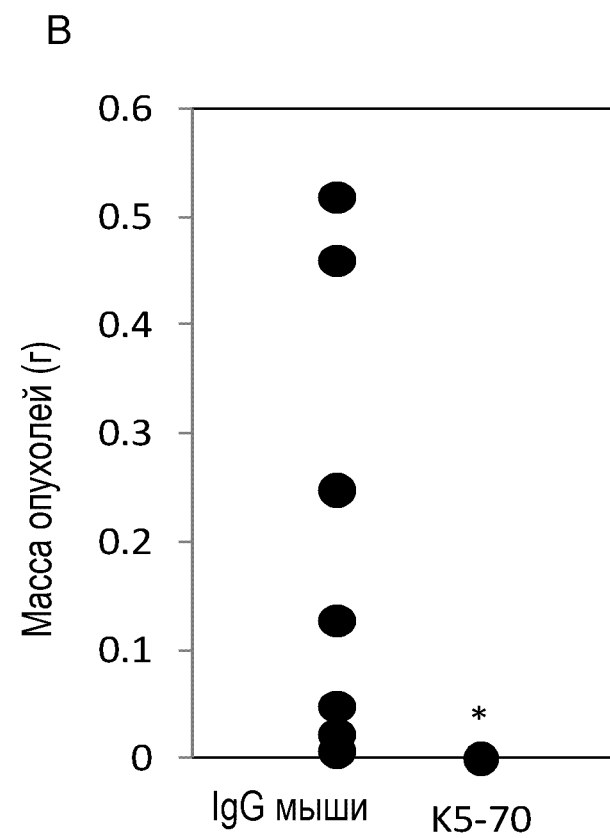
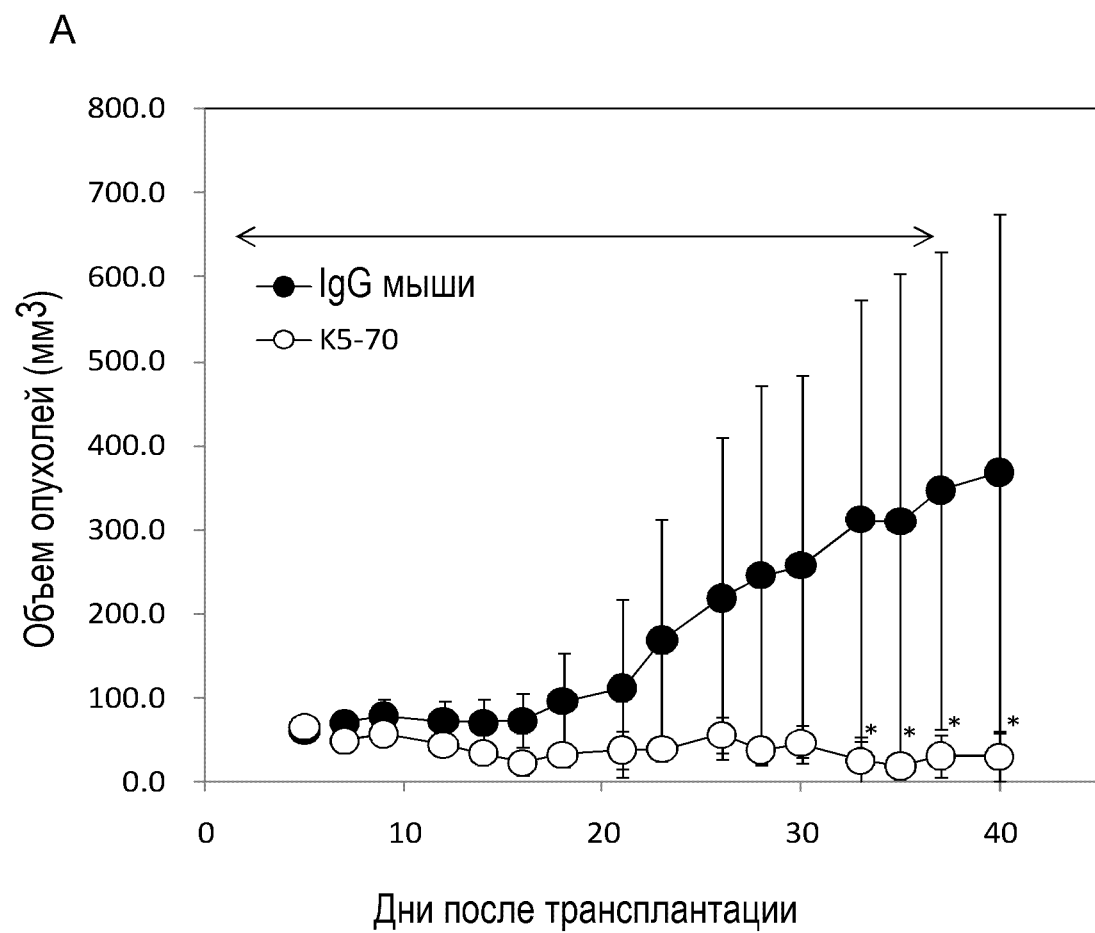
ФИГ. 27



ФИГ.28

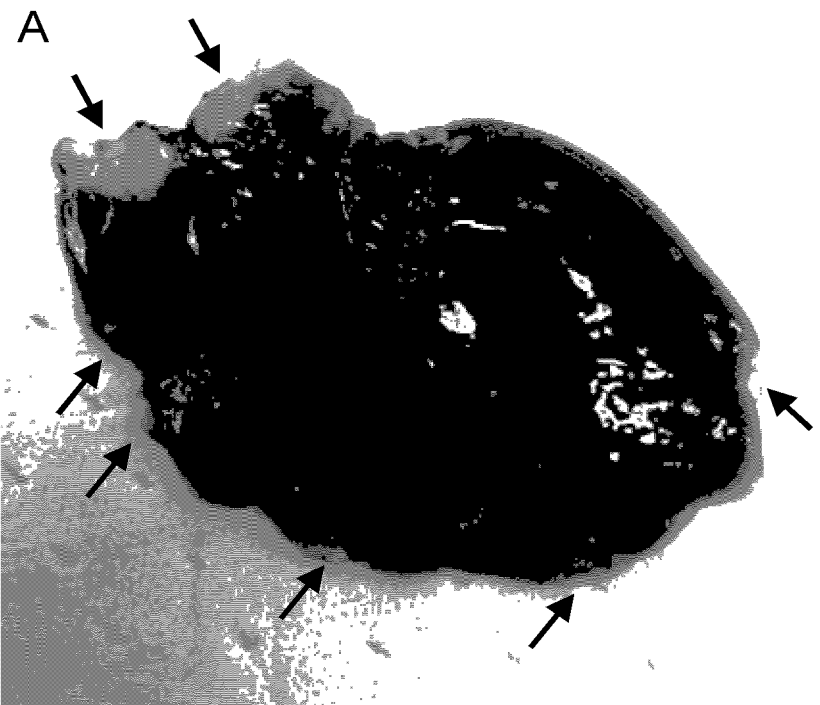
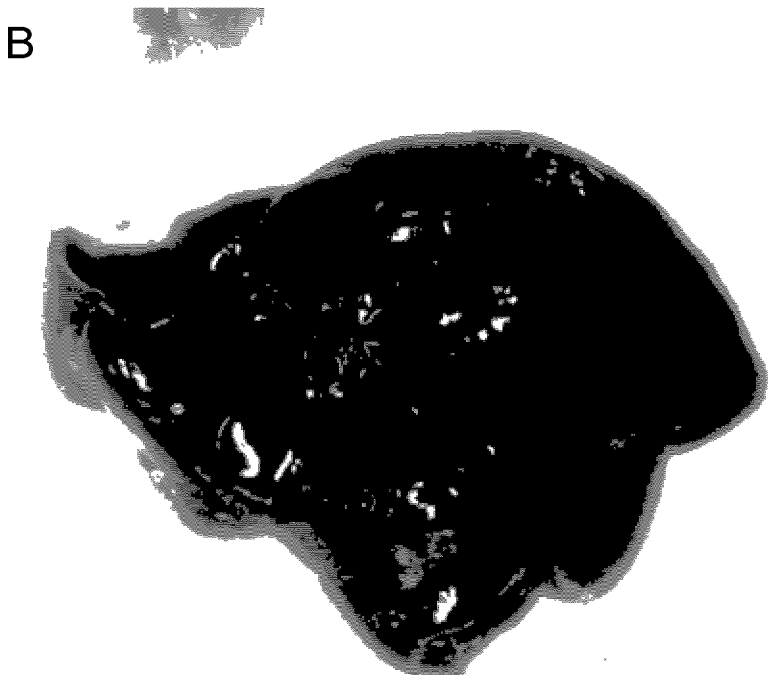


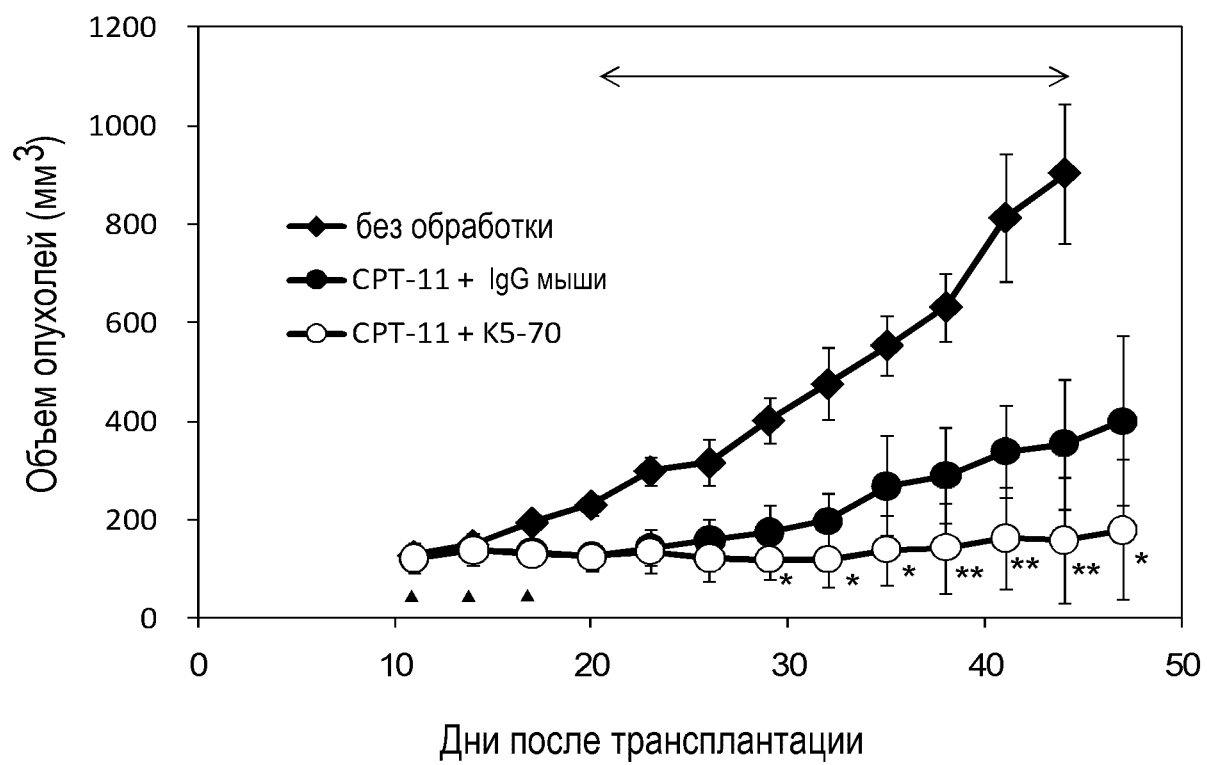
ФИГ. 29



ФИГ.30

ΦMΓ.31





ФИГ.32

K5-70
VH

ΦИГ.33

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q
GTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCATCTACTGGATAAACTGGGTGAAACAGAGGCCT
C K A S G Y T F T I Y W I N W V K Q R P
GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAAT
G Q G L E W I G N I Y P S D S Y T N Y N
CAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
Q K F K D K A T L T V D K S S S T A Y M
CAGCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAACGTCTATG
Q L S S P T S E D S A V Y Y C T R T S M
GCGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
A D Y W G Q G T T L T V S S

K5-70
VL

ΦM.34

34/74

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTGGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACAAAGCATACTGGTATCAGCAAAGAACA
F S C R A S Q S I G T S I H W Y Q Q R T
AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTACGTTTCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGGACAAAGTTGGAAATAAAA
G T K L E I K

K5-107
VH

ΦM.35

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q
GTCCAAGTGCAGCAACCTGGGTCTGAGCTGGTGAGGCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G S E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACATTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCAT
C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R H
GGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTTATCCTGGTGGTGGTTATACTAACTACGAT
G Q G L E W I G N I Y P G G G Y T N Y D
GAGAAGTTCAAGAGCAAGGGCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATG
E K F K S K G T L T V D T S S S T A Y M
CACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGATCATCCGTT
H L S S L T S E D S A V Y Y C T R S S V
TTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
F D Y W G Q G T T L T V S S

K5-107
VL

ΦИГ.36

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTTGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACTGGTTTCAGCAAAGAACA
F S C R A S Q N I G T S I H W F Q Q R T
AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTACGTTCTGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGGACAAAGTTGGAAATAAAA
G T K L E I K

K5-116-2-1
VH

ΦMF.37

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAG
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S Q
GTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC
V Q L Q Q P G A E L V R P G A S V K L S
TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCT
C K A S G Y T F T S Y W I T W V K Q R P
GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAAT
G Q G L E W I G N I Y P S D S Y T N Y N
CAAAAGTTCAGGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGTACAGCCTACATG
Q K F R D K A T L T V D K S S S T A Y M
CAGCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAGCCCTCTTTGAC
Q L S S P T S E D S A V Y Y C S A L F D
TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
Y W G Q G T T L T V S S

K5-116-2-1
VL

ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTGTATTTTTGCTTTTCTGGATTCCAGCCTCCAGAGGT
M V S T P Q F L V F L L F W I P A S R G
GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACAAGCATACTGGTATCAGCAAAGAACA
F S C R A S Q S I G T S I H W Y Q Q R T
AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTATTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
R F S G S G S G T D F I L S I N S V E S
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCATTACGTTTCGGCTCG
E D I A D Y Y C Q Q S N S W P F T F G S
GGGACAAAGTTGGAAATAAAA
G T K L E I K

ΦM.38

T6-16
VH

ΦΠ.39

ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGAACTGCAGGCGTCCACTCTGAG
M G W S W I F L F L L S G T A G V H S E
GTCCAGCTTCAGCAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATTTCC
V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S
TGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTACAATATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCAT
C K A S G Y T F T D Y N M H W V K Q S H
GGAAAGAACCTTGAATGGATTGGATATATTTATCCTTACAATGGTGGTACTGGCTACAAC
G K N L E W I G Y I Y P Y N G G T G Y N
CAGAGGTTCAAGAGCAGGGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
Q R F K S R A T M T V D K S S S T A Y M
GAGCTCCGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAAGACTAC
E L R S L T S D D S A V Y Y C A R E D Y
GGTAGTAGCCCCTCTTATGCTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCATCGTCTCC
G S S P S Y A M D Y W G Q G T S V I V S
TCA
S

T6-16
VL

ΦM.40

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGAT
M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D
GTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAGGCCTCCATC
V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACGGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTAC
S C R S S Q S L V H G N G N T Y L H W Y
CTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCT
L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S
GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACGGATTTCACACTCAAGATCAGC
G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAACCTACACATGTTCCCACG
R V E A E D L G V Y F C S Q T T H V P T
TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA
F G S G T K L E I K

		1	2	3	4
		123456789	0123456789	0123456789	0123456789
K5-70	VH	QVQLQQPGA	ELVRPGASVK	LSCKASGYTF	TIYWINWVKQ
HuK5-70	VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	TIYWINWVRQ
DA980102	VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	T-----WVRQ
		5	6	7	8
		01223456789	0123456789	0123456789	0122223456789
		a			abc
K5-70	VH	NIYPSDSYTN	NQKF K DKATL	TVDKSSSTAY	MQLSSPTSEDSAV
HuK5-70	VH	NIYPSDSYTN	NQKF K DKATL	TVDT S ASTAY	ME <u>L</u> SSLRSED T AV
DA980102	VH	-----	-----RVTL	TSDTSASTAY	MEMSSLRSED T AV
		1	1		
		9	0	1	
		0123456789	0123456789	0123	
K5-70	VH	YYCTR T SMA-	-DYWGQGTTL	TVSS	
HuK5-70	VH	YYCTR T SMA-	-DYWGQGT L V	TVSS	
DA980102	VH	VHYYCAR-----	-WGQGT L V	TVSS	

ΦΠΓ.41

		1	2	3
		123456789	0123456789	0123456789
K5-70	VL	DILLTQSPA	ILSVSPGERV	SFSCRASQSI
HuK5-70	VL	EIVLTQSPA	TL SL SPGERA	TL SC RASQSI
L41174	VL	EIVLTQSPA	TL SL SPGERA	TLSC-----
		4	5	6
		0123456789	0123456789	0123456789
K5-70	VL	TNGSPRLLIK	<u>YASESIS</u> GIP	SRFSGSGSGT
HuK5-70	VL	PGQAPRLLIK	<u>YASESIS</u> GIP	ARFSGSGSGT
L41174	VL	PGQAPRLLIY	-----GIP	ARFSGSGSGT
			1	
		8	9	0
		0123456789	0123456789	01234567
K5-70	VL	SEDIADYYCQ	<u>QSNSWPFT</u> FG	SGTKLEIK
HuK5-70	VL	PEDFAVYYCQ	<u>QSNSWPFT</u> FG	QGTKVEIK
L41174	VL	PEDFAVYYC-	-----FG	QGTKVEIK

ΦMF.42

		1	2	3	4
		123456789	0123456789	0123456789	0123456789
T6-16	VH	EVQLQQSGP	ELVKPGASVK	ISCKASGYTF	TDYNMHWVKQ SHGKNLEWIG
HuT6-16	VH1	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	TDYNMHWVRQ APGQGLEWIG
HuT6-16	VH2	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	TDYNMHWVRQ APGQGLEWIG
DA935238	VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	T-----WVRQ APGQGLEWMG
		5	6	7	8
		01223456789	0123456789	0123456789	0122223456789
		a			abc
T6-16	VH	YIYPYNGGTGY	NQRFKSRATM	TVDKSSSTAY	MELRSLTSDDSAV
HuT6-16	VH1	YIYPYNGGTGY	NQRFKSRATM	TVDKSTSTAY	MELRSLRSDDTAV
HuT6-16	VH2	YIYPYNGGTGY	NQRFKSRATM	TVDTSTSTAY	MELRSLRSDDTAV
DA935238	VH	-----	-----RVTM	TVDTSTSTAY	MELRSLRSDDTAV
			1	1	
		9	0	1	
		0123456789	000000123456789	0123	
			abcde		
T6-16	VH	YYCAREDYGS	SPSYAMDYWGQGTSV	IVSS	
HuT6-16	VH1	YYCAREDYGS	SPSYAMDYWGQGMV	TVSS	
HuT6-16	VH2	YYCAREDYGS	SPSYAMDYWGQGMV	TVSS	
DA935238	VH	YYCAR-----	-----WGQGMV	TVSS	

ΦΠ.43

	1	2	3
	123456789	0123456789	012345677777789
			abcde
T6-16 VL	DVVMTQTPL	SLPVSLGDQA	SISCRSSQSLVHGNG NTYLHWYLQK
HuT6-16 VL	DIVMTQSPL	SLPVTPGEPA	SISCRSSQSLVHGNG NTYLHWYLQK
M99608 VL	DIVMTQSPL	SLPVTPGEPA	SISC-----WYLQK
	4	5	6
	0123456789	0123456789	0123456789
T6-16 VL	PGQSPKLLIY	KVSNRFSGVP	DRFSGSGSGT DFTLKISRVE
HuT6-16 VL	PGQSPQLLIY	KVSNRFSGVP	DRFSGSGSGT DFTLKISRVE
M99608 VL	PGQSPQLLIY	-----GVP	DRFSGSGSGT DFTLKISRVE
	8	9	0
	0123456789	0123456789	01234567
T6-16 VL	AEDLGVYFCS	QTTHVP-TFG	SGTKLEIK
HuT6-16 VL	AEDVGVYYCS	QTTHVP-TFG	GGTKVEIK
M99608 VL	AEDVGVYYC-----	FG	GGTKVEIK

ΦM.44

HuK5-70 VH

ΦH7.45

GAA	TTC	ACC	ACC	ATG	GGG	TGG	AGC	TGC	ATT	ATC	CTG	TTT	CTT	GTC	GCA	ACT	GCA	ACA	GGC
				M	G	W	S	C	I	I	L	F	L	V	A	T	A	T	G

GTT	CAC	TCA	CAG	GTT	CAG	CTA	GTC	CAG	TCT	GGA	GCT	GAG	GTG	AAG	AAA	CCA	GGG	GCA	TCT
V	H	S	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	F	G	A	S

GTC	AAA	GTG	AGC	TGT	AAG	GCC	TCT	GGC	TAT	ACG	TTC	ACG	ATA	TAC	TGG	ATC	AAT	TGG	GTG
V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>I</u>	<u>N</u>	W	V

AGG	CAA	GCT	CCT	GGA	CAA	CGG	TTG	GAA	TGG	ATT	GGC	AAC	ATC	TAT	CCC	TCA	GAC	TCC	TAC
R	Q	A	P	G	Q	R	L	E	W	I	G	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>

ACC	AAC	TAC	AAT	CAG	AAG	TTC	AAG	GAC	AAA	GCC	ACT	CTC	ACC	GTA	GAT	ACC	AGT	GCC	TCC
<u>T</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	K	A	T	L	T	V	D	T	S	A	S

ACA	GCC	TAT	ATG	GAG	CTG	AGC	AGT	TTA	CGC	AGC	GAA	GAT	ACA	GCG	GTG	TAC	TAC	TGC	ACC
T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T

AGA	ACC	TCC	ATG	GCT	GAC	TAT	TGG	GGT	CAG	GGT	ACA	CTG	GTG	ACT	GTG	AGC	TCC	GCT	AGC
R	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S		

HuK5-70 VL

ΦM7.46

ACC	GGT	ACC	ACC	ATG	GTA	AGC	ACA	CCC	CAG	TTC	CTC	GTT	TTC	CTC	CTG	TTT	TGG	ATT	CCC
				M	V	S	T	P	Q	F	L	V	F	L	L	F	W	I	P

GCA	AGT	AGA	GGG	GAG	ATC	GTC	TTG	ACT	CAG	AGT	CCT	GCC	ACA	CTG	TCT	CTT	TCA	CCA	GGA
A	S	R	G	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G

GAA	AGG	GCG	ACA	CTT	AGC	TGT	CGA	GCT	TCT	CAG	AGC	ATT	GGC	ACG	TCC	ATA	CAC	TGG	TAI
E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	I	G	T	S	I	H	W	Y

CAG	CAG	AAA	CCG	GGA	CAA	GCT	CCA	CGG	TTA	CTG	ATC	AAG	TAT	GCC	TCC	GAA	AGC	ATC	TCT
Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	K	Y	A	S	E	S	I	S

GGG	ATT	CCT	GCA	CGC	TTT	AGC	GGA	AGC	GGT	AGT	GGT	ACC	GAC	TTC	ACT	CTG	ACC	ATA	TCC
G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S

TCA	CTA	GAA	CCC	GAG	GAT	TTT	GCC	GTG	TAC	TAC	TGC	CAG	CAG	TCC	AAC	TCA	TGG	CCT	TTC
S	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	S	N	S	W	P	F

ACC	TTT	GGC	CAA	GGC	ACC	AAA	GTG	GAG	ATC	AAG	CGT	ACG							
T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K									

HuT6-16 VH1

ΦM.47

47/74

```

GAA TTC ACC ACC ATG GGA TGG TCT TGG ATC TTT CTC TTC CTG CTG TCT GGC ACA GCT GGA
      M   G   W   S   W   I   F   L   F   L   L   S   G   T   A   G
-----
GTG CAT TCC CAA GTT CAG CTG GTC CAG TCC GGA GCT GAA GTT AAA AAG CCC GGG GCC AGC
V   H   S   Q   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   F   G   A   S
-----
GTC AAA GTC TCC TGC AAG GCA TCC GGG TAT ACT TTT ACC GAT TAT AAC ATG CAC TGG GTG
V   K   V   S   C   K   A   S   G   Y   T   F   T   D   Y   N   M   H   W   V

CGC CAA GCA CCC GGC CAG GGC CTG GAG TGG ATT GGC TAT ATC TAT CCT TAT AAT GGA GGG
R   Q   A   F   G   Q   G   L   E   W   I   G   Y   I   Y   F   Y   N   G   G

ACC GGC TAC AAC CAG AGA TTC AAG AGC AGA GCC ACC ATG ACA GTG GAT AAA TCT ACC AGC
T   G   Y   N   Q   R   F   K   S   R   A   T   M   T   V   D   K   S   T   S

ACT GCC TAC ATG GAG CTG AGA AGC CTG CGG AGC GAC GAC ACA GCC GTG TAC TAC TGT GCC
T   A   Y   M   E   L   R   S   L   R   S   D   D   T   A   V   Y   Y   C   A

CGC GAG GAT TAC GGA AGC AGC CCA AGC TAC GCC ATG GAT TAC TGG GGC CAA GGC ACT ATG
R   E   D   Y   G   S   S   P   S   Y   A   M   D   Y   W   G   Q   G   T   M

GTG ACC GTG AGC AGC GCT AGC
V   T   V   S   S   

```

HuT6-16
VH2

ΦH7.48

GAA	TTC	ACC	ACC	ATG	GGC	TGG	TCT	TGG	ATC	TTC	CTC	TTC	CTG	CTG	AGC	GGG	ACC	GCT	GGA
				M	G	W	S	W	I	F	L	F	L	L	S	G	T	A	G

GTC	CAI	TCT	CAA	GTC	CAA	CTG	GTC	CAG	TCC	GGG	GCT	GAA	GTG	AAA	AAA	CCA	GGA	GCA	TCC
V	H	S	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S

GTT	AAG	GTG	TCC	TGT	AAG	GCA	AGC	GGA	TAC	ACC	TTT	ACC	GAC	TAT	AAC	ATG	CAC	TGG	GTG
V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	W	V
AGG	CAG	GCC	CCC	GGA	CAG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATC	GGC	TAT	ATT	TAT	CCT	TAC	AAC	GGG	GGC
R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	<u>Y</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	G	G
ACT	GGC	TAT	AAT	CAG	AGA	TTT	AAG	AGC	CGC	GCT	ACC	ATG	ACC	GTG	GAC	ACC	TCC	ACT	TCT
<u>T</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	R	A	T	M	T	V	D	T	S	T	S
ACA	GCC	TAT	ATG	GAG	CTG	AGA	AGC	CTG	CGG	AGC	GAT	GAT	ACA	GCC	GTG	TAC	TAC	TGC	GCC
T	A	Y	M	E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A
AGA	GAA	GAT	TAC	GGC	AGC	AGC	CCC	AGC	TAC	GCC	ATG	GAC	TAC	TGG	GGC	CAG	GGC	ACA	ATG
R	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>M</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	W	G	Q	G	T	M
GTT	ACT	GTG	AGC	AGC	GCT	AGC													
V	T	V	S	S															

HuT6-16
VL

ΦH7.49

ACC	GGT	ACC	ACC	ATG	AAG	CTC	CCA	GIG	CGC	CTC	CTG	GTC	CTG	ATG	TTC	TGG	ATT	CCC	GCT
				M	K	L	P	V	R	L	L	V	L	M	F	W	I	P	A

TCC	TCT	AGC	GAT	ATC	GTC	ATG	ACC	CAA	TCC	CCA	CTG	TCT	CTG	CCT	GIG	ACA	CCA	GGC	GAA
S	S	S	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E

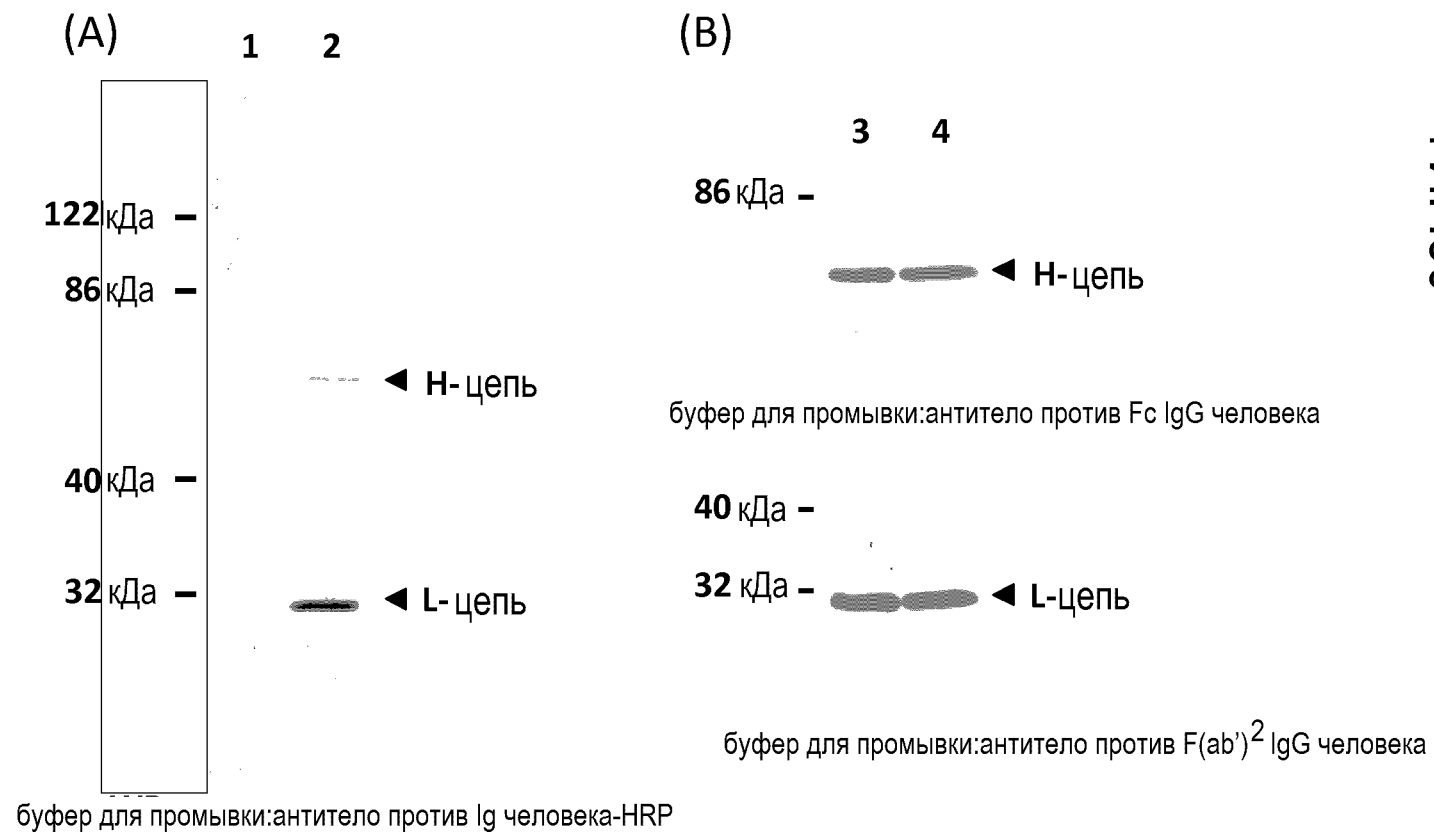
CCT	GCA	TCT	ATT	AGC	TGT	AGA	AGC	AGC	CAG	TCC	CTG	GIG	CAC	GGA	AAC	GGA	AAC	ACC	TAT
P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	V	H	G	N	G	N	T	Y

CTG	CAC	TGG	TAC	CTG	CAA	AAA	CCT	GGA	CAG	AGC	CCC	CAG	CTG	CTG	ATC	TAC	AAA	GTC	AGC
L	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S

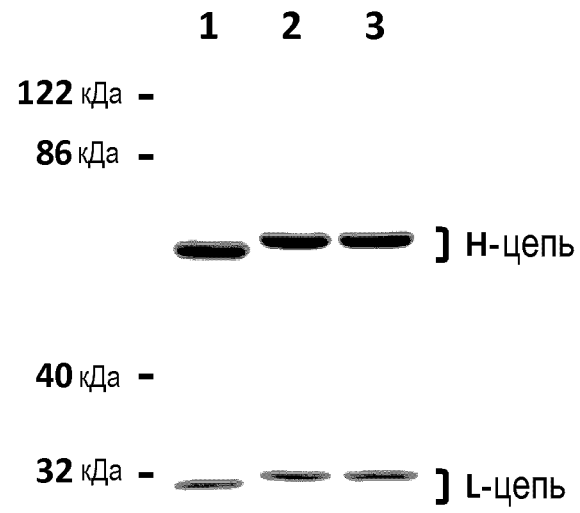
AAI	AGA	TTT	AGC	GGG	GIG	CCC	GAC	AGG	TTT	AGC	GGC	AGC	GGC	AGC	GGC	ACA	GAT	TTC	ACC
N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T

CTG	AAA	ATC	TCC	CGG	GIG	GAA	GCC	GAG	GAC	GTT	GGG	GTT	TAC	TAT	TGC	AGC	CAG	ACA	ACC
L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	S	Q	T	T

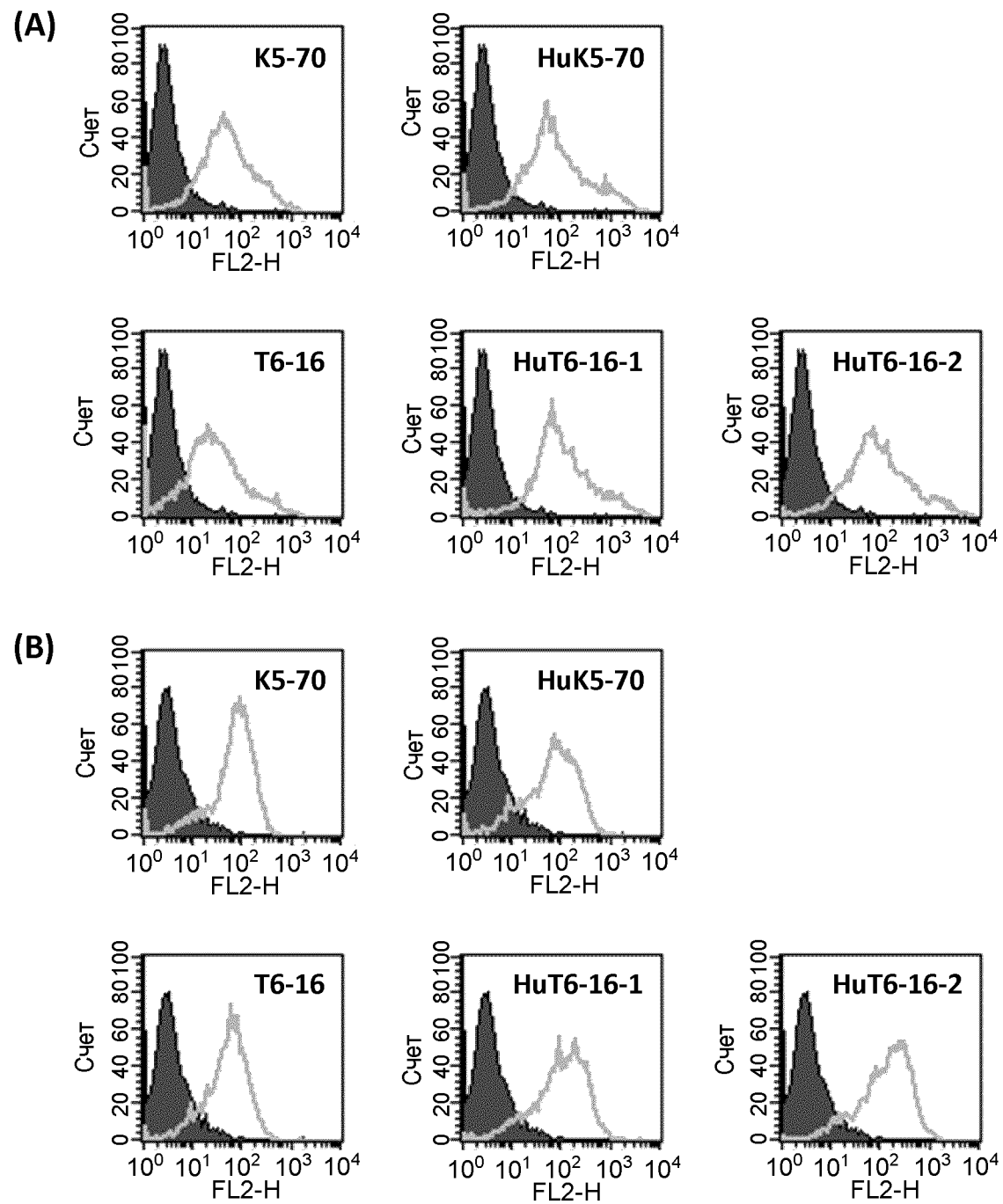
CAI	GIG	CCC	ACT	TTC	GGG	GGC	GGC	ACT	AAG	GIG	GAG	ATC	AAG	CGT	ACG				
H	V	P	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K						



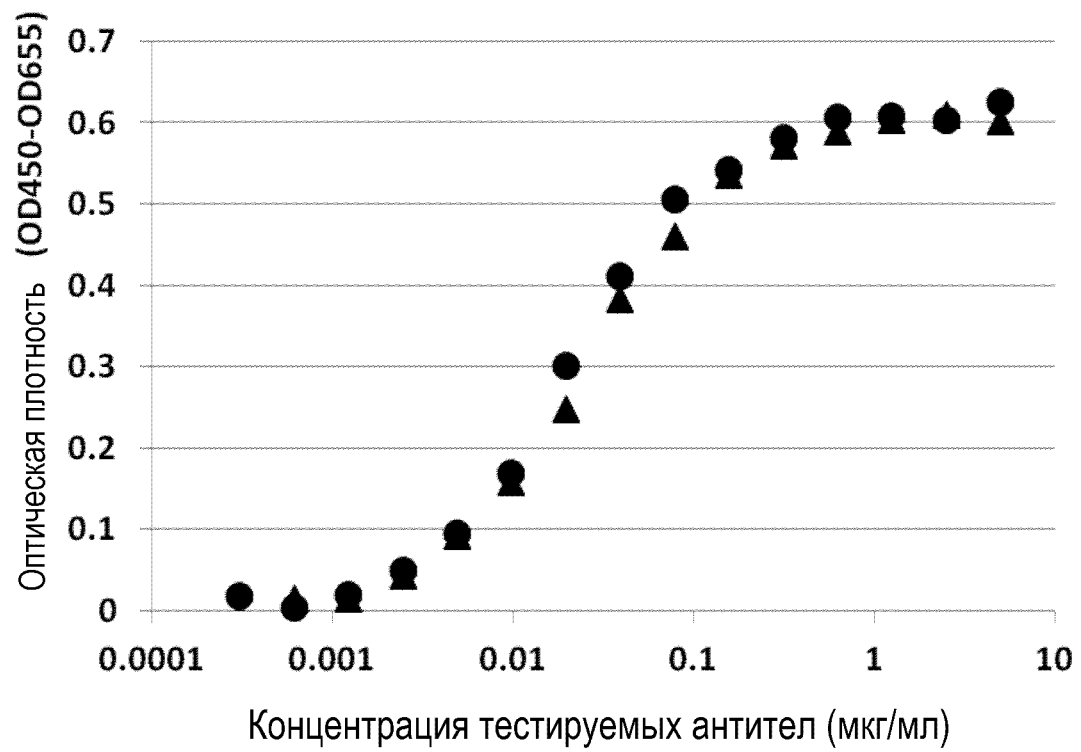
ФИГ. 50



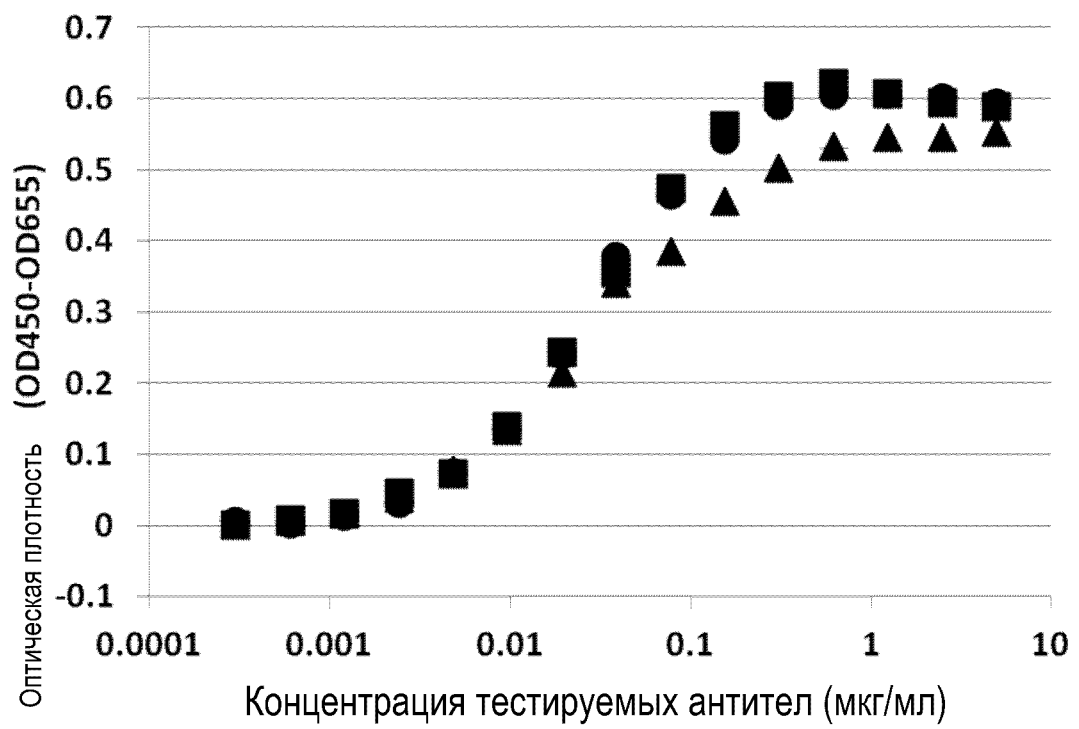
ФИГ. 51



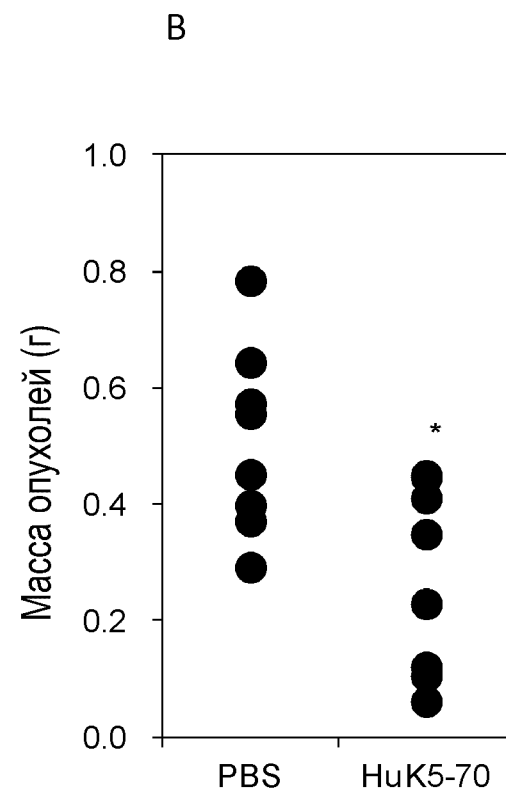
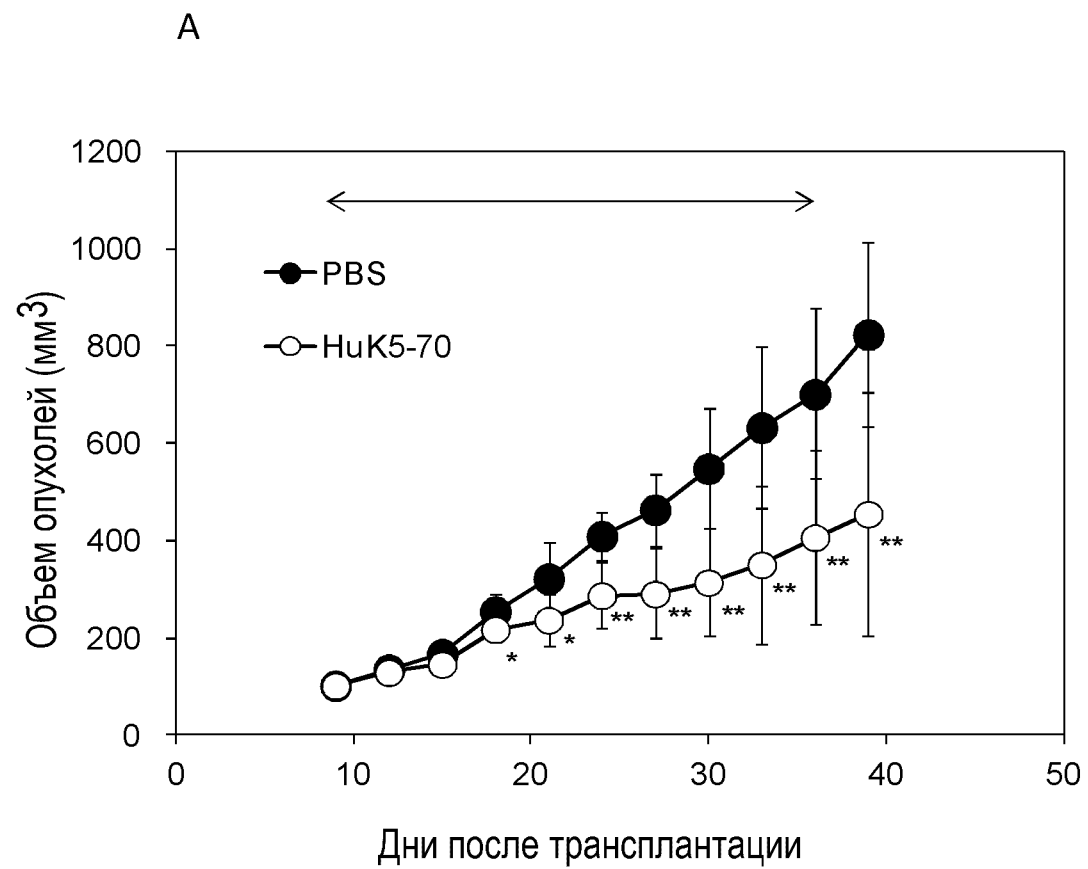
Фиг. 52



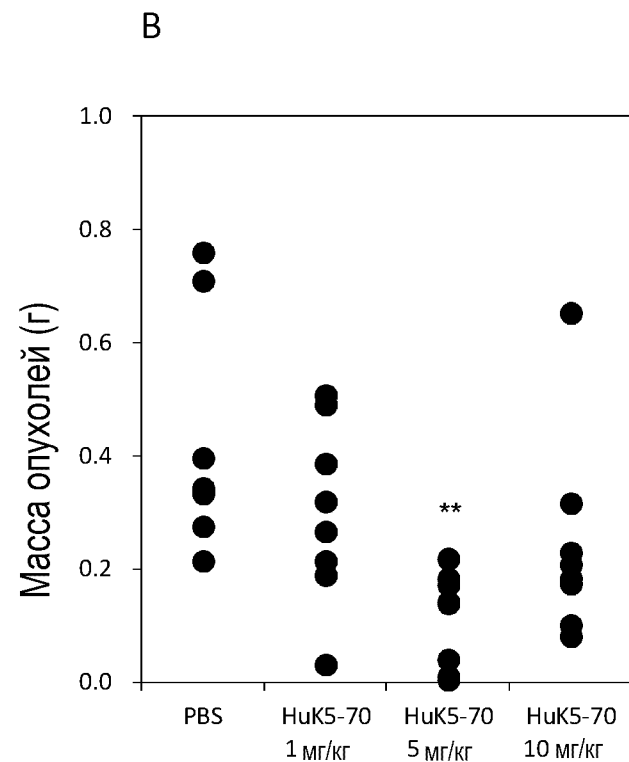
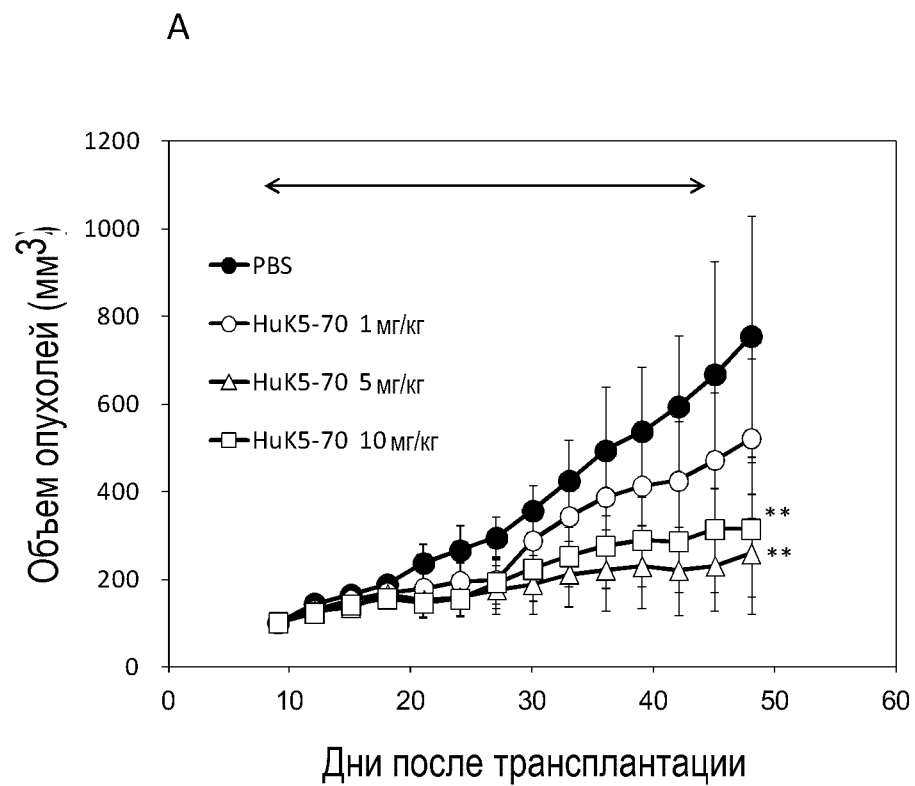
ФИГ. 53



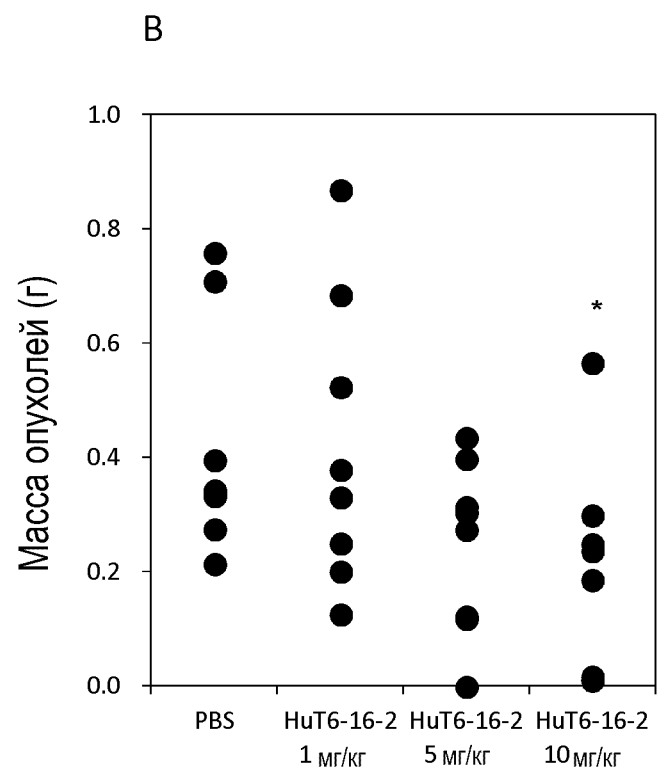
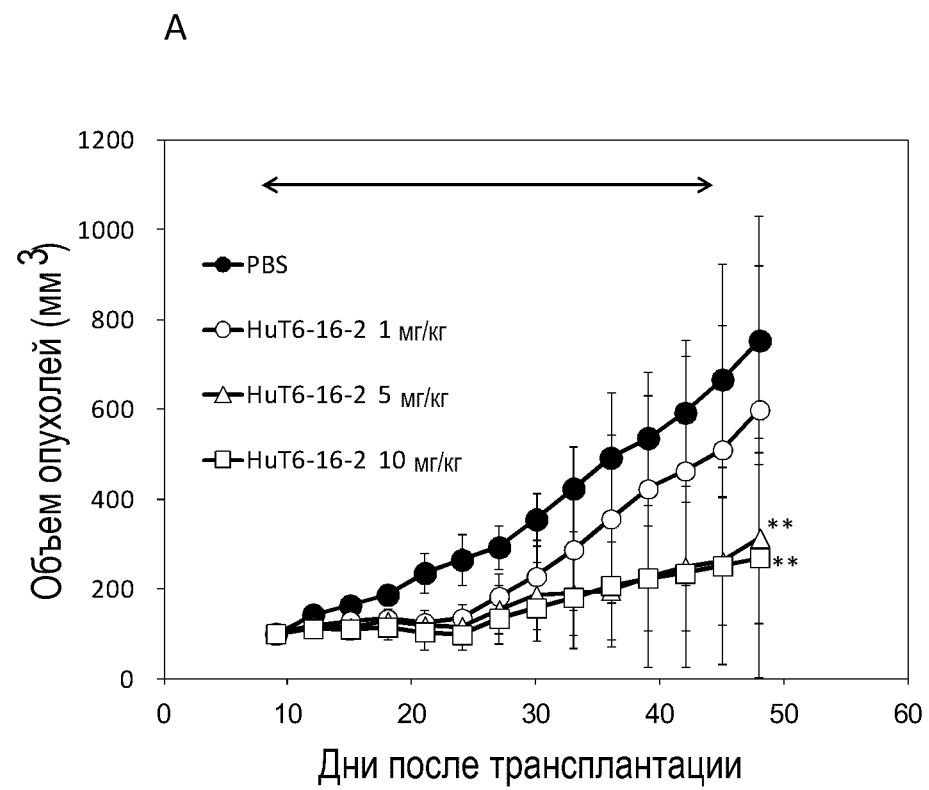
ФИГ. 54



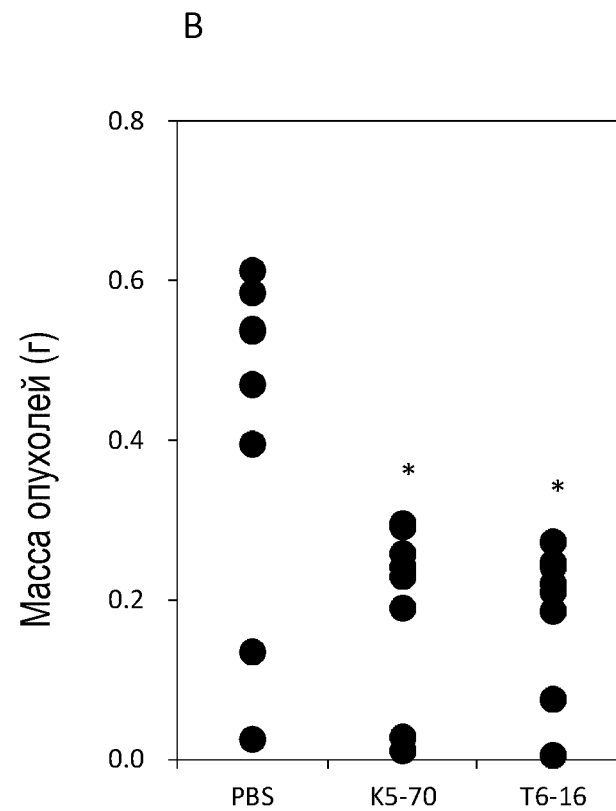
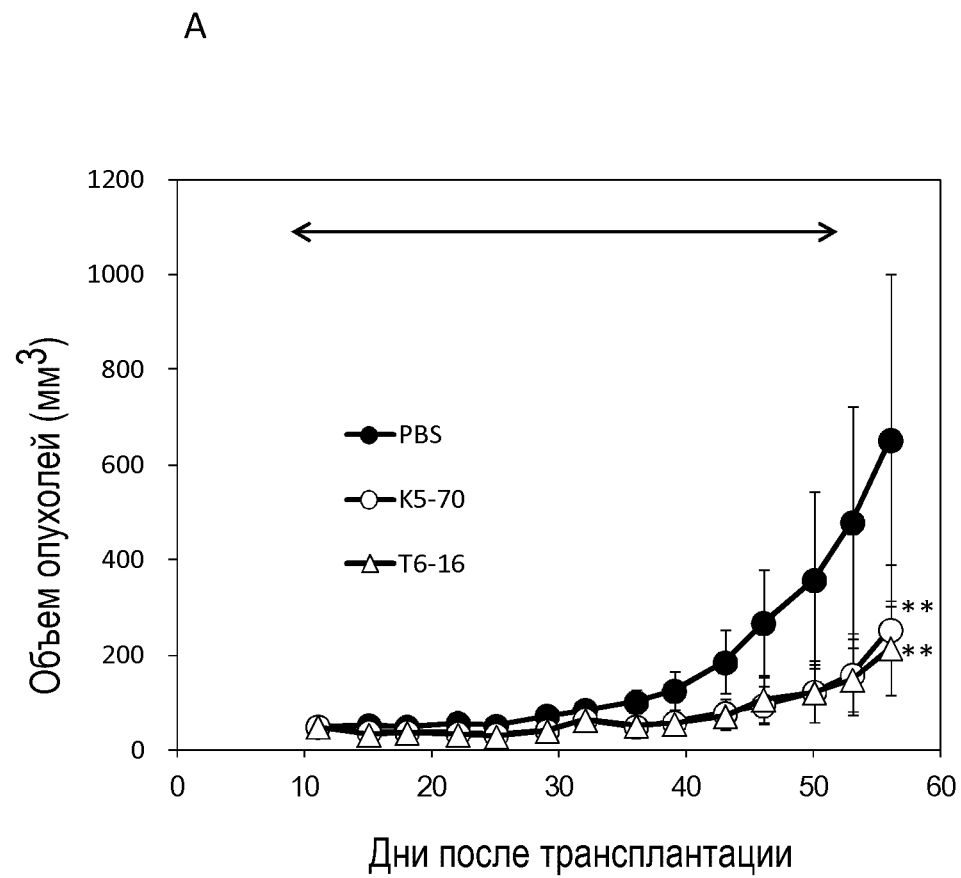
ФИГ. 55



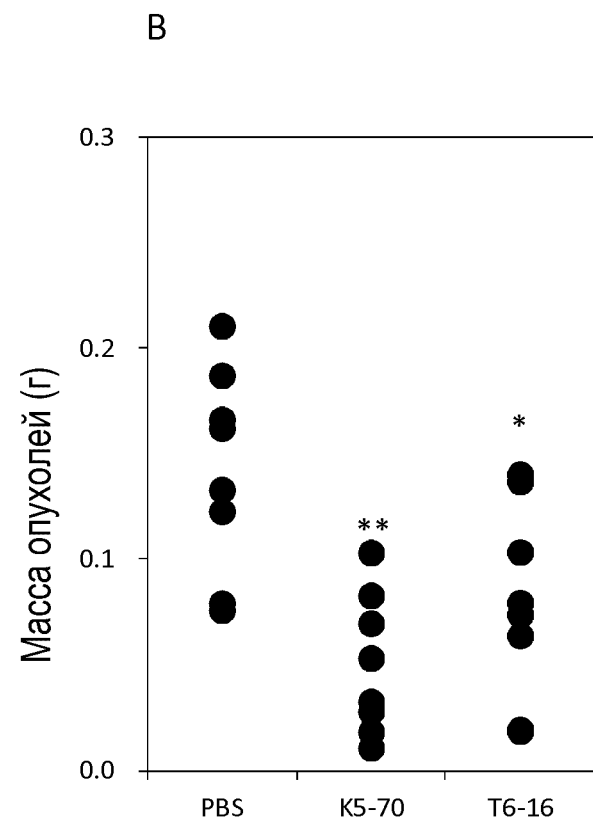
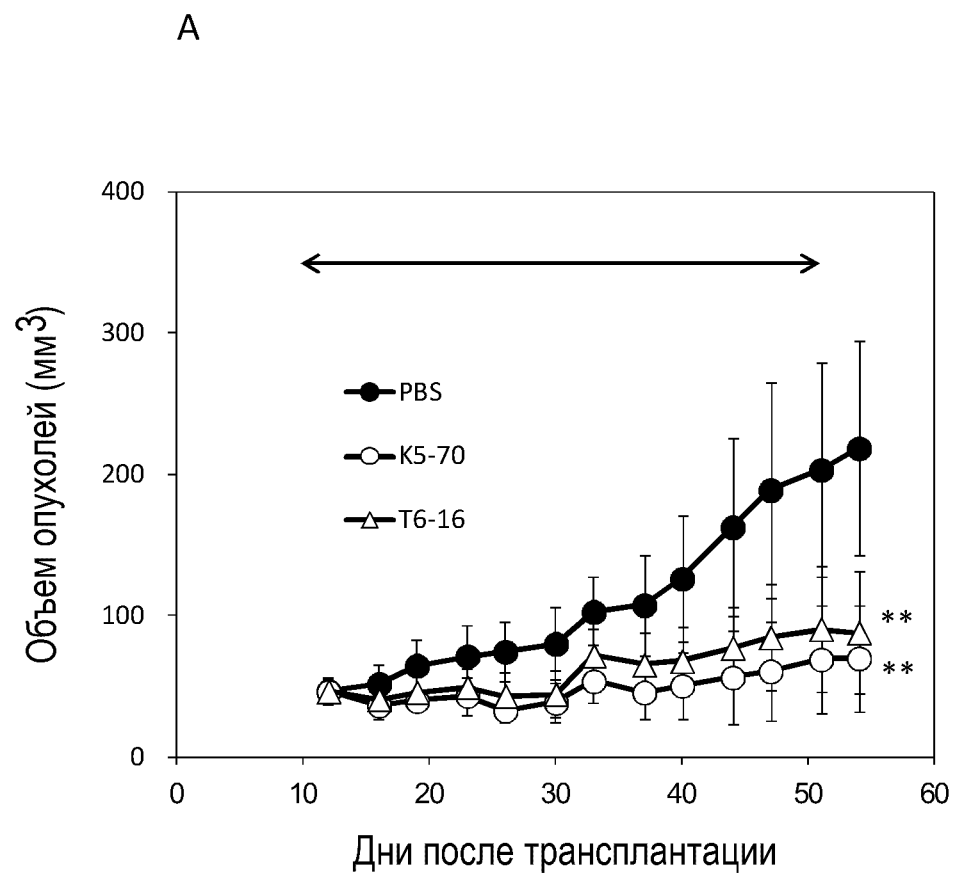
ФИГ. 56



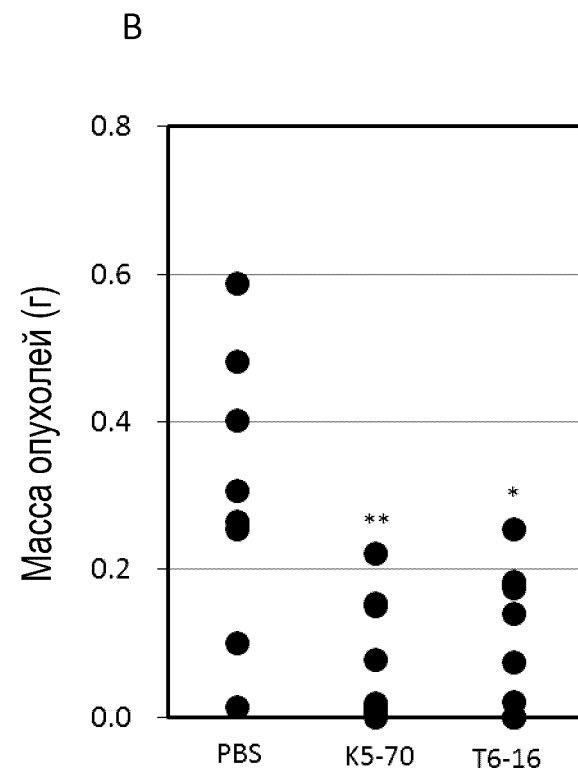
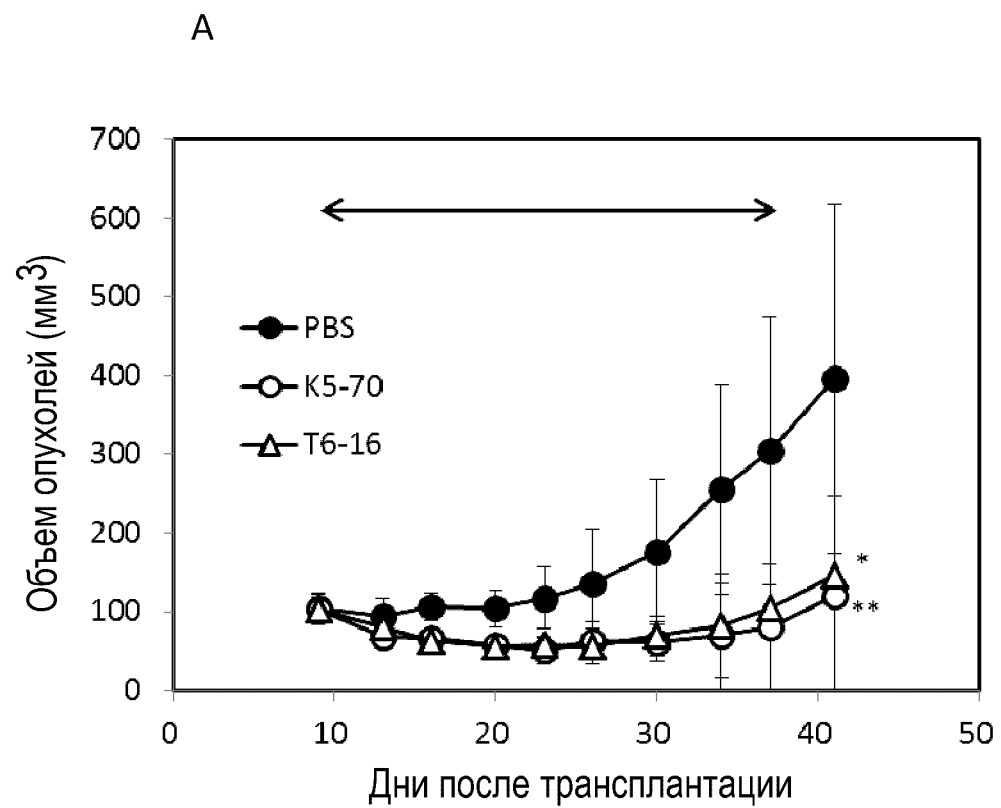
ФИГ. 57



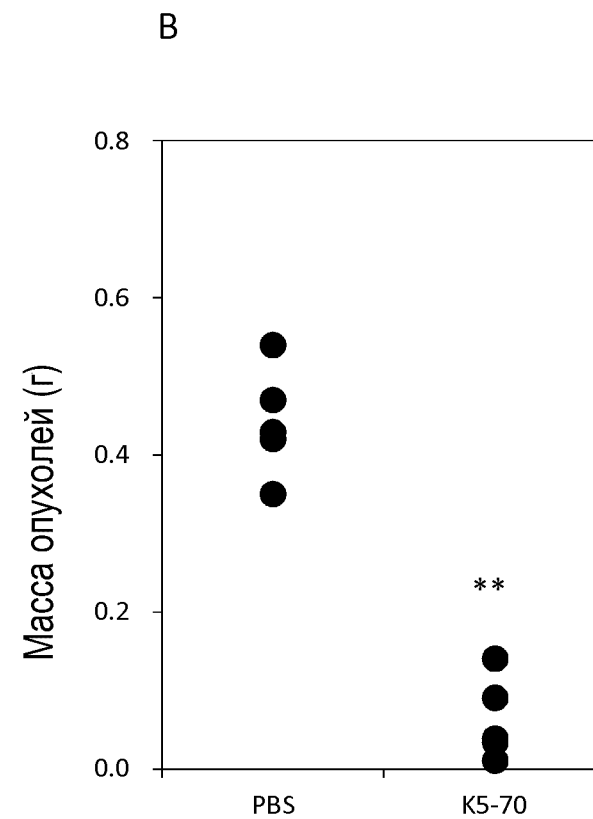
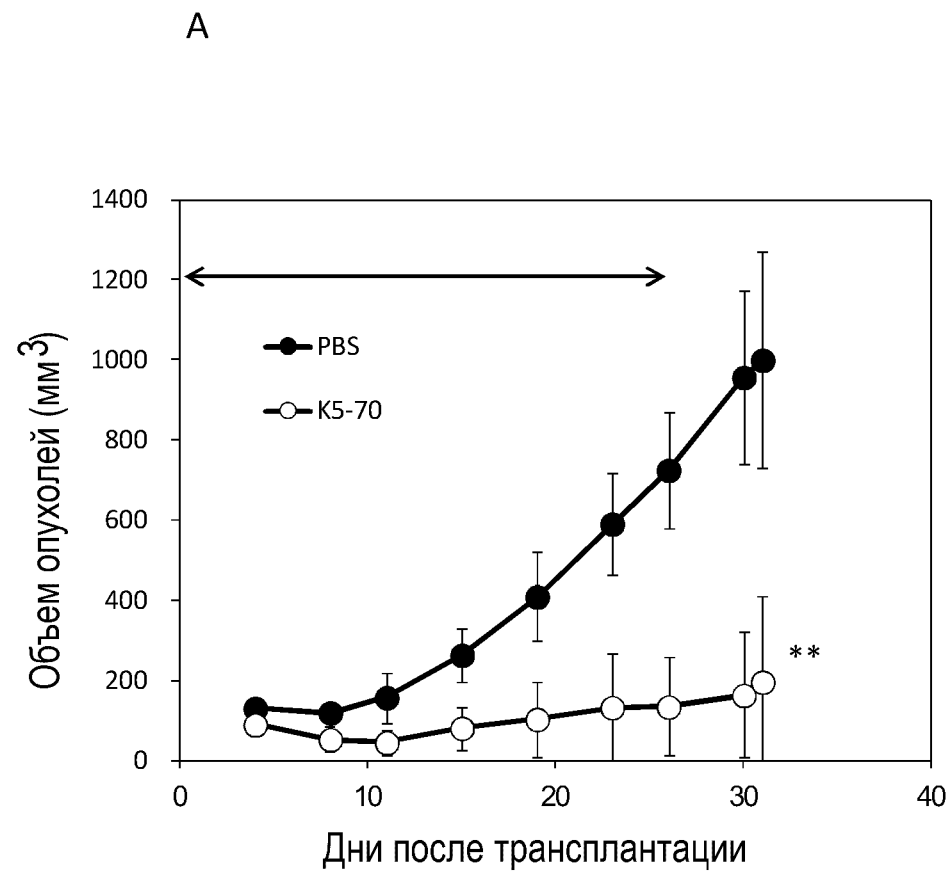
ФИГ. 58



ФИГ. 59

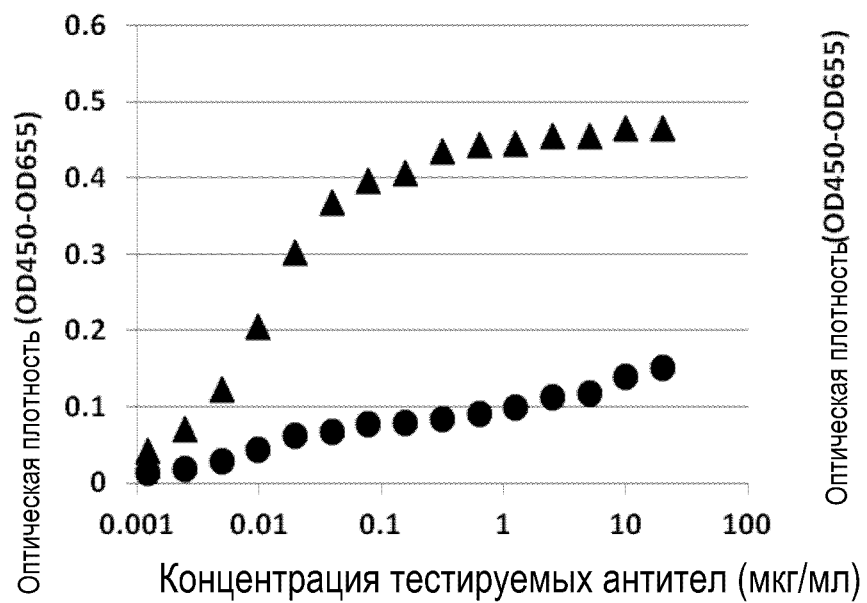


ФИГ.60

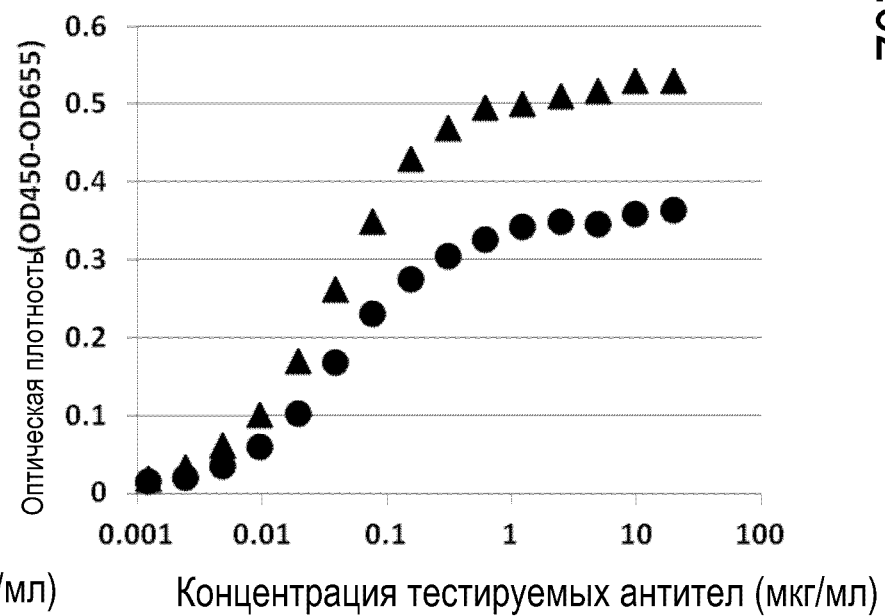


ФИГ. 61

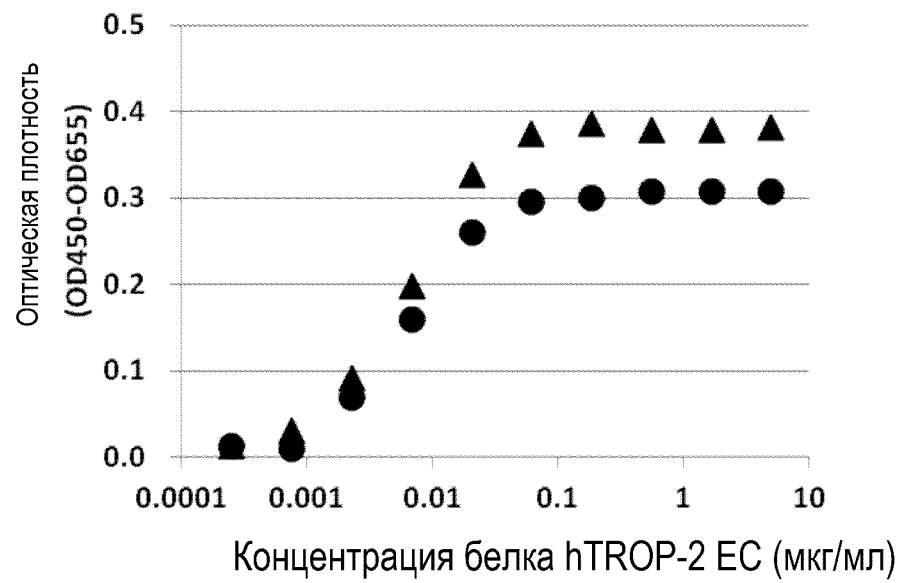
(A)



(B)



ФИГ. 62



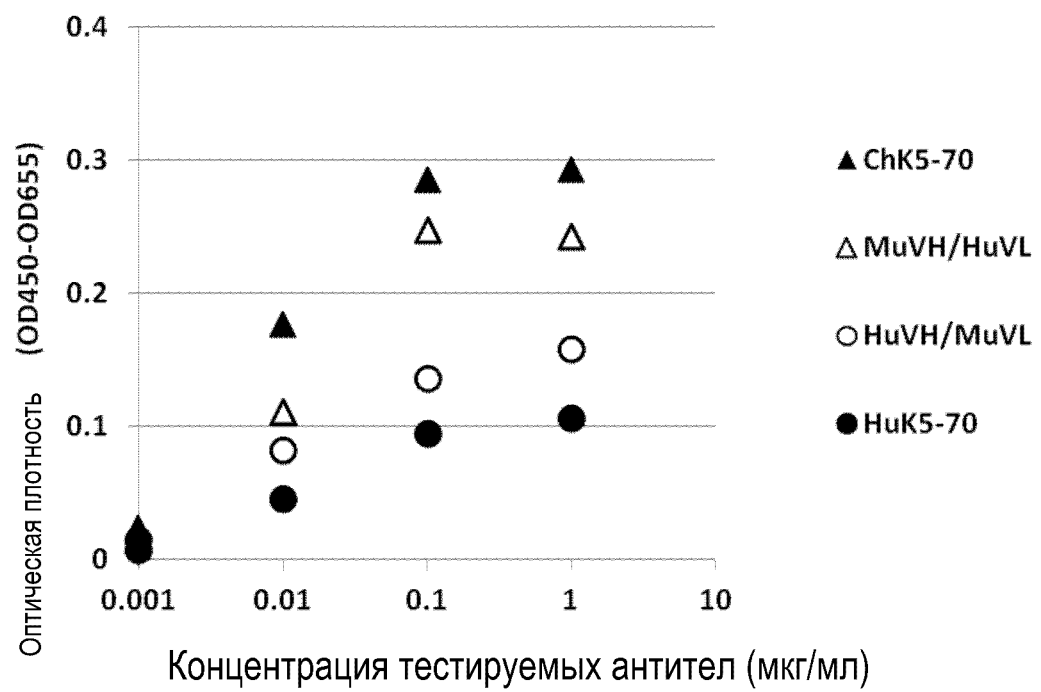
ФИГ. 63

EcoRIKozak
GAA TTC ACC ACC ATG GGA TGG TCC TGC ATT ATT CTC TTT CTC GTC GCC ACC GCC ACA GGC
M G W S C I I L F L V A T A T G
GTG CAC AGC CAG GTT CAA CTG CAG CAA CCT GGG GCA GAG CTG GTT CGG CCA GGG GCC TCC
V H S Q V Q L Q Q P G A E L V R P G A S
GTC AAA CTG TCC TGC AAA GCT TCT GGC TAC ACT TTC ACC ATC TAC TGG ATC AAC TGG GTG
V K L S C K A S G Y T F T I Y W I N W V
AAG CAG AGG CCC GGC CAG GGC CTG GAA TGG ATC GGA AAT ATC TAT CCT AGC GAT TCT TAC
K Q R P G Q G L E W I G N I Y P S D S Y
ACA AAT TAC AAC CAG AAG TTC AAG GAC AAG GCT ACC CTG ACC GTG GAC AAA TCT AGC TCC
T N Y N Q K F K D K A T L T V D K S S S
ACA GCC TAC ATG CAG CTG AGC AGC CCC ACT AGC GAG GAT AGC GCA GTG TAT TAT TGT ACC
T A Y M Q L S S P T S E D S A V Y Y C T
AGA ACC AGC ATG GCC GAC TAT TGG GGA CAG GGC ACA ACT CTG ACC GTG AGC AGC NheI
R T S M A D Y W G Q G T T L T V S S GCT AGC

ΦM1.64

AgeI	Kozak																			
<u>ACC</u>	<u>GGT</u>	<u>ACC</u>	<u>ACC</u>	ATG	GTT	AGC	ACA	CCT	CAA	TTT	CTG	GTC	TTC	CTG	CTC	TTC	TGG	ATT	CCT	
				M	V	S	T	P	Q	F	L	V	F	L	L	F	W	I	P	
GCC	AGC	AGA	GGA	GAT	ATC	CTC	CTG	ACA	CAA	AGC	CCC	GCA	ATC	CTG	AGC	GTG	TCC	CCC	GGA	
A	S	R	G	<u>D</u>	I	L	L	T	Q	S	P	A	I	L	S	V	S	P	G	
GAG	CGC	GTG	AGC	TTT	AGC	TGC	CGG	GCC	AGC	CAG	AGC	ATT	GGA	ACC	AGC	ATC	CAC	TGG	TAT	
E	R	V	S	F	S	C	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>H</u>	W	Y	
CAG	CAG	AGA	ACC	AAC	GGG	TCT	CCC	AGG	CTG	CTG	ATT	AAA	TAC	GCT	TCT	GAG	TCT	ATT	TCC	
Q	Q	R	T	N	G	S	P	R	L	L	I	K	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	
GGG	ATC	CCA	AGC	AGA	TTC	TCC	GGC	TCT	GGC	AGC	GGC	ACT	GAT	TTT	ACT	CTG	TCT	ATC	AAC	
G	I	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	S	I	N	
AGC	GTG	GAG	TCC	GAA	GAC	ATC	GCC	GAC	TAC	TAT	TGT	CAG	CAG	AGC	AAT	TCC	TGG	CCA	TTC	
S	V	E	S	E	D	I	A	D	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>P</u>	<u>F</u>	
												BsiWI								
ACC	TTT	GGC	AGC	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAG	<u>CGT</u>	<u>ACG</u>								
<u>T</u>	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K										

ΦM1.65

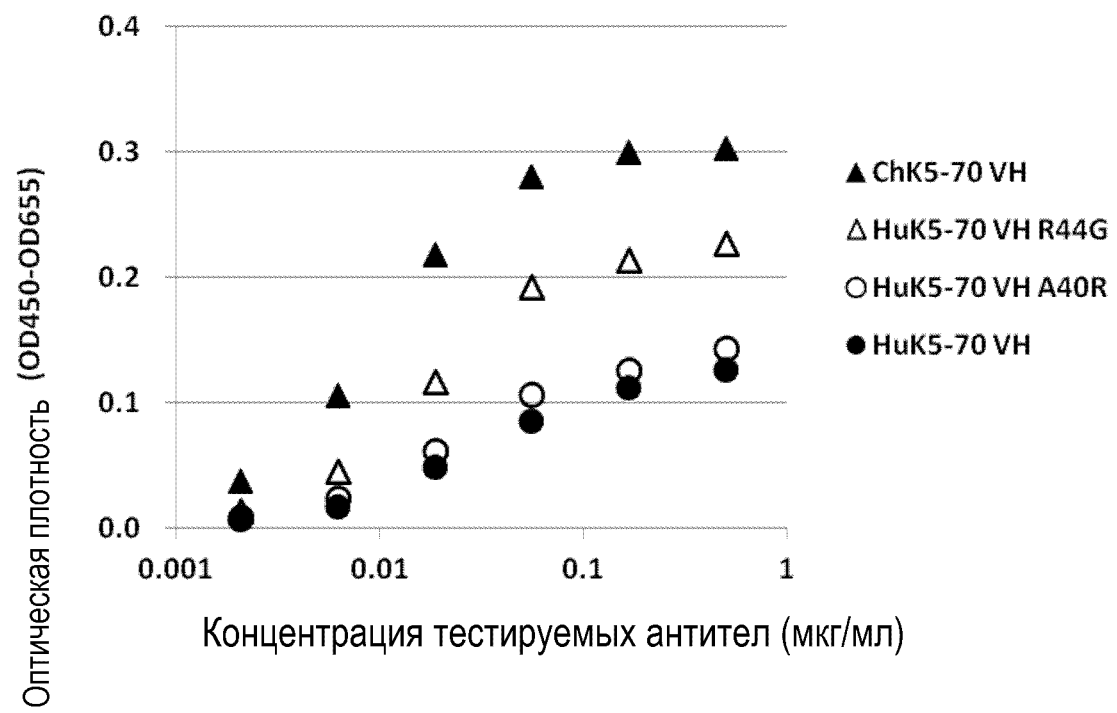


ФИГ. 66

ΦИГ.67

		1	2	3	4	5
	123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	01223456789
						a
HuK5-70 VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF	TIYWINWVRQ	APGQRLEWIG	NIYPSDSYTN
V5Q	---Q---	-----	-----	-----	-----	-----
S7P	-----P--	-----	-----	-----	-----	-----
V11L	-----	-L-----	-----	-----	-----	-----
K12V	-----	--V-----	-----	-----	-----	-----
K13R	-----	---R-----	-----	-----	-----	-----
V20L	-----	-----	L-----	-----	-----	-----
R38K	-----	-----	-----	-----K-	-----	-----
A40R	-----	-----	-----	-----	R-----	-----
R44G	-----	-----	-----	-----	---G-----	-----
T73K	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A75S	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E81Q	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L82cP	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R83T	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T87S	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L108T	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V109L	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V11L/R38K	-----	-L-----	-----	-----K-	-----	-----

					1	1
	6	7	8	9	0	1
	0123456789	0123456789	0122223456789	0123456789	0123456789	0123
		abc				
HuK5-70 VH	NQKF K D K ATL	TVDT S ASTAY	MEL S SLRSED T AV	YYC T RT S MA-	-DYWGQGT L V	TVSS
V5Q	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S7P	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V11L	-----	-----	-----	-----	-----	-----
K12V	-----	-----	-----	-----	-----	-----
K13R	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V20L	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R38K	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A40R	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R44G	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T73K	-----	---K-----	-----	-----	-----	-----
A75S	-----	---S-----	-----	-----	-----	-----
E81Q	-----	-----	-Q-----	-----	-----	-----
L82cP	-----	-----	---P-----	-----	-----	-----
R83T	-----	-----	---T-----	-----	-----	-----
T87S	-----	-----	-----S--	-----	-----	-----
L108T	-----	-----	-----	-----	-----T-	-----
V109L	-----	-----	-----	-----	-----L-	-----
V11L/R38K	-----	-----	-----	-----	-----	-----

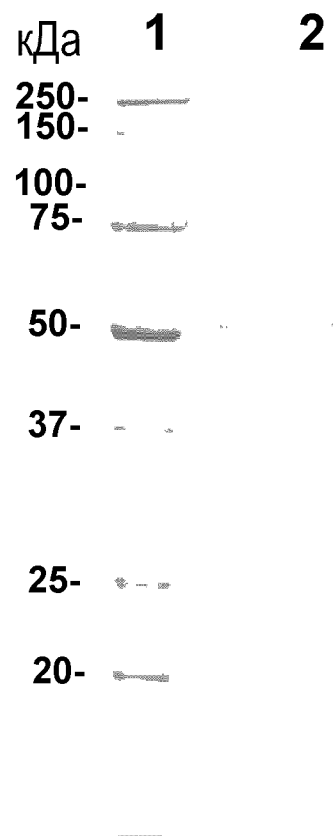


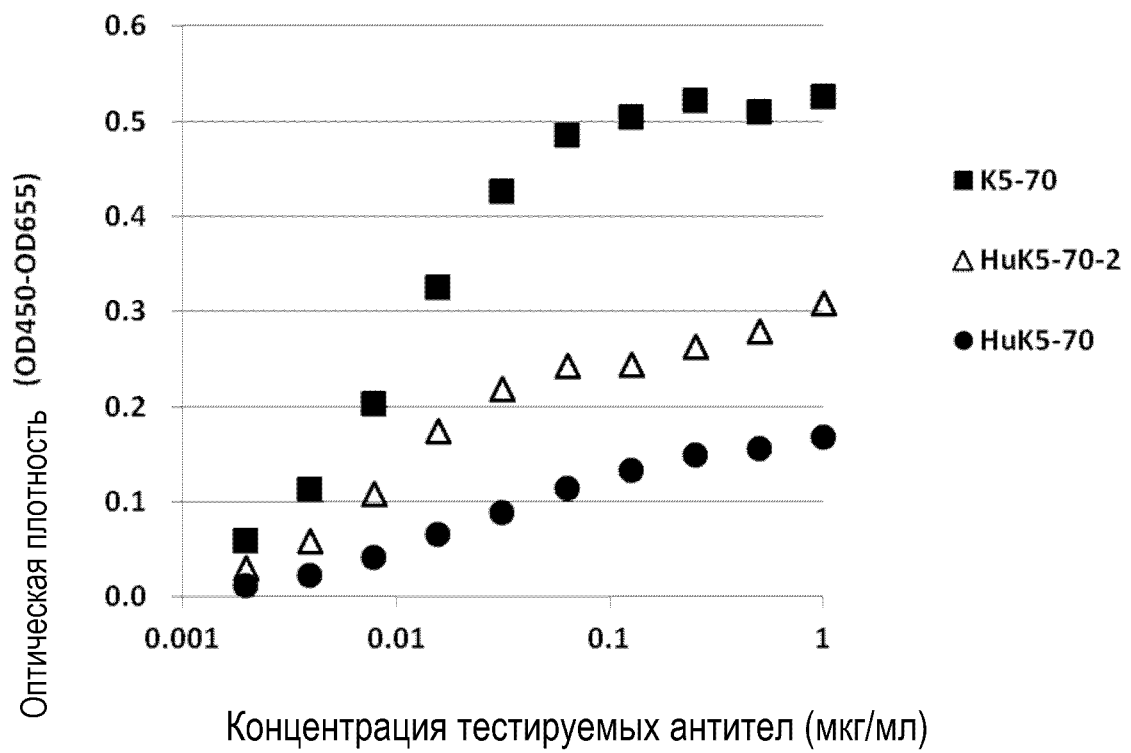
ФИГ. 68

EcoRI		Kozak																		
<u>GAA</u>	<u>TTC</u>	<u>ACC</u>	<u>ACC</u>	ATG	GGC	TGG	AGC	TGT	ATT	ATT	CTC	TTC	CTC	GTC	GCC	ACT	GCA	ACC	GGG	
				<i>M</i>	<i>G</i>	<i>W</i>	<i>S</i>	<i>C</i>	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>L</i>	<i>F</i>	<i>L</i>	<i>V</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	
GTC	CAC	TCC	CAG	GTC	CAG	CTG	GTG	CAG	AGC	GGA	GCT	GAG	GTG	AAG	AAG	CCC	GGC	GCC	AGC	
<i>V</i>	<i>H</i>	<i>S</i>	<u><i>Q</i></u>	<i>V</i>	<i>Q</i>	<i>L</i>	<i>V</i>	<i>Q</i>	<i>S</i>	<i>G</i>	<i>A</i>	<i>E</i>	<i>V</i>	<i>K</i>	<i>K</i>	<i>P</i>	<i>G</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	
GTT	AAG	GTT	TCT	TGC	AAA	GCC	TCT	GGC	TAT	ACA	TTC	ACA	ATC	TAT	TGG	ATC	AAT	TGG	GTG	
<i>V</i>	<i>K</i>	<i>V</i>	<i>S</i>	<i>C</i>	<i>K</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>G</i>	<i>Y</i>	<i>T</i>	<i>F</i>	<i>T</i>	<u><i>I</i></u>	<u><i>Y</i></u>	<u><i>W</i></u>	<u><i>I</i></u>	<u><i>N</i></u>	<i>W</i>	<i>V</i>	
CGG	CAG	GCT	CCA	GGA	CAA	GGC	CTG	GAA	TGG	ATC	GGC	AAT	ATC	TAT	CCT	TCC	GAC	TCC	TAC	
<i>R</i>	<i>Q</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>G</i>	<i>Q</i>	<i>G</i>	<i>L</i>	<i>E</i>	<i>W</i>	<i>I</i>	<i>G</i>	<u><i>N</i></u>	<u><i>I</i></u>	<u><i>Y</i></u>	<u><i>P</i></u>	<u><i>S</i></u>	<u><i>D</i></u>	<u><i>S</i></u>	<u><i>Y</i></u>	
ACC	AAC	TAT	AAC	CAG	AAA	TTT	AAG	GAC	AAA	GCA	ACA	CTG	ACC	GTG	GAC	ACC	TCT	GCC	AGC	
<u><i>T</i></u>	<u><i>N</i></u>	<u><i>Y</i></u>	<u><i>N</i></u>	<u><i>Q</i></u>	<u><i>K</i></u>	<u><i>F</i></u>	<u><i>K</i></u>	<u><i>D</i></u>	<i>K</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>L</i>	<i>T</i>	<i>V</i>	<i>D</i>	<i>T</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	
ACT	GCT	TAC	ATG	GAG	CTG	AGC	AGC	CTG	AGA	AGC	GAA	GAT	ACT	GCC	GTG	TAC	TAC	TGC	ACC	
<i>T</i>	<i>A</i>	<i>Y</i>	<i>M</i>	<i>E</i>	<i>L</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>L</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>V</i>	<i>Y</i>	<i>Y</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	
AGG	ACA	AGC	ATG	GCC	GAT	TAC	TGG	GGA	CAA	GGG	ACC	CTG	GTG	ACC	GTG	AGC	AGC	<u><i>GCT</i></u> <u><i>AGC</i></u>		
<i>R</i>	<u><i>T</i></u>	<u><i>S</i></u>	<u><i>M</i></u>	<u><i>A</i></u>	<u><i>D</i></u>	<u><i>Y</i></u>	<i>W</i>	<i>G</i>	<i>Q</i>	<i>G</i>	<i>T</i>	<i>L</i>	<i>V</i>	<i>T</i>	<i>V</i>	<i>S</i>	<i>S</i>			

ΦM.69

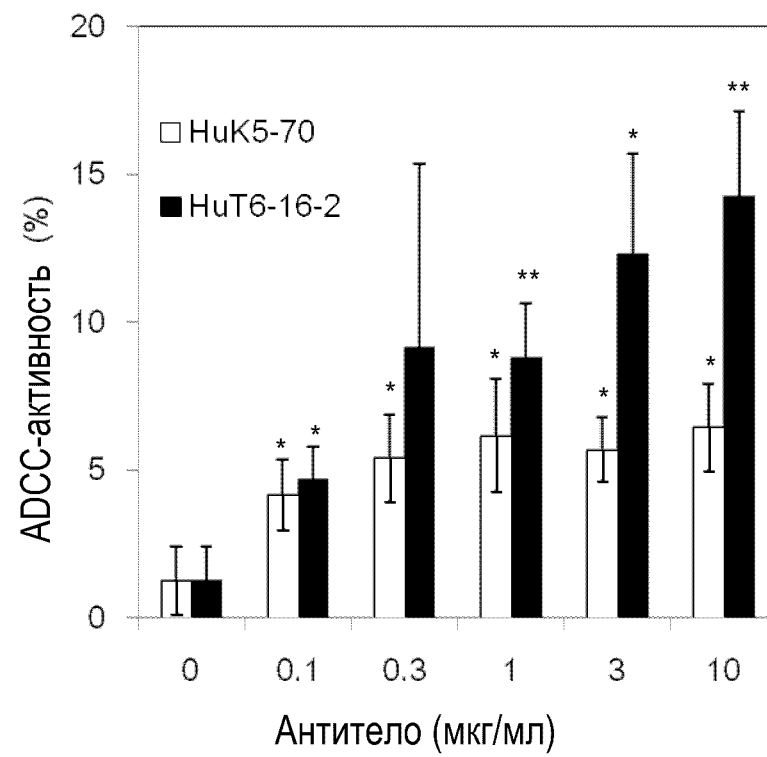
Фиг. 70





ФИГ. 71

SW480

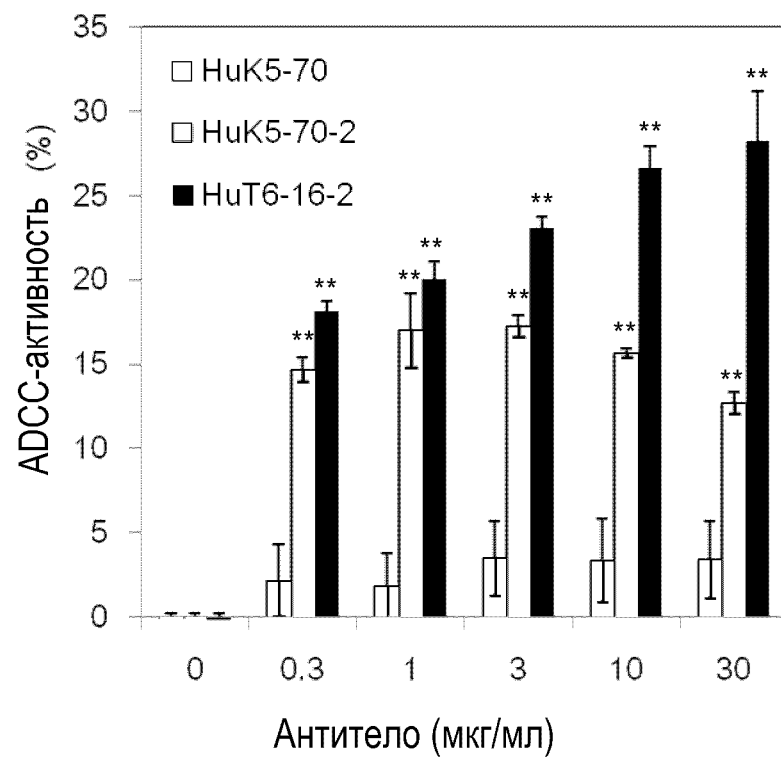


*P < 0.05, **P < 0.01

ФИГ. 72А

72/74

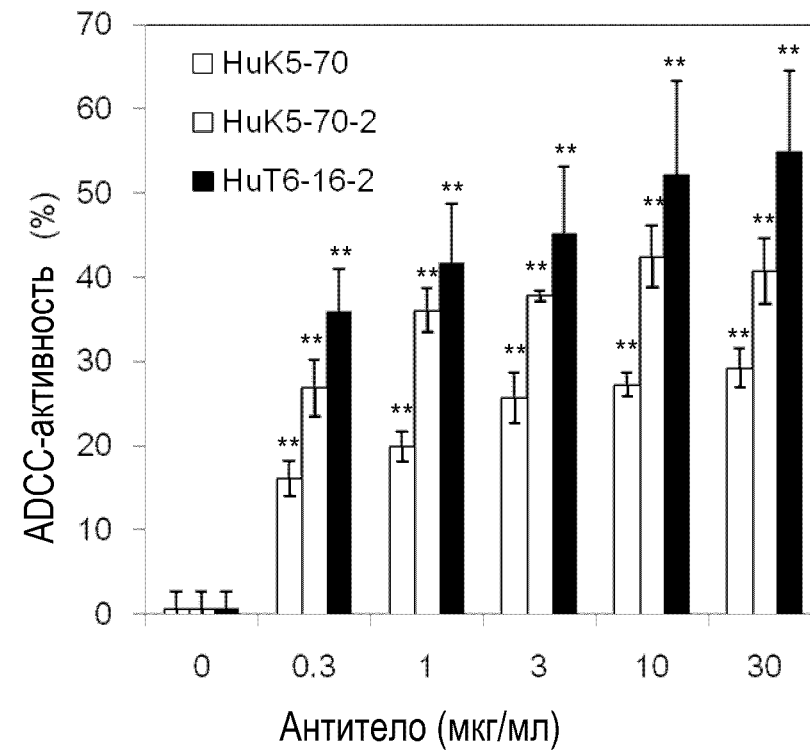
PK-59



**P < 0.01

ФИГ. 7.2В

PC-3



**P < 0.01

ФИГ. 72С

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/080800

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/30(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/30, A61K39/395, A61P35/00, C12N15/09, C12P21/08, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, WPI, BIOSIS(STN), CAPLUS(STN), MEDLINE(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	US 2007/0202113 A1 (Arius Research, Inc.), 30 August 2007 (30.08.2007), & JP 2009-527230 A & EP 1996700 A & WO 2007/095748 A1	18-20, 22-40, 42-44/1-17, 21, 41
X/A	JP 2009-528995 A (Arius Research, Inc.), 13 August 2009 (13.08.2009), & US 2007/0202113 A1 & EP 1996700 A & WO 2007/095748 A1	18-20, 22-40, 42-44/1-17, 21, 41
X/A	JP 2009-527230 A (Arius Research, Inc.), 30 July 2009 (30.07.2009), & US 2007/0202043 A1 & EP 1996701 A & WO 2007/095749 A1	18-20, 22-40, 42-44/1-17, 21, 41

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 February, 2013 (26.02.13)Date of mailing of the international search report
12 March, 2013 (12.03.13)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/080800

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2006-502698 A (Immunomedics, Inc.), 26 January 2006 (26.01.2006), & US 2004/0001825 A1 & EP 1483295 A & WO 2003/074566 A2	18-20, 22-40, 42-44/1-17, 21, 41
X/A	JP 2010-528056 A (F. Hoffmann-La Roche AG.), 19 August 2010 (19.08.2010), & US 2008/0131428 A1 & EP 2155791 A & WO 2008/144891 A1	18-20, 22-40, 42-44/1-17, 21, 41
X/A	WO 2010/089782 A1 (Alberti Saverio), 12 August 2010 (12.08.2010), & JP 2012-516887 A & EP 2393512 A	18-20, 22-40, 42-44/1-17, 21, 41
P, X	WO 2011/145744 A1 (Livtech, Inc.), 24 November 2011 (24.11.2011), (Family: none)	1-44