

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034610**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.27

(21) Номер заявки
201590523

(22) Дата подачи заявки
2013.09.05

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(54) ВЫДЕЛЕННЫЕ IL-18-СВЯЗЫВАЮЩИЕ АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **61/697,981**

(32) **2012.09.07**

(33) **US**

(43) **2015.06.30**

(86) **PCT/IB2013/058317**

(87) **WO 2014/037899 2014.03.13**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Бардрофф Михаэль Отто, Браннетти
Барбара (CH), Кэмбелл Эмма
Мишель (GB), Дифенбах-Штрайбер
Беате, Эберт Адина, Кунц Кристиан
Карстен Сильвестер (DE), Маршалл
Сильвия (GB), Рондо Жан-Мишель
Рене, Шлеппи Жан-Марк Альфред
(CH), Ван Хеке Гино Анселмус (GB)**

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

(56) **WO-A1-2012085015**

EISENHARDT STEFFEN U. ET AL.:
"Subtractive single-chain antibody (scFv) phage-
display: tailoring phage-display for high specificity
against function-specific conformations of cell
membrane molecules.", NATURE PROTOCOLS
2007, vol. 2, no. 12, 2007, pages 3063-3073,
XP009175982, ISSN: 1750-2799, the whole document

NOVICK D. ET AL.: "High circulating
levels of free interleukin-18 in patients with
active SLE in the presence of elevated levels
of interleukin-18 binding protein", JOURNAL OF
AUTOIMMUNITY, LONDON, GB, vol. 34, no.
2, 1 March 2010 (2010-03-01), pages 121-126,
XP026886091, ISSN: 0896-8411, DOI: 10.1016/
J.JAUT.2009.08.002 [retrieved on 2009-08-22], the
whole document

(57) Настоящее изобретение относится к выделенному полностью человеческому, гуманизированному или химерному антителу или его фрагменту, который специфически связывает IL-18, но не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка. Также представлены выделенный полинуклеотид, кодирующий указанное антитело или его фрагмент, клонирующий или экспрессирующий вектор, содержащий один или несколько указанных полинуклеотидов, клетка-хозяин, содержащая один или несколько указанных векторов, стабильно трансформированная или трансфицированная клетка-хозяин, содержащая один или несколько указанных полинуклеотидов, способ продуцирования указанного выделенного антитела или его фрагмента. Кроме того, представлены фармацевтическая композиция, содержащая указанное выделенное антитело или его фрагмент, а также применения антитела или его фрагмента и применения указанной фармацевтической композиции.

034610 B1

034610 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к иммуноглобулинам, таким как антитела или их фрагменты, которые связываются с цитокином интерлейкином 18 (IL-18), но не связывают IL-18 в комплексе с эндогенным ингибитором - белком, связывающим интерлейкин 18 (IL-18BP). Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему указанные антитела, фармацевтической композиции, содержащей указанные антитела, применению указанных антител в лечении и/или профилактике заболеваний и способу продуцирования антител. Другие аспекты, цели и преимущества настоящего изобретения станут очевидны из описания, представленного ниже.

Уровень техники изобретения

Интерлейкин-18 (IL-18) был изначально описан в 1989 году как интерферон-гамма-индуцирующий фактор (IGIF). IL-18 относится к семейству IL-1 и структурно связан с IL-1 β (Okamura H. et al. (1995), *Nature*; 378:88-91). IL-18 преимущественно получают посредством макрофагов и Т-клеток в виде белка-предшественника (pro-IL-18) и секретируют в качестве активного белка после расщепления каспазой-1 (Dinarello C.A. et al. (1999), *J. Allergy Clin Immunol*; 103:11-24). При нормальной физиологии IL-18 в совместном действии с IL-12 связан с индуцированием клеточного иммунитета после инфекции продуктами жизнедеятельности микроорганизмов, такими как липополисахарид (LPS) (Sareneva T. et al. (2000), *J. Immunol*; 165 (4):1933-8). После стимуляции посредством IL-18 природные киллеры (NK-клетки) и Т-клетки высвобождают цитокин интерферон гамма (INF- γ), играющий важную роль в активации макрофагов и других клеток. IL-18 также выполняет различные функции в дополнение к способности индуцировать интерферон гамма. Эти биологические свойства включают активацию NF- κ B, экспрессию Fas-лиганда, индуцирование как CC-, так и CXC-хемокинов, и повышенное продуцирование вируса дефицита иммуно-компетентных клеток человека. Ввиду способности IL-18 индуцировать продуцирование INF- γ в Т-клетках и макрофагах, он играет важную роль в иммунных ответах типа Th1 и участвует как во врожденном, так и приобретенном иммунитете.

Связывание IL-18 характеризуется высокой аффинностью и передачей сигналов посредством рецептора IL-18 (IL-18R), гетеромерного комплекса цепочек альфа- и бета-цепей, кодированных генами IL18R1 и IL18RAP, соответственно (Torigoe K et al. (1997), *J. Biol. Chem.*; 272 (41):25737-42). Биологическую активность IL-18 отрицательно регулирует IL-18-связывающий белок (IL-18BP), природный и высокоспецифичный ингибитор. Этот растворимый белок образует комплекс со свободным IL-18, предотвращая его взаимодействие с рецептором IL-18, таким образом, нейтрализуя и ингибируя его биологическую активность (Dinarello CA (2000), *Ann Rheum Dis*; 59 Suppl 1:117-20). IL-18BP является конститутивно секретированным белком с высокоаффинным связыванием с IL-18. Чередующиеся варианты сплайсинга мРНК IL-18BP приводят к образованию четырех изоформ. Выделяющаяся "а" изоформа присутствует в сыворотке здоровых людей в 20-кратном молярном избытке по сравнению с IL-18 (Dinarello и Kaplanski (2005), *Expert Rev Clin Immunol*, 1(4), 619-632).

Было установлено, что помимо физиологической роли, IL-18 опосредует различные аутоиммунные и воспалительные заболевания. Было показано, что экспрессия IL-18 активирована при нескольких аутоиммунных заболеваниях, таких как болезнь Крона, псориаз, ревматоидный артрит, рассеянный склероз и сердечно-сосудистые заболевания (Braddock et al. (2004), *Expert Opin Biol Ther*; 4(6):847-860). IL-18 также активирован при определенных воспалительных заболеваниях, таких как хроническая обструктивная болезнь легких (COPD) (Imaoka et al. (2008), *Eur Respir J*; 31:287-297), идиопатический легочный фиброз (IPF) (Kitasato et al. (2004), *Am J. Resp Cell Mol Biol*; 31:619-625), синдром активации макрофагов (MAS) (Dinarello and Kaplanski (2005), *Expert Rev Clin Immunol*; 1(4): 619-632), болезнь Стилла, развивающаяся у взрослых (AOSD) (Arlet J.B. et al. (2006), *Ann Rheum Dis* 65(12):1596-601) и системный ювенильный идиопатический артрит (SJIA) (Akashi et al. (1994), *Br. J. Haematol*; 87(2):243-50).

Недавно проведенные исследования показали высокое количество IL-18 и INF- γ как в наследственных, так и приобретенных формах гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH). HLH характеризуется активированными лимфоцитами и гистиоцитами, секретирующими высокое количество воспалительных цитокинов (Janka G.E. et al. (2007), *Eur J. Paediatr*; 166:95-109), и нарушением функции NK-клеток и цитотоксических Т-клеток. Наиболее важным, как было показано, является то, что обе формы характеризуются дисрегуляцией IL-18 (Mazodier et al. (2005), *Immunobiology* 106 (10):3483-89).

Разработка терапевтических молекул для мишеней, таких как IL-18, регулированных природными ингибиторами, может быть очень сложной. Наличие общего повышенного количества системного или местного IL-18 не всегда отражает уровень биологически активного белка (IL-18, свободного от IL-18BP). Возникла бы необходимость в более высокой дозе терапевтического соединения, связывающего как свободный IL-18, так и IL-18 в комплексе с IL-18BP, несмотря на потенциальную способность нейтрализовать активность IL-18, чем такого, которое способно избирательно связывать только биологически активный свободный IL-18. Терапевтические соединения, которые необходимо вводить в высокой дозе, могут привести к более выраженным побочным эффектам или стать иммуногенными. Высокие дозы также влекут за собой высокие производственные затраты.

Терапевтические соединения, конкурирующие за IL-18 при связывании с IL-18BP, могут нарушить

неустойчивое равновесие свободного/активного IL-18 и неактивного/связанного с IL-18BP IL-18, существующее у пациентов с заболеваниями/расстройствами, характеризующимися дисрегуляцией IL-18.

В довершение ко всему, будет очень сложным исследование заболеваний, характеризующихся дисрегуляцией свободного IL-18, в отсутствие диагностического средства, способного детектировать и/или измерить IL-18, свободный от IL-18BP в качестве компонента всего IL-18.

Сущность изобретения

Одним из аспектов настоящего изобретения является выделенное полностью человеческое, гуманизированное или химерное антитело или его фрагмент, предпочтительно выделенное полностью человеческое антитело.

В другом варианте осуществления этот аспект является фрагментом антитела или антителом с единичным переменным доменом, предпочтительно Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dAb или VHH.

В еще одном варианте осуществления этого аспекта выделенное антитело содержит мутированную или химически модифицированную аминокислотную Fc-область, где мутированная или химически модифицированная аминокислотная Fc-область предотвращает или снижает активность ADCC и/или увеличивает период полужизни по сравнению с Fc-областью дикого типа. Предпочтительно мутированной или химически модифицированной аминокислотной Fc-областью является молчащая Fc-область IgG1.

В другом варианте осуществления, выделенное антитело или его фрагмент, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), где выделенное антитело или его фрагмент содержит:

- i) переменную область тяжелой цепи H-CDR1, содержащую SEQ ID NO: 3, и
- ii) переменную область тяжелой цепи H-CDR2, содержащую SEQ ID NO: 9, и
- iii) переменную область тяжелой цепи H-CDR3, содержащую SEQ ID NO: 5, и
- iv) переменную область легкой цепи L-CDR1, содержащую SEQ ID NO: 6, и
- v) переменную область легкой цепи L-CDR2, содержащую SEQ ID NO: 7, и
- vi) переменную область легкой цепи L-CDR3, содержащую SEQ ID NO: 8.

В другом варианте осуществления, выделенное антитело или его фрагмент, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), содержит переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 16.

В другом варианте осуществления, выделенное антитело или его фрагмент, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), содержит:

- i) переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 14 и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 16.

Предпочтительно переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 14, и переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 16, и, необязательно, аминокислота лизин (Lys; K) в положении 30 в отношении SEQ ID NO: 14 заменен аминокислотой, выбранной из аспарагина (Asn; N), или серина (Ser; S), или треонина (Thr; T), или аланина (Ala; A), или глутамата (Glu; E), или гистидина (His; H), или лейцина (Leu; L), или глутамина (Gln; Q), или аргинина (Arg; R), или валина (Val; V), или тирозина (Tyr; Y), или изолейцина (Ile; I).

В другом варианте осуществления, выделенное антитело или его фрагмент, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), содержит:

- i) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 43 и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 45.

В другом аспекте представлен выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент по изобретению.

В одном из вариантов осуществления этого последнего аспекта выделенный полинуклеотид по изобретению кодирует переменный домен тяжелой цепи, где полинуклеотид:

- i) является по меньшей мере на 90% идентичным SEQ ID NO: 15, или SEQ ID NO: 19, или SEQ ID NO: 23, или SEQ ID NO: 26, или SEQ ID NO: 29, или SEQ ID NO: 32, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 38, или SEQ ID NO: 41, или SEQ ID NO: 84, или SEQ ID NO: 88, или SEQ ID NO: 91, или SEQ ID NO: 94, или SEQ ID NO: 113, или SEQ ID NO: 131, или SEQ ID NO: 139, или SEQ ID NO: 146, или SEQ ID NO: 152; или
- ii) содержит SEQ ID NO: 15, или SEQ ID NO: 19, или SEQ ID NO: 23, или SEQ ID NO: 26, или SEQ ID NO: 29, или SEQ ID NO: 32, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 38, или SEQ ID NO: 41, или SEQ ID NO: 84, или SEQ ID NO: 88, или SEQ ID NO: 91, или SEQ ID NO: 94, или SEQ ID NO: 113, или SEQ ID NO: 131, или SEQ ID NO: 139, или SEQ ID NO: 146, или SEQ ID NO: 152; или
- iii) состоит по существу из SEQ ID NO: 15, или SEQ ID NO: 19, или SEQ ID NO: 23, или SEQ ID NO: 26, или SEQ ID NO: 29, или SEQ ID NO: 32, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 38, или SEQ ID NO: 41, или SEQ ID NO: 84, или SEQ ID NO: 88, или SEQ ID NO: 91, или SEQ ID NO: 94, или SEQ ID NO: 113, или SEQ ID NO: 131, или SEQ ID NO: 139, или SEQ ID NO: 146, или SEQ ID NO: 152.

В другом варианте осуществления этого аспекта выделенный полинуклеотид по изобретению кодирует переменный домен легкой цепи, где полинуклеотид:

- i) является по меньшей мере на 90% идентичным SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 21, или SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 27, или SEQ ID NO: 30, или SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 36, или SEQ ID

NO: 39, или SEQ ID NO: 42, или SEQ ID NO: 86, или SEQ ID NO: 89, или SEQ ID NO: 92, или SEQ ID NO: 95, или SEQ ID NO: 115, или SEQ ID NO: 133, или SEQ ID NO: 141, или SEQ ID NO: 148, или SEQ ID NO: 154; или

ii) содержит SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 21, или SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 27, или SEQ ID NO: 30, или SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 36, или SEQ ID NO: 39, или SEQ ID NO: 42, или SEQ ID NO: 86, или SEQ ID NO: 89, или SEQ ID NO: 92, или SEQ ID NO: 95, или SEQ ID NO: 115, или SEQ ID NO: 133, или SEQ ID NO: 141, или SEQ ID NO: 148, или SEQ ID NO: 154; или

iii) состоит по существу из SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 21, или SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 27, или SEQ ID NO: 30, или SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 36, или SEQ ID NO: 39, или SEQ ID NO: 42, или SEQ ID NO: 86, или SEQ ID NO: 89, или SEQ ID NO: 92, или SEQ ID NO: 95, или SEQ ID NO: 115, или SEQ ID NO: 133, или SEQ ID NO: 141, или SEQ ID NO: 148, или SEQ ID NO: 154.

В другом варианте осуществления этого аспекта выделенный полинуклеотид по изобретению кодирует тяжелую цепь, где полинуклеотид:

i) является по меньшей мере на 90% идентичным SEQ ID NO: 44, или SEQ ID NO: 48, или SEQ ID NO: 51, или SEQ ID NO: 54, или SEQ ID NO: 57, или SEQ ID NO: 97, или SEQ ID NO: 101, или SEQ ID NO: 104, или SEQ ID NO: 117, или SEQ ID NO: 135, или SEQ ID NO: 143, или SEQ ID NO: 149, или SEQ ID NO: 155, или SEQ ID NO: 159; или

ii) содержит SEQ ID NO: 44, или SEQ ID NO: 48, или SEQ ID NO: 51, или SEQ ID NO: 54, или SEQ ID NO: 57, или SEQ ID NO: 97, или SEQ ID NO: 101, или SEQ ID NO: 104, или SEQ ID NO: 117, или SEQ ID NO: 135, или SEQ ID NO: 143, или SEQ ID NO: 149, или SEQ ID NO: 155, или SEQ ID NO: 159; или

iii) состоит по существу из SEQ ID NO: 44, или SEQ ID NO: 48, или SEQ ID NO: 51, или SEQ ID NO: 54, или SEQ ID NO: 57, или SEQ ID NO: 97, или SEQ ID NO: 101, или SEQ ID NO: 104, или SEQ ID NO: 117, или SEQ ID NO: 135, или SEQ ID NO: 143, или SEQ ID NO: 149, или SEQ ID NO: 155, или SEQ ID NO: 159.

В другом варианте осуществления этого аспекта выделенный полинуклеотид по изобретению кодирует легкую цепь, где полинуклеотид:

i) является по меньшей мере на 90% идентичным SEQ ID NO: 46, или SEQ ID NO: 49, или SEQ ID NO: 52, или SEQ ID NO: 55, или SEQ ID NO: 58, или SEQ ID NO: 99, или SEQ ID NO: 102, или SEQ ID NO: 105, или SEQ ID NO: 119, или SEQ ID NO: 137, или SEQ ID NO: 145, или SEQ ID NO: 151, или SEQ ID NO: 157, или SEQ ID NO: 161; или

ii) содержит SEQ ID NO: 46, или SEQ ID NO: 49, или SEQ ID NO: 52, или SEQ ID NO: 55, или SEQ ID NO: 58, или SEQ ID NO: 99, или SEQ ID NO: 102, или SEQ ID NO: 105, или SEQ ID NO: 119, или SEQ ID NO: 137, или SEQ ID NO: 145, или SEQ ID NO: 151, или SEQ ID NO: 157, или SEQ ID NO: 161; или

iii) состоит по существу из SEQ ID NO: 46, или SEQ ID NO: 49, или SEQ ID NO: 52, или SEQ ID NO: 55, или SEQ ID NO: 58, или SEQ ID NO: 99, или SEQ ID NO: 102, или SEQ ID NO: 105, или SEQ ID NO: 119, или SEQ ID NO: 137, или SEQ ID NO: 145, или SEQ ID NO: 151, или SEQ ID NO: 157, или SEQ ID NO: 161.

В другом аспекте этого аспекта представлен клонирующий или экспрессирующий вектор, содержащий один или несколько полинуклеотидов, как заявлено в настоящем документе.

В одном из вариантов осуществления клонирующий или экспрессирующий вектор по изобретению содержит по меньшей мере один полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44, или SEQ ID NO: 48, или SEQ ID NO: 51, или SEQ ID NO: 54, или SEQ ID NO: 57, или SEQ ID NO: 101, или SEQ ID NO: 159, или SEQ ID NO: 97, или SEQ ID NO: 104, или SEQ ID NO: 117, или SEQ ID NO: 143, или SEQ ID NO: 135, или SEQ ID NO: 149, или SEQ ID NO: 155, или SEQ ID NO: 46, или SEQ ID NO: 49, или SEQ ID NO: 52, или SEQ ID NO: 55, или SEQ ID NO: 58, или SEQ ID NO: 102, или SEQ ID NO: 161, или SEQ ID NO: 99, или SEQ ID NO: 105, или SEQ ID NO: 119, или SEQ ID NO: 145, или SEQ ID NO: 137, или SEQ ID NO: 151, или SEQ ID NO: 157.

Настоящее изобретение дополнительно относится к клетке-хозяину, содержащей один или несколько клонирующих или экспрессирующих векторов, как заявлено в настоящем документе.

В другом аспекте настоящего изобретения представлена стабильно трансформированная или трансфицированная клетка-хозяин, содержащая один или несколько полинуклеотидов, как заявлено в настоящем документе.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу продуцирования выделенного антитела или фрагмента, включающему культивирование клетки-хозяина, как заявлено в настоящем документе, в условиях, подходящих для получения выделенного антитела или его фрагмента.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтический носитель и выделенное антитело или его фрагмент, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и где связывающая молекула не является IL-18BP.

Предпочтительно фармацевтическая композиция по изобретению представлена в форме для внутривенного, ингаляционного или подкожного введения.

В другом аспекте настоящего изобретения представлено применение выделенного антитела или его

фрагмента в лечении и/или профилактике саркоидоза, в частности саркоидоза легкого, гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ), семейного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (FHL) и других синдромов иммунодефицита, гигантоклеточного артериита (ГТА), хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), болезни Стилла, развивающейся у взрослых (AOSD), системного ювенильного идиопатического артрита (сЮИА), тяжелой астмы, увеита, географической атрофии, диабета 1 типа, диабета 2 типа или атеросклероза и любого их сочетания у пациента-млекопитающего.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено применение фармацевтической композицией, содержащей выделенное антитело или его фрагмент для лечения и/или профилактики саркоидоза, в частности саркоидоза легкого, гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH), семейного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (FHL) и других синдромов иммунодефицита, гигантоклеточного артериита (GCA), хронической обструктивной болезни легких (COPD), болезни Стилла, развивающейся у взрослых (AOSD), системного ювенильного идиопатического артрита (SJIA), тяжелой астмы, увеита, географической атрофии, диабета 1 типа, диабета 2 типа или атеросклероза и любого их сочетания у пациента-млекопитающего.

В одном из вариантов осуществления, в соответствии с применением по настоящему изобретению, пациентом-млекопитающим является человек.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: CDR вариабельных областей тяжелых цепей антител, примеры которых приведены в настоящем документе.

Фиг. 2: CDR вариабельных областей легких цепей антител, примеры которых приведены в настоящем документе.

Фиг. 3 (A-D): воздействие антител к IL-18 и их фрагментов по настоящему изобретению на высвобождение IFN- γ из МКПК, индуцированных LPS/IL-12 (стимуляцией нативного IL-18). Данные показывают зависящее от концентрации ингибирование высвобождения IFN- γ , индуцированного нативным IL-18, из свежeweделенных МКПК от индивидуальных доноров, где каждая точка измерения представляет собой среднюю величину $\pm$ стандартная ошибка средней величины из $n=4$ лунок. Нативный IL-18 стимулировали посредством обработки LPS/IL-12, и точечная линия представляет собой степень IL-18-зависимости, как определено посредством максимальной эффективности IL-18BP a-Fc человека.

Фиг. 4 (A-B): воздействие антител к IL-18 и их фрагментов по настоящему изобретению на высвобождение IFN- γ из МКПК, индуцированных рекомбинантным IL-18. Данные показывают зависящее от концентрации ингибирование высвобождения IFN- γ , индуцированного рекомбинантным IL-18 человека (1 нМ), из свежeweделенных МКПК человека от типичных индивидуальных доноров, где каждая точка измерения представляет собой среднюю величину $\pm$ стандартная ошибка средней величины из $n=4$ лунок.

Фиг. 5 (A-C): воздействие антител к IL-18 и их фрагментов по настоящему изобретению на высвобождение IFN- γ из клеток KG-1, индуцированных IL-18 человека. Данные показывают зависящее от концентрации ингибирование высвобождения IFN- γ , индуцированного рекомбинантным IL-18 человека (1 нМ), из клеток KG-1, где каждая точка измерения представляет собой среднюю величину $\pm$ стандартная ошибка средней величины из $n=4$ лунок.

Фиг. 6 (A-C): воздействие антител к IL-18 и их фрагментов по настоящему изобретению на высвобождение IFN- γ из клеток KG-1, индуцированных IL-18 яванского макака. Данные показывают зависящее от концентрации ингибирование высвобождения IFN- γ , индуцированного IL-18 яванского макака (0,2 нМ), из клеток KG-1, где каждая точка измерения представляет собой среднюю величину $\pm$ стандартная ошибка средней величины из $n=4$ лунок.

Фиг. 7 (A-E): воздействие антител к IL-18 и их фрагментов по настоящему изобретению на индуцированное IL-18 человека посредством LPS/IL-12 (стимуляции нативного IL-18) и последующее высвобождение IFN- γ в цельной крови человека.

Фиг. 8 (A-E): воздействие антител к IL-18 и их фрагментов по настоящему изобретению на индуцированное IL-18 человека высвобождение IFN- γ в цельной крови человека. Данные показывают зависящее от концентрации ингибирование высвобождения IFN- γ , индуцированного рекомбинантным IL-18 человека (1 нМ), из цельной крови, взятой от индивидуальных доноров, где каждая точка измерения представляет собой среднюю величину $\pm$ стандартная ошибка средней величины из $n=4$ лунок.

Фиг. 9 (A-B): связывание антител к IL-18 и фрагментов с комплексом IL-18/IL-18BP. (A) Родительские MOR08775 и MOR08776 не признают комплекс IL-18/IL-18BP. В этом эксперименте MOR08775 и MOR08776 инкубировали с биотинилированным комплексом IL-18/IL-18BP. (B) Эксперимент проводили аналогичным образом, как показано в A), за исключением использования небитинилированного IL-18 человека. MOR03207 является антителом к лизоциму, и 125-2H является IgG мыши к IL-18, связывающим комплекс IL-18/IL-18BP.

Фиг. 10: эпитоп-специфическая сортировка антител к IL-18, MOR8775, MOR8776 (A), и для антител MOR9464, MOR9464_N30K, MOR10222_N30S_M54I и MOR14431. (B) ячейки, заполненные черным, указывают на антитела, конкурирующие за подобный эпитоп, в то время как ячейки без заполнения ука-

зывают на отсутствие конкуренции.

Фиг. 11 (А-В): А) структура комплекса IL-1 β /IL-1R, накладываемого на модель IL-18/IL-18R α , созданную на структуре комплекса IL-1 β /IL-1R. Все структуры представлены в виде ленты. Структуры IL-18 и IL-1 β использовали для суперпозиции. В) модель комплекса IL-18/IL-18R α , созданная на структуре комплекса IL-1 β /IL-1R. IL-18R α (показан в поверхностном представлении) содержит три иммуноглобулин-подобных домена, D1, D2 и D3. На IL-18 (показанном в ленточном представлении) участки 1 и 2 являются участками связывания IL-18R α . Участок 3 является участком связывания IL-18R β .

Фиг. 12: сравнение соответствующих аминокислот, связанных на IL-18. 1) Последовательность IL-18 в отношении SEQ ID NO: 1 аминокислот с 37 по 193. 2) из Kim et al. (2000), Proc Natl Acad Sci; 97 (3):1190-1195 (моделирование IL-18BP и его комплекса с IL-18 человека). 3) из Krumm et al. (2008), Proc Natl Acad Sci., 2008 105(52): 20711-2071552, табл. 1. 4) из Kato et al. (2003), Nature Struct. Biol. 2003, 10(11): 966-971; остатки, участвующие в связывании IL-18R α . 5) результаты H/DxMS для MOR9464, связанного с IL-18.

Фиг. 13: общий вид трехмерной структуры комплекса между IL-18 человека (показанным на C α -остовной модели и доступной для растворителя поверхности) и MOR9464_N30K (показанным в нарисованном представлении).

Фиг. 14: (А) выравнивание последовательностей зрелого IL-18 человека и яванского макака (аминокислот с 37 по 193); (В) представление заполнения пространства 6 аминокислот, различающихся по двум видам. Только E177 присутствует в области контакта комплекса антитела. IL-18 показан на C α -остовной модели и доступной для растворителя поверхности, и MOR9464_N30K показано в нарисованном представлении.

Фиг. 15: ленточное представление комплекса IL18/MOR9464_N30K, наложенного на модель комплекса IL-18/IL-18R α , созданного по структуре комплекса IL-1 β /IL-1R. Структура IL-18R α показана в поверхностном представлении, и MOR9464_N30K тяжелой и легкой цепи представлены в темно- и светло-сером цвете соответственно.

Фиг. 16: ленточное представление IL-18 человека, связанного с IL-18BP от поксвируса (слева) и с фрагментом антитела MOR9464_N30K (справа), и наложение одного на другое (в центре). Наложение основано на структуре IL-18. IL-18 показан на C α -остовной модели и доступной для растворителя поверхности, и MOR9464_N30K и IL-18BP от поксвируса показаны в нарисованном представлении.

Фиг. 17: ленточное представление IL-18 человека, связанного с фрагментом антитела MOR9464_N30K (справа) и с фрагментом мышиного антитела 125-2H (справа), и наложение одного на другое (в центре). Наложение основано на структуре IL-18. IL-18 показан на C α -остовной модели и доступной для растворителя поверхности, и MOR9464_N30K и 125-2H показаны в нарисованном представлении.

Фиг. 18: ленточное представление IL-18 человека, связанного с 125-2H, наложенным на IL-18, связанный с IL-18BP от поксвируса. Наложение основано на структуре IL-18. IL-18 показан на C α -остовной модели и доступной для растворителя поверхности, и MOR9464_N30K, 125-2H и IL-18BP от поксвируса показаны в нарисованном представлении.

Фиг. 19: ленточное представление IL-18 человека, связанного с фрагментом антитела MOR9464_N30K, с остатками эпитопа и паратопа, изображенными в стержневом представлении, где показано специфическое взаимодействие с аминокислотой лизином в положении 30 MOR9464_N30K.

Подробное описание изобретения

1. Определения.

В целях толкования настоящего описания применяются следующие определения, и в соответствующих случаях термины, употребляемые в форме единственного числа, также включают формы множественного числа и наоборот. Дополнительные определения изложены на всем протяжении подробного описания.

Термин "IL-18" является синонимом полипептида IL-18, полипептида интерлейкина-18, IFN-гамма-индуцирующего фактора или интерферон-гамма-индуцирующего фактора, или INF- γ -индуцирующего фактора. Термин "IL-18" относится к IL-18 человека, содержащему аминокислоты с 37 по 193 с SEQ ID NO: 1. На всем протяжении описания термин IL-18 включает как pro-IL-18 (предшественник зрелого IL-18 до расщепления протеазой), так и зрелого IL-18 (после расщепления протеазой) взаимозаменяемо, если не указано, что имеется в виду про- или зрелая форма.

Термин IL-18 яванского макака относится к IL-18 яванского макака, содержащему аминокислоты с 37 по 193 SEQ ID NO: 2.

Термин "антитело" относится к интактному иммуноглобулину или его функциональному фрагменту. Природные антитела, как правило, содержат тетрамер, который обычно состоит из по меньшей мере двух тяжелых (H) цепей и по меньшей мере двух легких (L) цепей. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (обозначенной аббревиатурой "VH" в настоящем документе) и константной области тяжелой цепи, обычно состоящей из трех доменов (CH1, CH2 и CH3). Тяжелые цепи могут быть из любого изотипа, включая IgG (подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (подтипы IgA1 и

IgA2), IgM и IgE. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (обозначенной аббревиатурой "VL" в настоящем документе) и константной области легкой цепи (CL). Легкая цепь включает цепи каппа и цепи лямбда. Вариабельная область тяжелой и легкой цепи, как правило, отвечает за распознавание антигена, в то время как константная область тяжелой и легкой цепи может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями-хозяевами или факторами, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Области VH и VL можно также подразделить на области гипервариабельности, обозначаемые термином "области, определяющими комплементарность (CDR)", чередуемые с областями, которые являются более стабильными, обозначаемыми термином "каркасные области (FR)". Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных с N-конца до C-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном.

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или просто "часть антигена") в рамках изобретения относится к полноразмерным или одному, или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с IL-18. Показано, что фрагменты полноразмерного антитела могут выполнять антигенсвязывающую функцию антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых рамками термина "антигенсвязывающая часть" антитела, включают фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; фрагмент F(ab)₂, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; фрагмент dAb (Ward et al. (1989), *Nature*; 341:544-546), который состоит из домена VH; и выделенную область, определяющую комплементарность (CDR).

Кроме того, несмотря на то, что два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодированы отдельными генами, они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов, посредством гибкого линкера, способствующего их образованию в однобелковую цепь, в которой соединяются области VL и VH для образования моновалентных молекул (известных как одиночная цепь Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988), *Science* 242:423-426; и Huston et al. (1988), *Proc Natl Acad Sci.*; 85:5879-5883). Подразумевается, что такие одноцепочечные антитела также включены в рамки термина "антигенсвязывающая часть" антитела. Эти фрагменты антител получают с использованием общепринятых способов, известных специалистам в данной области, и фрагменты проверяют на пригодность таким же образом, как и интактные антитела.

На протяжении всего описания термин "выделенный" означает то, что иммуноглобулин, антитело или полинуклеотид, соответственно, существует в физическом окружении, отличном от того, который может возникнуть в природе.

Выделенное антитело, которое специфически связывает полипептид IL18, может, однако, обладать перекрестной реактивностью по отношению к другим антигенам, таким как IL18 другого вида (например, яванского макака (cm) IL-18). Кроме того, в выделенном антителе может по существу отсутствовать другой клеточный материал и/или химические вещества.

На протяжении всего описания области, определяющие комплементарность ("CDR"), устанавливаются в соответствии с определением Кабата, если не указано то, что определение CDR соответствует определению Chothia или обоим определениям вместе. Определение Кабата является стандартом для нумеризации остатков в антителе и, как правило, его используют для определения областей CDR (Kabat et al. (1991), 5th, NIH publication No. 91-3242). Определение Chothia является схожим с определением Кабата, но оно принимает во внимание положения определенных структурных петель (Chothia et al. (1987), *J. Mol. Biol.*, 196:901-17; Al-Lazikani et al. (1997), *J. Mol. Biol.* 273:927-948).

По определению, области CDR в тяжелой цепи, как правило, обозначают как H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 и в легкой цепи как L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3. Их нумеруют последовательно в направлении от amino-конца к C-концу.

Термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" в рамках изобретения относятся к получению молекул антител одномолекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела показывает единичную специфичность связывания и аффинность для конкретного эпитопа.

Термин "антитело человека" в рамках изобретения подразумевает включение антител с вариабельными областями, в которых как каркасные области, так и области CDR получают из последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, то константную область также получают из таких последовательностей человека, например, последовательностей зародышевой линии человека, или мутированных версий последовательностей зародышевой линии человека, или антитела, содержащего консенсусные каркасные последовательности, полученные при анализе каркасных последовательностей человека, например, как описано в публикации Knappik, et al. (2000), *J. Mol. Biol.*; 296:57-86).

Антитела человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодированные последовательностями человека (например, мутации, полученные посредством произвольного или сайт-

специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*). Однако термин "антитело человека" в рамках изобретения не подразумевает включение антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародыша другого вида млекопитающего, такого как мышь, перенесены на каркасные последовательности человека.

Термин "моноклональное антитело человека" относится к антителам, показывающим единичную специфичность связывания с вариабельными областями, в которых как каркасные области, так и области CDR получают из последовательностей человека.

Термин "рекомбинантное антитело человека" в рамках изобретения включает все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные от животного (например, мыши), которые являются трансгенными или трансхромосомными для генов иммуноглобулинов человека или полученной из них гибридомы, антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессирования антитела человека, например, из трансфектомы, антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью любых других способов, включающих сплайсинг всех или части гена иммуноглобулина человека. Такие рекомбинантные антитела человека имеют вариабельные области, в которых каркасные области и области CDR получают из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. В определенных вариантах осуществления, однако, такие рекомбинантные антитела человека могут быть подвергнуты *in vitro* мутагенезу (или, когда используют животное, трансгенное для последовательности Ig человека, *in vivo* соматический мутагенез), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, будучи полученными из и связанными с последовательностями VH и VL зародышевой линии человека, не могут существовать в природе в рамках спектра антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Фразы "антиген, распознающий антитело" и "антитело, специфичное для антигена", используют в настоящем документе взаимозаменяемо с термином "антитело, специфически связывающееся с антигеном".

В рамках изобретения подразумевается, что связывающая молекула, которая "специфически связывается с IL-18", обозначает связывающую молекулу, которая связывается с IL-18 человека с K_D , составляющей 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 1 нМ или менее.

Связывающая молекула, которая "перекрестно реагирует с антигеном, который не является IL-18, предназначена для обозначения связывающей молекулы, которая связывает этот антиген с K_D , составляющей 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 1 нМ или менее. Связывающая молекула, которая "не реагирует перекрестно с конкретным антигеном", предназначена для обозначения связывающей молекулы, которая проявляет по существу нераспознаваемое связывание по отношению к этим белкам при стандартных анализах связывания.

В рамках изобретения термин "антагонист" предназначен для обозначения связывающей молекулы, которая ингибирует IL-18-зависимую сигнальную активность в присутствии IL-18 при анализе клеток человека, таком как анализ IL-18-зависимого продуцирования интерферона-гамма (IFN- γ) в клеточных элементах крови человека. Примеры анализа IL-18-зависимого продуцирования IFN- γ в клеточных элементах крови человека более подробно описаны в разделе примеров, представленном ниже.

В рамках изобретения антитело "без агонистической активности" предназначено для обозначения связывающей молекулы, которая не повышает в значительной степени IL-18-зависимую сигнальную активность в отсутствие и/или в присутствии IL-18 при анализе на основе клеток, таком как анализ продуцирования IFN- γ в клеточных элементах крови человека. Такие анализы более подробно описаны в примерах, приведенных ниже.

Термин " K_{assoc} " или " K_a " в рамках изобретения предназначен для обозначения скорости ассоциации конкретного взаимодействия связывающей молекулы и антигена, где термин " K_{dis} " или " K_d ", в рамках изобретения, предназначен для обозначения скорости диссоциации конкретного взаимодействия связывающей молекулы и антигена. Термин " K_D " в рамках изобретения предназначен для обозначения константы диссоциации, которую получают из отношения K_d к K_a (т.е. K_d/K_a) и которая выражена в виде молярной концентрации (М). Значения K_D для антител можно определять с использованием способов, хорошо разработанных в данной области. Способ определения K_D антитела осуществляют с использованием поверхностного плазмонного резонанса, такого как система Biacore®.

В рамках изобретения термин "аффинность" относится к силе взаимодействия между связывающей молекулой и антигеном на единичных антигенных сайтах.

В рамках изобретения термин "высокая аффинность" для антитела относится к антителу с K_D , составляющей 1 нМ или менее для целевого антигена.

В рамках изобретения термин "индивидуум" включает любого человека или животное, не являющееся человеком.

Термин "животное, не являющееся человеком" включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как не являющиеся человеком приматы, овцы, собаки, кошки, ло-

шади, коровы, куры, амфибии, пресмыкающиеся и т.д.

В рамках изобретения термин "оптимизированная нуклеотидная последовательность" означает то, что нуклеотидная последовательность изменена для кодирования аминокислотной последовательности с использованием кодонов, которые являются предпочтительными в продукции клетки или организма, как правило, эукариотической клетки, например, клетки *Pichia pastoris*, клетки китайского хомяка (СНО) или клетки человека. Оптимизированную нуклеотидную последовательность создают для полного сохранения аминокислотной последовательности, изначально закодированной исходной нуклеотидной последовательностью, которая также известна как "родительская" последовательность. Оптимизированные последовательности в настоящем документе созданы с кодонами, которые являются предпочтительными в клетках млекопитающих СНО; однако в настоящем документе также предполагается оптимизированная экспрессия этих последовательностей в других эукариотических клетках.

Термин "идентичность" относится к сходству между по меньшей мере двумя различными последовательностями. Эта идентичность может быть выражена в процентах идентичности и определена посредством стандартных алгоритмов выравнивания, например, средства поиска основного локального выравнивания (BLAST) (Altschul et al. (1990), *J. Mol. Biol.*; 215:403-410); алгоритма, описанного Needleman et al. (1970), *J. Mol. Biol.*; 48:444-453, или алгоритма, описанного Meyers et al. (1988), *Comput Appl Biosci.* 4:11-17). Набором параметров может быть оценочная матрица Blosom 62 со штрафом за пропуск 12, штрафом за продление пропуска 4 и штрафом за пропуск со сдвигом рамки 5. Процент идентичности между двумя аминокислотными или нуклеотидными последовательностями можно также определить с использованием алгоритма, описанного E. Meyers and W. Miller (1989), *CABIOS*; 4(1):1-17, включенного в программу ALIGN (версии 2,0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM 120, штрафом за удлинение пропуска 12 и штрафом за пропуск 4. Расчет процента идентичности обычно производят посредством сравнения последовательностей схожей длины.

Термин "иммунный ответ" относится к действию, например, лимфоцитов, антигенпрезентирующих клеток, фагоцитарных клеток, гранулоцитов и растворимых макромолекул, продуцированных вышеуказанными клетками или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), приводящему к избирательному повреждению, разрушению или уничтожению в организме человека вторгающихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, злокачественных клеток или, в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека.

Термин "путь передачи сигнала" или "сигнальная активность" относится к биохимической причинно-следственной связи, как правило, инициируемой взаимодействием белок-белок, таким как связывание фактора роста с рецептором, приводящее к передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. В основном, передача включает специфическое фосфорилирование одного или нескольких остатков тирозина, серина или треонина на одном или нескольких белках в серии реакций, вызывающих передачу сигнала. Предпоследние процессы обычно включают ядерные события, приводящие к изменению в экспрессии гена.

На всем протяжении настоящего описания термин "нейтрализует" и его грамматические варианты означает то, что биологическая активность мишени или полностью, или частично снижена в присутствии связывающего белка или антитела соответственно.

Термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) или рибонуклеиновой кислоте (РНК) и их полимерам в или одно-, или двухцепочечной форме. Если конкретно не ограничено, то термин включает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают схожими связывающими свойствами с исходной нуклеиновой кислотой и метаболизируются подобно природным нуклеотидам. Если не указано иное, то конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно включает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов), аллели, ортологи, одонуклеотидные полиморфизмы и комплементарные последовательности, а также непосредственно указанную последовательность. В частности, замены вырожденных кодонов можно достичь посредством генерирования последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов замещено остатками смешанного основания и/или дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Нуклеотид в "полинуклеотиде" или "нуклеиновой кислоте" может содержать модификации, включая основные модификации, такие как бромодуридин и производные инозина, модификацию рибозы, такую как тиофосфат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотиоат, фосфороаниладат и фосфороамидат.

Термин "вектор" означает любую молекулу или единицу (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус), подходящую для трансформации или трансфекции клетки-хозяина и содержащую последовательности нуклеиновой кислоты, которые направляют и/или контролируют (в сочетании с клеткой-хозяином) экспрессию одной или нескольких гетерологичных кодирующих областей, функционально связанных с ней.

Термин "консервативный вариант" последовательности, кодирующей связывающую молекулу, ан-

титело или его фрагмент, относится к последовательности, содержащей консервативные аминокислотные модификации. Термин "консервативные аминокислотные модификации" предназначен для обозначения аминокислотных модификаций, которые не оказывают значительного влияния или которые не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают замены, добавления и делеции аминокислот. Консервативными заменами аминокислот являются те, в которых аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком со схожей боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков со схожими боковыми цепями определены в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Модификации можно вводить в связывающий белок по изобретению с помощью стандартных способов, известных в данной области, таких как сайт-специфический мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативная аминокислотная замена может также включать неприродные аминокислотные остатки, которые обычно включены в состав скорее путем химического пептидного синтеза, чем путем синтеза в биологических системах. Неприродные аминокислоты включают, но не ограничиваются ими, пептидомиметик, обратные или перевернутые формы аминокислотных молекул.

"Эпитоп" является частью антигена, который распознается иммунной системой, такого как антитело или его фрагмент. В рамках настоящего описания термин "эпитоп" используют взаимозаменяемо как для конформационных эпитопов, так и линейных эпитопов. Конформационный эпитоп состоит из прерывающихся отрезков аминокислотной последовательности антигена, в то время как линейный эпитоп образован непрерывной последовательностью аминокислот из антигена.

Термин "лечить", "лечащий", "лечение", "предотвращать", "предупреждение (предотвращение)" или "профилактика" включает виды терапевтического лечения, виды профилактического лечения и применения, которые снижают риск развития у индивидуума расстройства или другого фактора риска. Лечение не требует полного излечения расстройства и включает уменьшение симптомов или соответствующих факторов риска.

2. Связывающие молекулы.

Термин "связывающая молекула" в рамках изобретения означает любой белок или пептид, который специфически связывается с полипептидом IL-18. Термин "связывающая молекула" включает, но не ограничивается ими, антитела и их фрагменты, такие как иммунологически функциональные фрагменты. Термин "иммунологически функциональный фрагмент" антитела или иммуноглобулиновой цепи в рамках изобретения является видом связывающего белка, содержащего часть (независимо от способа получения или синтеза этой части) антитела, в которой отсутствуют по меньшей мере некоторые из аминокислот, присутствующих в полноразмерной цепи, но которая, тем не менее, способна специфически связывать полипептид IL-18. Такие фрагменты являются биологически активными в отношении связывания полипептида IL-18. Термин "связывающая молекула" относится к белкам, которые специфически связывают полипептид IL-18 и которые могут дополнительно нейтрализовать взаимодействие полипептида IL-18 с рецептором IL-18.

Термин "связывающая молекула" в рамках изобретения также исключает нативный IL-18-связывающий белок и выделенный IL-18BP, например, как описано в WO2001/085201.

Связывающая молекула по настоящему изобретению специфически связывает IL-18, причем связывающая молекула не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и причем связывающая молекула не является IL-18BP.

В рамках изобретения термин "не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP)" предназначен для обозначения связывающей молекулы, которая связывается с комплексом IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) с K_D , составляющей 1×10^{-5} М или выше.

Один из способов оценки наличия или отсутствия связывания IL-18 связывающей молекулой, при этом не связывающей комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), описан в настоящем документе в примерах, разделе 9.

В другом аспекте настоящего изобретения связывающая молекула специфически связывает IL-18, причем связывающая молекула не конкурирует с IL-18-связывающим белком (IL-18BP) за связывание IL-18, когда IL-18BP связан с IL-18.

Термины "конкурирует", "конкурирующий" и "перекрестно конкурирующий" и их грамматические варианты используют взаимозаменяемо в настоящем документе для обозначения способности связывающей молекулы конкурировать с IL-18BP за связывание IL-18, когда IL-18BP уже связан с IL-18. Связывающие молекулы по изобретению, такие как антитело или его фрагмент, не конкурируют в этом смысле. Конкуренцию между связывающими молекулами определяют путем анализа, в котором связывающую молекулу тестируют на специфическое связывание с IL-18, когда IL-18 связан с IL-18BP. Во

избежание сомнений, если связывающая молекула может вытеснить IL-18 из комплекса IL-18/IL-18BP, то эта связывающая молекула конкурирует с IL-18BP за связывание IL-18.

Связывающая молекула по изобретению не является IL-18BP, ни выделенным, ни нативным IL-18BP.

Связывающая молекула может быть выбрана из следующих структурных каркасов: антитела, фрагмента антитела, антитела с единичным варибельным доменом, би- или полиспецифического антитела, поливалентного антитела, антитела с двойным варибельным доменом, иммуноконъюгата, молекулы фибронектина, аднектина, дарпина, авимера, аффитела, антикалина, аффилина, миметика эпитопа белка или их сочетаний и как описано ниже в настоящем документе.

Предпочтительно IL-18 содержит аминокислоты с 37 по 193 с SEQ ID NO: 1 (IL-18 человека) или SEQ ID NO: 2 (IL-18 яванского макака).

Структура IL-18BP характеризуется единичным Ig-подобным доменом и имеет сходство с внеклеточным сегментом рецепторов цитокина с Ig-подобными структурами. IL-18BP человека определен в четырех различных изоформах. Изоформа "а" IL-18BP (IL-18BP_а) проявляет самую высокую аффинность для IL-18 с быстрой скоростью прямой реакции, медленной скоростью обратной реакции и константой диссоциации (K_D), составляющей 399 пМ. Изоформа "с" IL-18BP (IL-18BP_с) имеет общий Ig-домен с IL-18BP_а, за исключением последних 29 аминокислот на С-конце. K_D IL-18BP_с в 10 раз меньше (2,94 нМ), чем у IL-18BP_а. Тем не менее, IL-18BP_а и IL-18BP_с нейтрализуют IL-18 >95% при молярном избытке обоих. В изоформах b и d IL-18BP отсутствует полный Ig-домен и отсутствует способность к связыванию или нейтрализации IL-18. Мышиный IL-18BP известен в двух изоформах, изоформах с и d, обладающих идентичными Ig-доменами и также нейтрализующих >95% мышиного IL-18 при молярном избытке обоих. Однако мышиный IL-18BP_d, имеющий общий С-концевой мотив с IL-18BP_а человека, также нейтрализует IL-18 человека (Kim et al. (2000), Proc Natl Acad Sci, 97 (3):1190-1195).

На протяжении всего описания термин "IL-18BP" относится к IL-18-связывающим белкам человека, мыши или вируса в любой изоформе, как нативной, выделенной, так и сконструированной, такой как IL-18BP, описанный в WO2001/085201, где раскрыты аналоги IL-18BP ("мутеины"), где вставлены, заменены различными консервативными заменами или удалены одна или несколько аминокислот, слитый белок IL-18BP (например, слитый белок IL-18BP с областью тяжелой цепи иммуноглобулина или Fc) и функциональные производные, такие как пегилированный IL-18BP.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по изобретению, которая связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и где связывающая молекула не является IL-18BP, где связывающая молекула связывается с эпитопом IL-18 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1, где эпитоп:

- а) содержит следующие аминокислоты IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1:
 - i) аминокислоты 41 и 42 и аминокислоты с 87 по 97; или
 - ii) аминокислоты со 138 по 160; или
 - iii) аминокислоты со 177 по 181; или
 - iv) аминокислоты 41 и 42, аминокислоты с 87 по 97, аминокислоты со 138 по 160 и аминокислоты со 177 по 181; или
 - v) аминокислоты 41, 42, 87; 89; 90; или
 - vi) аминокислоты 93, 94; 95, 96; или
 - vii) аминокислоты 140; 141; 150; 177; или
 - viii) аминокислоты 92; 93; 94; 138; 140; 152; 157; или
 - ix) аминокислоты 142; 143; 150; 152; или
 - x) аминокислоты 143; 144; 145; 177; 180; или
 - xi) аминокислоты 41, 42, 87; 89; 90; 93, 94; 95, 96; 140; 141; 150; 177; или
 - xii) аминокислоты 92; 93; 94; 138; 140; 142; 143; 144; 145; 150; 152; 157; 177; 180; или
 - xiii) аминокислоты 41; 42, 87; 89; 90; 92; 93, 94; 95, 96; 138; 140; 141; 142; 143; 144; 145; 150; 152; 157; 177; 180; или
- б) содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре аминокислоты, как определено в любой одной из групп с (i) по (xiii), перечисленных в а); или
- с) содержит аминокислоты, как определено в любой одной из групп с (iv) по (xii), перечисленных в а).

В другом варианте осуществления связывающая молекула по изобретению, которая связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и где связывающая молекула не является IL-18BP, где связывающая молекула связывается с эпитопом IL-18 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1, где эпитоп содержит аминокислоты Arg140 и Glu152. В одном из вариантов осуществления эпитоп дополнительно содержит любую одну или несколько аминокислот Gln92, Pro93, Gly95, Pro143, Glu157 или Glu177. В другом варианте осуществления эпитоп дополнительно содержит любую одну или несколько аминокислот Lys89, Arg94, Met96, Phe138, Ser141, Gly144, His145, Asp146, Gln150 или Leu180.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения связывающая молекула специфиче-

ски связывает IL-18, где связывающая молекула не связывает комплекс IL-18/изоформы а или изоформы с IL-18 связывающего белка (IL-18BP_a или IL-18BP_c), где связывающая молекула выбрана из: антитела, фрагмента антитела, антитела с единичным варибельным доменом, би- или полиспецифического антитела, поливалентного антитела, антитела с двойным варибельным доменом, иммуноконъюгата, молекулы фибронектина, аднектина, дарпина, авимера, аффитела, антикалина, аффилина, миметика эпитопа белка или их сочетаний. Предпочтительно IL-18 содержит аминокислоты с 37 по 193 с SEQ ID NO: 1 (IL-18 человека) или SEQ ID NO: 2 (IL-18 яванского макака). Более предпочтительно связывающей молекулой является антитело или его фрагмент.

В другом варианте осуществления связывающая молекула по изобретению, которая связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/изоформы а или изоформы с IL-18 связывающего белка (IL-18BP_a или IL-18BP_c), и где связывающая молекула не является IL-18BP, где связывающая молекула связывается с эпитопом IL-18 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1, где эпитоп содержит аминокислоты Arg140 и Glu152. В одном из вариантов осуществления эпитоп дополнительно содержит любую одну или несколько аминокислот Gln92, Pro93, Gly95, Pro143, Glu157 или Glu177, и где связывающая молекула выбрана из: антитела, фрагмента антитела, антитела с единичным варибельным доменом, би- или полиспецифического антитела, поливалентного антитела, антитела с двойным варибельным доменом, иммуноконъюгата, молекулы фибронектина, аднектина, дарпина, авимера, аффитела, антикалина, аффилина, миметика эпитопа белка или их сочетаний.

В другом варианте осуществления связывающая молекула по изобретению, которая связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/изоформы а или изоформы с IL-18 связывающего белка (IL-18BP_a или IL-18BP_c), и где связывающая молекула не является IL-18BP, где связывающая молекула связывается с эпитопом IL-18 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1, где эпитоп содержит аминокислоты Arg140 и Glu152 и где связывающей молекулой является антитело или его фрагмент. В этом варианте осуществления эпитоп может дополнительно содержать любую одну или несколько аминокислот Gln92, Pro93, Gly95, Pro143, Glu157 или Glu177.

Связывающая молекула по изобретению способна ингибировать один или несколько видов биологической активности IL-18, таких как модуляция Th1; модуляция Th2, модуляция NK-клеток, модуляция нейтрофилов, модуляция клеточной линии моноцитов-макрофагов, модуляция эозинофилов, В-клеточная модуляция, модуляция цитокина, модуляция хемокина; модуляция молекул адгезии и модуляция рекрутинга клеток. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула по изобретению ингибирует IL-18-зависимое продуцирование интерферона гамма (INF- γ), предпочтительно в KG-1 клетках. В другом варианте осуществления изобретения связывающая молекула ингибирует IL-18-зависимое продуцирование интерферона гамма (INF- γ) в KG-1 клетках при IC₅₀, составляющей 10 нМ или менее, или 1 нМ или менее, или 100 пМ или менее при анализе, как определено ниже в примерах настоящего документа.

Константа диссоциации (K_D) связывающей молекулы по изобретению, которая специфически связывает IL-18, составляет 10 нМ или менее при анализе, как определено ниже в примерах настоящего документа. В одном из вариантов осуществления K_D составляет 1 нМ или менее. В другом варианте осуществления K_D связывающей молекулы составляет 100 пМ или менее, и связывающей молекулой является антитело или его фрагмент.

Связывающая молекула по изобретению может быть кристаллизованной связывающей молекулой, предпочтительно кристаллизованной связывающей молекулой с контролируемым высвобождением и/или без носителя. В одном из вариантов осуществления кристаллизованной связывающей молекулой является антитело или его фрагмент. В другом варианте осуществления кристаллизованная связывающая молекула имеет более продолжительный период полужизни *in vivo*, чем ее растворимый аналог, и сохраняет свою биологическую функцию после кристаллизации.

Связывающая молекула по изобретению может также быть частью комплекса, содержащего связывающую молекулу и IL-18. Предпочтительно связывающей молекулой является антитело или его фрагмент в комплексе с IL-18.

И наконец, связывающая молекула по изобретению может также конкурировать с мышинным антителом 125-2Н за связывание IL-18 человека.

2) Антитела.

Связывающие молекулы по настоящему изобретению включают антитела или их фрагменты, выделенные и структурно охарактеризованные, как описано далее в настоящем документе и как показано на фиг. 1 и 2.

2.1) Антитела человека.

В рамках изобретения антитело человека или его фрагмент содержит варибельные области тяжелой или легкой цепи, или полноразмерные тяжелые или легкие цепи, которые "получены из" конкретной последовательности зародышевой линии, если варибельные области или полноразмерные цепи антитела получены из системы, использующей гены иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Такие системы включают иммунизацию трансгенной мыши, несущей гены иммуноглобулинов человека с исследуемым антигеном, или скрининг библиотеки генов иммуноглобулина человека, представленной на бак-

териофаге с исследуемым антигеном. Антитело человека или его фрагмент, "полученное из" последовательности иммуноглобулинов зародышевой линии человека, можно по существу определить путем сравнения аминокислотной последовательности антитела человека с аминокислотными последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека и отбора последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, являющейся наиболее близкой (т.е. с наибольшим % идентичности) к последовательности антитела человека. Антитело человека, "полученное из" конкретной последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, может содержать аминокислотные отличия по сравнению с последовательностью зародышевой линии, ввиду, например, природных соматических мутаций или намеренного введения сайт-направленной мутации. Однако аминокислотная последовательность выбранного антитела человека обычно по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулинов зародышевой линии человека, и содержит аминокислотные остатки, с помощью которых определяют антитело человека как человеческое при сравнении с аминокислотными последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии других видов (например, последовательностями зародышевой линии мыши). В определенных случаях, аминокислотная последовательность антитела человека может быть по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, или по меньшей мере на 95%, или даже по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулинов зародышевой линии. Как правило, антитело человека, полученное из конкретной последовательности зародышевой линии человека, покажет не более чем 10 аминокислотных отличий от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В определенных случаях, антитело человека может показать не более чем 5, или даже не более чем 4, 3, 2 аминокислотных отличий, или 1 аминокислотное отличие от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулинов зародышевой линии.

Антитела человека можно получать несколькими способами, известными специалистам в данной области. Антитела человека можно получать гибридным способом с использованием миеломы человека или гетеромиеломных клеточных линий мыши-человека (Kozbor, J. Immunol. (1984), 133:3001; Brodeur, Monoclonal Isolated Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker Inc, 1987). Альтернативные способы включают использование фаговых библиотек или трансгенных мышей, в обоих используют спектр вариабельных областей человека (Winter G. (1994), Annu Rev Immunol 12:433-455, Green LL (1999), J. Immunol Methods 231:11-23).

В настоящее время доступно несколько штаммов трансгенных мышей, в которых местоположения иммуноглобулинов мыши заменены генными сегментами иммуноглобулинов человека (Tomizuka K, (2000), Proc Natl Acad Sci, 97:122-727; Fishwild DM (1996), Nature Biotechnol 14:845-851; Mendez MJ, (1997), Nature Genetics 15:146-156). При стимуляции антигеном такие мыши способны продуцировать спектр антител человека, из которых можно отбирать антитела для исследования. Следует конкретно отметить систему TrimerTM (Eren R et al. (1988), Immunology 93:154-161), где лимфоциты человека трансплантируют в облученных мышей, систему селекции лимфоцитарных антител (SLAM, Babcook et al., Proc Natl Acad Sci (1996), 93:7843-7848), где лимфоциты человека (или других видов) эффективно подвергают процессу получения крупного пула выделенных антител *in vitro* с последующей обратной фильтрацией, серийным разведением и процессом отбора, и XenomouseTM (Abgenix Inc). Альтернативный подход доступен от Morphotek Inc с использованием технологии MorphodomaTM.

Технологию фагового дисплея можно использовать для получения антител человека и их фрагментов (McCafferty (1990), Nature, 348:552-553 and Griffiths AD et al. (1994), EMBO 13:3245-3260). Согласно данному методу, гены вариабельного домена выделенного антитела клонируют внутри рамки в ген либо главного, либо минорного оболочечного белка нитевидного бактериофага, такого как M13 или fd, и представляют (как правило, с помощью фага-помощника) в качестве функциональных фрагментов выделенных антител на поверхности фаговой частицы. Селекция на основе функциональных свойств выделенного антитела приводит к отбору гена, кодирующего выделенное антитело, демонстрирующего эти свойства. Метод фагового дисплея можно использовать для селекции антиген-специфических антител из библиотек, полученных из В-клеток человека, взятых от индивидуумов, страдающих заболеванием или расстройством, или, альтернативно, от иммунизированных доноров-людей (Marks; J. Mol. Bio. (1991), 222:581-591). Если необходимо получить интактное выделенное антитело человека, содержащее Fc-домен, то необходимо повторно клонировать фрагмент, полученный с помощью фагового дисплея, в экспрессирующие векторы млекопитающего, содержащие необходимые константные области и устанавливающие стабильно экспрессирующие клеточные линии.

Метод созревания аффинности (Marks; Biotechnol (1992), 10:779-783) можно использовать для обеспечения аффинности связывания, где аффинность первичного выделенного антитела человека повышена за счет последовательной замены вариабельных областей H- и L-цепей нативными вариантами и селекции на основе повышенной аффинности связывания. В настоящее время доступны варианты этого метода, такие как "эпитопный импринтинг" (WO 93/06213; Waterhouse; Nucl Acids Res (1993), 21:2265-2266).

В настоящем документе описаны различные (пронумерованные) варианты осуществления изобре-

тения. Следует понимать, что характерные особенности, указанные в каждом варианте осуществления, можно комбинировать с другими указанными характерными особенностями для получения дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения.

Вариант осуществления 1: связывающая молекула, которая связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), где связывающая молекула является выделенным антителом человека или его фрагментом; предпочтительно, выделенным моноклональным антителом человека или его фрагментом.

Вариант осуществления 2: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 1, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывается с эпитопом IL-18 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1, где эпитоп:

- a) содержит следующие аминокислоты IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1:
 - i) аминокислоты 41 и 42 и аминокислоты с 87 по 97; или
 - ii) аминокислоты со 138 по 160; или
 - iii) аминокислоты со 177 по 181; или
 - iv) аминокислоты 41 и 42, аминокислоты с 87 по 97, аминокислоты со 138 по 160 и аминокислоты со 177 по 181; или
 - v) аминокислоты 41, 42, 87; 89; 90; или
 - vi) аминокислоты 93, 94; 95, 96; или
 - vii) аминокислоты 140; 141; 150; 177; или
 - viii) аминокислоты 92; 93; 94; 138; 140; 152; 157; или
 - ix) аминокислоты 142; 143; 150; 152; или
 - x) аминокислоты 143; 144; 145; 177; 180; или
 - xi) аминокислоты 41, 42, 87; 89; 90; 93, 94; 95, 96; 140; 141; 150; 177; или
 - xii) аминокислоты 92; 93; 94; 138; 140; 142; 143; 144; 145; 150; 152; 157; 177; 180; или
 - xiii) аминокислоты 41; 42, 87; 89; 90; 92; 93, 94; 95, 96; 138; 140; 141; 142; 143; 144; 145; 150; 152; 157; 177; 180; или
- b) содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре аминокислоты, как определено в любой одной из групп с (i) по (xiii), перечисленных в a); или
- c) содержит аминокислоты, как определено в любой одной из групп с (iv) по (xii), перечисленных в a).

Вариант осуществления 3: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 1, которые связываются с эпитопом IL-18 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1, где эпитоп содержит аминокислоты Arg140 и Glu152.

Вариант осуществления 4: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 3, где эпитоп дополнительно содержит любую одну или несколько аминокислот Gln92, Pro93, Gly95, Pro143, Glu157 или Glu177.

Вариант осуществления 5: выделенное антитело человека или его фрагмент по вариантам осуществления 3 и 4, где эпитоп дополнительно содержит любую одну или несколько аминокислот Lys89, Arg94, Met96, Phe138, Ser141, Gly144, His145, Asp146, Gln150 или Leu180.

Вариант осуществления 6: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где IL-18 содержит аминокислоты с 37 по 193 с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 7: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где выделенное антитело человека или его фрагмент ингибирует IL-18-зависимое продуцирование интерферона гамма (INF-γ).

Вариант осуществления 8: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 с KD, составляющей 100 пМ или менее.

Вариант осуществления 9: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где выделенное антитело человека или его фрагмент также конкурирует с мышинным антителом 125-2H за связывание IL-18.

Вариант осуществления 10: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит переменную область тяжелой цепи H-CDR1, содержащую SEQ ID NO: 3 или ее консервативные варианты, и переменную область тяжелой цепи H-CDR2, содержащую SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 9, или SEQ ID NO: 10, или SEQ ID NO: 11, или SEQ ID NO: 12, или SEQ ID NO: 13, или ее консервативные варианты, и переменную область тяжелой цепи H-CDR3, содержащую SEQ ID NO: 5 или ее консервативные варианты, и переменную область легкой цепи L-CDR1, содержащую SEQ ID NO: 6 или ее консервативные варианты, и переменную область легкой цепи L-CDR2, содержащую SEQ ID NO: 7 или ее консервативные варианты, и переменную область легкой цепи L-CDR3, содержащую SEQ ID NO: 8 или ее консервативные варианты.

Вариант осуществления 34: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит переменную область тяжелой цепи H-CDR1, содержащую SEQ ID NO: 59, или SEQ ID NO: 65, или SEQ ID NO: 66, или ее консервативные варианты, и переменную область тяжелой цепи H-CDR2, содержащую SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 67, или ее консервативные варианты, и переменную область тяжелой цепи H-CDR3, содержащую SEQ ID NO: 61 или ее консервативные варианты, и переменную область легкой цепи L-CDR1, содержащую SEQ ID NO: 62 или ее консервативные варианты, и переменную область легкой цепи L-CDR2, содержащую SEQ ID NO: 63 или ее консервативные варианты, и переменную область легкой цепи L-CDR3, содержащую SEQ ID NO: 64 или ее консервативные варианты.

Вариант осуществления 36: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 35, где выделенное антитело человека или его фрагмент конкурирует с мышинным антителом 125-2Н за связывание IL-18.

Вариант осуществления 38: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 37, где выделенное антитело человека или его фрагмент конкурирует с мышинным антителом 125-2Н за связывание IL-18.

Вариант осуществления 40: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 39, где выделенное антитело человека или его фрагмент конкурирует с мышинным антителом 125-2Н за связывание IL-18.

Вариант осуществления 42: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит вариабельную область тяжелой

цепи H-CDR1, содержащую SEQ ID NO: 162 или ее консервативные варианты, и вариательную область тяжелой цепи H-CDR2, содержащую SEQ ID NO: 163 или ее консервативные варианты, и вариательную область тяжелой цепи H-CDR3, содержащую SEQ ID NO: 164 или ее консервативные варианты, и вариательную область легкой цепи L-CDR1, содержащую SEQ ID NO: 165 или ее консервативные варианты, и вариательную область легкой цепи L-CDR2, содержащую SEQ ID NO: 166 или ее консервативные варианты, и вариательную область легкой цепи L-CDR3, содержащую SEQ ID NO: 167 или ее консервативные варианты.

Согласно определению Кабата, как указано выше, аминокислотные остатки CDR в вариальном домене тяжелой цепи (VH) имеют номера 31-35 (H-CDR1), 50-65 (H-CDR2) и 95-102 (H-CDR3); и аминокислотные остатки CDR в вариальном домене легкой цепи (VL) имеют номера 24-34 (L-CDR1), 50-56 (L-CDR2) и 89-97 (L-CDR3). Согласно Chothia аминокислоты CDR в VH имеют номера 26-32 (H-CDR1), 52-56 (H-CDR2) и 95-102 (H-CDR3); и аминокислотные остатки в VL имеют номера 26-32 (L-CDR1), 50-52 (L-CDR2) и 91-96 (L-CDR3). Посредством комбинирования определений CDR как Кабата, так и Chothia, и принимая во внимание вставку более длинных петель, CDR состоят из аминокислотных остатков 26-35 (H-CDR1), 50-65 (H-CDR2) и 95-102 (H-CDR3) в VH человека и аминокислотных остатков 24-34 (L-CDR1), 50-56 (L-CDR2) и 89-97 (L-CDR3) в VL человека.

Вариант осуществления 43: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит вариательную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO: 14 или ее консервативные варианты, и вариательную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 16 или ее консервативные варианты, и где вариательная область тяжелой цепи (VH) содержит:

- i) вариательную область тяжелой цепи H-CDR1, соответствующую аминокислотам 26-35 с SEQ ID NO: 14; и
 - ii) вариательную область тяжелой цепи H-CDR2, соответствующую аминокислотам 50-66 с SEQ ID NO: 14; и
 - iii) вариательную область тяжелой цепи H-CDR3, соответствующую аминокислотам 99-108 с SEQ ID NO: 14;
- и где вариательная область легкой цепи (VL) содержит:
- iv) вариательную область легкой цепи L-CDR1, соответствующую аминокислотам 23-35 с SEQ ID NO: 16; и
 - v) вариательную область легкой цепи L-CDR2, соответствующую аминокислотам 51-57 с SEQ ID NO: 16; и
 - vi) вариательную область легкой цепи L-CDR3, соответствующую аминокислотам 90-100 с SEQ ID NO: 16.

Вариант осуществления 44: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 43, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и где выделенное антитело человека или его фрагмент конкурирует с мышинным антителом 125-2H за связывание IL-18.

Вариант осуществления 45: выделенное антитело человека или его фрагмент по вариантам осуществления 43 или 44, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и это антитело или его фрагмент связывается с эпитопом, содержащим Arg140 и Glu152 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1, причем необязательно эпитоп дополнительно содержит любую одну или несколько аминокислот Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 или Leu180, предпочтительно эпитоп дополнительно содержит аминокислоты Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 и Leu180.

Вариант осуществления 46: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит вариательную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO: 18 или ее консервативные варианты, и вариательную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 20 или ее консервативные варианты, и где вариательная область тяжелой цепи (VH) содержит:

- i) вариательную область тяжелой цепи H-CDR1, соответствующую аминокислотам 26-35 с SEQ ID NO: 18; и
 - ii) вариательную область тяжелой цепи H-CDR2, соответствующую аминокислотам 50-66 с SEQ ID NO: 18; и
 - iii) вариательную область тяжелой цепи H-CDR3, соответствующую аминокислотам 99-108 с SEQ ID NO: 18;
- и где вариательная область легкой цепи (VL) содержит:
- iv) вариательную область легкой цепи L-CDR1, соответствующую аминокислотам 23-35 с SEQ ID NO: 20; и

v) вариабельную область легкой цепи L-CDR2, соответствующую аминокислотам 51-57 с SEQ ID NO: 20; и

vi) вариабельную область легкой цепи L-CDR3, соответствующую аминокислотам 90-100 с SEQ ID NO: 20.

Вариант осуществления 47: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 46, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и где выделенное антитело человека или его фрагмент конкурирует с мышинным антителом 125-2H за связывание IL-18.

Вариант осуществления 48: выделенное антитело человека или его фрагмент по вариантам осуществления 46 или 47, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и это антитело или его фрагмент связывается с эпителиом, содержащим Arg140 и Glu152 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1.

Учитывая то, что каждое из этих антител человека может связываться с IL18 и что антигенсвязывающая специфичность представлена преимущественно областями CDR1, 2 и 3, последовательности H-CDR1, 2 и 3 и последовательности L-CDR1, 2 и 3 можно "сочетать и комбинировать" (т.е. CDR от различных антител человека можно смешивать и комбинировать), каждое антитело, содержащее набор H-CDR1, 2 и 3 и набор L-CDR1, 2 и 3, создает анти-IL18-связывающие молекулы по изобретению. Связывание IL18 такими "сочетаемыми и комбинируемыми" антителами можно тестировать с использованием анализов связывания в примерах (например, ELISA). Когда последовательности CDR VH смешивают и комбинируют, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности VH должна быть заменена структурно схожей(ими) последовательность(ями) CDR. Аналогично, когда последовательности CDR VL смешивают и комбинируют, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности VL должна быть заменена структурно схожей(ими) последовательность(ями) CDR. Как правило, специалисту в данной области будет очевидно, что новые последовательности VH и VL можно создать посредством замещения одной или нескольких последовательностей CDR-области VH и/или VL структурно схожими последовательностями из последовательностей CDR, представленных в настоящем документе для антител человека по настоящему изобретению (фиг. 1 и 2).

В другом аспекте изобретение относится к выделенному антителу человека, связывающему IL-18 и не связывающему комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержащему аминокислотные последовательности VH, выбранные из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 83, 87, 90, 93, 112, 130 и 138, и аминокислотные последовательности VL, выбранные из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 16, 20, 85, 114, 132, 140, 147 и 153. Другие антитела по изобретению включают аминокислоты, которые были мутированы посредством делеции, вставки или замещения аминокислот, тем не менее, являются по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95 процентов идентичными в областях CDR с областями CDR, изображенными в последовательностях, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления они включают мутантные аминокислотные последовательности, где не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были мутированы посредством делеции, вставки или замещения аминокислот в областях CDR по сравнению с областями CDR, изображенными в последовательностях, описанных выше.

Вариант осуществления 49: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28, или ее консервативных вариантов, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16, или ее консервативных вариантов.

Вариант осуществления 50: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 49, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28, или ее консервативных вариантов, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16, или ее консервативных вариантов, где аминокислота аспарагин (Asn; N) в положении 30 в отношении SEQ ID NO: 28 заменена аминокислотой, выбранной из лизина (Lys; K), или серина (Ser; S), или треонина (Thr; T), или аланина (Ala; A), или глутамата (Glu; E), или гистидина (His; H), или лейцина (Leu; L), или глутамина (Gln; Q), или аргинина (Arg; R), или валина (Val; V), или тирозина (Tyr; Y), или изолейцина (Ile; I), или глицина (Gly; G).

Вариант осуществления 51: выделенное антитело человека или его фрагмент по вариантам осуществления 49 или 50, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и где выделенное антитело человека или его фрагмент конкурирует с мышинным антителом 125-2H за связывание IL-18.

Вариант осуществления 52: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариан-

тов осуществления 49-51, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и это антитело или его фрагмент связывается с эпитопом, содержащим Arg140 и Glu152 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1, причем необязательно эпитоп дополнительно содержит любую одну или несколько аминокислот Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 или Leu180, предпочтительно эпитоп дополнительно содержит аминокислоты Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 и Leu180.

Вариант осуществления 53: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, или ее консервативных вариантов, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16, или ее консервативных вариантов.

Вариант осуществления 54: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 53, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и где выделенное антитело человека или его фрагмент конкурирует с мышинным антителом 125-2H за связывание IL-18.

Вариант осуществления 55: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 53-55, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и это антитело или его фрагмент связывается с эпитопом, содержащим Arg140 и Glu152 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1, причем необязательно эпитоп дополнительно содержит любую одну или несколько аминокислот Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 или Leu180, предпочтительно эпитоп дополнительно содержит аминокислоты Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 и Leu180.

Вариант осуществления 56: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 53, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, или ее консервативных вариантов, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16, или ее консервативных вариантов, где аминокислота лизин (Lys; K) в положении 30 в отношении SEQ ID NO: 14 заменена аминокислотой, выбранной из аспарагина (Asn; N), или серина (Ser; S), или треонина (Thr; T), или аланина (Ala; A), или глутамата (Glu; E), или гистидина (His; H), или лейцина (Leu; L), или глутамина (Gln; Q), или аргинина (Arg; R), или валина (Val; V), или тирозина (Tyr; Y), или изолейцина (Ile; I), или глицина (Gly; G).

Вариант осуществления 57: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 56, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и где выделенное антитело человека или его фрагмент конкурирует с мышинным антителом 125-2H за связывание IL-18.

Вариант осуществления 58: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 55 или 57, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и это антитело или его фрагмент связывается с эпитопом, содержащим Arg140 и Glu152 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1, причем необязательно эпитоп дополнительно содержит любую одну или несколько аминокислот Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 или Leu180, предпочтительно эпитоп дополнительно содержит аминокислоты Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 и Leu180.

Вариант осуществления 59: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 18, или их консервативных вариантов, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20, или ее консервативных вариантов.

Вариант осуществления 60: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 59, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и где выделенное антитело человека или его фрагмент конкурирует с мышинным антителом 125-2H за связывание IL-18.

Вариант осуществления 61: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 59 или 60, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не

связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и это антитело или его фрагмент связывается с эпитопом, содержащим Arg140 и Glu152 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1, причем необязательно эпитоп дополнительно содержит любую одну или несколько аминокислот Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 или Leu180, предпочтительно эпитоп дополнительно содержит аминокислоты Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 и Leu180.

Вариант осуществления 62: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 40, или их консервативных вариантов, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20, или ее консервативных вариантов.

Вариант осуществления 63: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 62, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 40, или ее консервативных вариантов, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20, или ее консервативных вариантов, где

i) аминокислота глутамат (Glu; E) в положении 1 в отношении SEQ ID NO: 40 заменена аминокислотой глутамин (Gln; Q) и

ii) где аминокислота аспарагин (Asn; N) в положении 30 в отношении SEQ ID NO: 40 заменена аминокислотой, выбранной из серина (Ser; S), или треонина (Thr; T), или аспартата (Asp; D).

Вариант осуществления 64: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 63, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 40, или ее консервативных вариантов, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20, или ее консервативных вариантов, где

i) аминокислота глутамат (Glu; E) в положении 1 в отношении SEQ ID NO: 40 заменена аминокислотой глутамин (Gln; Q); и

ii) где аминокислота аспарагин (Asn; N) в положении 30 в отношении SEQ ID NO: 40 заменена аминокислотой, выбранной из серина (Ser; S), или треонина (Thr; T), или аспартата (Asp; D); и

iii) где аминокислота метионин (Met; M) в положении 54 в отношении SEQ ID NO: 40 заменена аминокислотой, выбранной из тирозина (Tyr; Y), или аспарагина (Asn; N), или изолейцина (Ile; I).

Вариант осуществления 65: выделенное антитело человека или его фрагмент по вариантам осуществления 62-64, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и где выделенное антитело человека или его фрагмент конкурирует с мышинным антителом 125-2H за связывание IL-18.

Вариант осуществления 66: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 65-66, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и это антитело или его фрагмент связывается с эпитопом, содержащим Arg140 и Glu152 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1, причем необязательно эпитоп дополнительно содержит любую одну или несколько аминокислот Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 или Leu180, предпочтительно эпитоп дополнительно содержит аминокислоты Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 и Leu180.

Вариант осуществления 67: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 62, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 40, или ее консервативных вариантов, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20, или ее консервативных вариантов, где

i) аминокислота глутамат (Glu; E) в положении 1 в отношении SEQ ID NO: 40 заменена аминокислотой глутамин (Gln; Q) и

ii) где аминокислота серин (Ser; S) в положении 31 в отношении SEQ ID NO: 40 заменена аминокислотой, выбранной из треонина (Thr; T), или аспарагина (Asn; N), или аланина (Ala; A).

Вариант осуществления 68: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 67, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс

IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 40, или ее консервативных вариантов, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20, или ее консервативных вариантов, где:

- i) аминокислота глутамат (Glu; E) в положении 1 в отношении SEQ ID NO: 40 заменена аминокислотой глутамин (Gln; Q); и
- ii) где аминокислота серин (Ser; S) в положении 31 в отношении SEQ ID NO: 40 заменена аминокислотой, выбранной из треонина (Thr; T), или аспарагина (Asn; N), или аланина (Ala; A);
- iii) где аминокислота метионин (Met; M) в положении 54 в отношении SEQ ID NO: 40 заменена аминокислотой, выбранной из тирозина (Tyr; Y), или аспарагина (Asn; N), или изолейцина (Ile; I).

Вариант осуществления 69: выделенное антитело человека или его фрагмент по вариантам осуществления 67 или 68, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и где выделенное антитело человека или его фрагмент конкурирует с мышинным антителом 125-2H за связывание IL-18.

Вариант осуществления 70: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 67-69, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и это антитело или его фрагмент связывается с эпитопом, содержащим Arg140 и Glu152 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1, причем необязательно эпитоп дополнительно содержит любую одну или несколько аминокислот Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 или Leu180, предпочтительно эпитоп дополнительно содержит аминокислоты Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 и Leu180.

Вариант осуществления 72: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 22, или SEQ ID NO: 25, или SEQ ID NO: 28, или SEQ ID NO: 31, или SEQ ID NO: 34, или их консервативных вариантов, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16, или ее консервативных вариантов.

Вариант осуществления 73: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20, или ее консервативных вариантов.

Вариант осуществления 74: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность VH, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 43, 47, 50, 53, 56, 96, 100, 103, 116, 134, 142 и 158, или их консервативных вариантов; и аминокислотную последовательность VL, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 45, 98, 118, 136, 144, 150, 156 и 160, или их консервативных вариантов.

Вариант осуществления 75: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность VH, выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 43, или ее консервативных вариантов, и аминокислотную последовательность VL, выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45, или ее консервативных вариантов.

Вариант осуществления 76: выделенное антитело человека или его фрагмент по варианту осуществления 75, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и где выделенное антитело человека или его фрагмент конкурирует с мышинным антителом 125-2H за связывание IL-18.

Вариант осуществления 77: выделенное антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 75 или 76, где выделенное антитело человека или его фрагмент связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и это антитело или его фрагмент связывается с эпитопом, содержащим Arg140 и Glu152 на IL-18, как определено в отношении SEQ ID NO: 1, причем необязательно эпитоп дополнительно содержит любую одну или несколько аминокислот Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 или Leu180, предпочтительно эпитоп дополнительно содержит аминокислоты Lys89, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Phe138, Ser141, Pro143, Gly144, Glu157, Glu177 и Leu180.

вает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и содержит аминокислотную последовательность VH, выбранную из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 134, или ее консервативных вариантов, и аминокислотную последовательность VL, выбранную из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 136, или SEQ ID NO: 150, или SEQ ID NO: 156, или их консервативных вариантов.

2.2) Гуманизированные или химерные антитела.

Очевидной альтернативой изобретению, описываемому в настоящем документе, является использование гуманизированных или химерных антител вместо антител человека.

Использование интактных, не человеческих антител при лечении заболеваний или расстройств человека связано с признанными проблемами их потенциальной иммуногенности. Это означает, что иммунная система пациента может распознать не человеческое интактное выделенное антитело как чужое и развить гуморальную иммунную реакцию. Это особенно очевидно при многократном введении не человеческого выделенного антитела пациенту-человеку. На протяжении многих лет были разработаны различные методы преодоления этих проблем, и обычно они включают снижение иммуногенности, не человеческой, в интактном выделенном антителе с сохранением относительной простоты получения не человеческих антител от иммунизированного животного, например, мыши, крысы или кролика. В широком смысле, для достижения этого используют два подхода. Первый представляет собой химерные (иногда гибридные) антитела, обычно содержащие не человеческий (например, грызуна, такого как мышь) вариабельный домен, слитый с константной областью человека. Ввиду локализации антигенсвязывающего участка выделенного антитела в пределах вариабельных областей, химерное выделенное антитело сохраняет свою аффинность связывания для антигена, но приобретает эффекторные функции константной области человека, и, таким образом, способно выполнять такие эффекторные функции, как описано выше. Химерные антитела обычно получают с использованием методов рекомбинантной ДНК. ДНК, кодирующие антитела (например, кДНК), выделяют и секвенируют с использованием общепринятых процессов (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые способны к специфическому связыванию с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи выделенного антитела по изобретению. Обычным источником такой ДНК служат гибридомные клетки. После выделения ДНК помещают в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как *E.coli*, клетки COS, клетки CHO или миеломные клетки, которые иным образом не продуцируют иммуноглобулиновый белок, для получения синтеза выделенного антитела. ДНК можно модифицировать путем замещения кодирующей последовательности для L- и H-цепей человека на соответствующие, не человеческие (например, мышиные) H- и L-константные области (Morrison; PNAS 81, 6851 (1984)).

Второй подход включает образование гуманизированных антител, где не человеческую структуру выделенного антитела уменьшают посредством гуманизации вариабельных областей. Популярность приобрели два способа гуманизации. Первый представляет собой гуманизацию посредством переноса CDR. CDR образуют петли вблизи N-конца выделенного антитела, где они образуют поверхность, размещенную в каркасе, образованном каркасной областью. Антигенсвязывающая специфичность выделенного антитела в основном определяется посредством топографии и химических характеристик его CDR-поверхности. Эти свойства, в свою очередь, определяют посредством конформации индивидуальных CDR, с помощью относительного расположения CDR и характера и расположения боковых цепей остатков, содержащих CDR. Значительное снижение иммуногенности может быть достигнуто путем переноса только CDR не человеческих (например, мышиных) антител ("донорных" антител) на подходящие каркасные области ("акцепторную каркасную область") и константные области человека (Jones et al. (1986), Nature 321:522-525 and Verhoeven M et al. (1988), Science 239:1534-1536). Однако перенос CDR сам по себе может не привести к полному сохранению антигенсвязывающих свойств, и часто считают, что некоторые каркасные остатки (иногда обозначаемые "обратными мутациями") донорного выделенного антитела необходимо сохранить в гуманизированном соединении, если необходимо получить значительную аффинность связывания с антигеном (Queen C et al. (1989), Proc Natl Acad Sci 86:10029-10033, Co, M et al. (1991), Nature 351, 501-502). В этом случае, для получения каркасной области (FR) человека из базы данных можно выбрать вариабельные области человека, демонстрирующие наибольшую гомологию последовательности с не человеческим донорным выделенным антителом. Выбор FR человека может быть осуществлен либо из консенсусных, либо из индивидуальных антител человека. При необходимости, для сохранения конформаций CDR ключевые остатки из донорного выделенного антитела заменяют в акцепторной каркасной области человека. Для облегчения идентификации таких структурно важных остатков может быть использовано компьютерное моделирование выделенного антитела.

Альтернативно, гуманизации можно достичь с помощью процесса "маскировки". Статистический анализ уникальных вариабельных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов человека и мыши показал, что определенные паттерны экспонированных остатков отличаются в антителах человека и мыши, и наиболее характерные поверхностные положения имеют выраженное предпочтение к небольшой группе различных остатков (Padlan EA, et al. (1991), Mol. Immunol. 28:489-498 and Pedersen J.T. et al. (1994), J. Mol. Biol. 235:959-973). Таким образом, можно снизить иммуногенность не человеческого Fv путем замены экспонированных остатков в его каркасных областях, которые отличаются от остатков, обычно обнаруживаемых в антителах человека. Поскольку антигенность белка может коррелировать с

поверхностной доступностью, замена поверхностных остатков может быть достаточной для придания "невидимости" вариабельной области мыши для иммунной системы человека (также Mark GE et al. (1994), in Handbook of Experimental Pharmacology vol. 113: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, p. 105-134). Этот способ гуманизации известен как "маскировка", поскольку изменена только поверхность выделенного антитела, а поддерживающие остатки остаются незатронутыми.

2.3) Фрагменты выделенных антител и антитела с единичным вариабельным доменом.

В другом варианте осуществления изобретения связывающей молекулой является фрагмент антитела или антитело с единичным вариабельным доменом, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

Предпочтительно связывающей молекулой является Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, dAb или V_{HH}.

Как правило, такие фрагменты получают посредством протеолитического расщепления интактных антител, например, посредством расщепления папаином (см., например, WO 94/29348), но их можно получать непосредственно из рекомбинантно трансформированных клеток-хозяев. Кроме того, фрагменты выделенных антител можно получать с использованием различных способов конструирования, как описано ниже.

Фрагменты Fv обладают более низкой энергией взаимодействия их двух цепей, чем фрагменты Fab. Для стабилизации связи VH- и VL-доменов их связали с пептидами (Bird et al. (1988), Science, 242:423-426, Huston et al. (1998), PNAS, 85:5879-5883), дисульфидными мостиками (Glockshuber et al. (1990), Biochemistry, 29:1362-1367) и мутациями "выступ во впадину" (Zhu et al. (1997), Protein Sci, 6:781-788). Фрагменты scFv можно получать способами, хорошо известными специалистам в данной области (Whitlow et al. (1991), Methods companion Methods Enzymol, 2:97-105 and Huston et al. (1993), Int Rev Immunol 10:195-217). ScFv можно получать в бактериальных клетках, таких как E.coli, но более предпочтительным является их получение в эукариотических клетках. Одним из недостатков scFv является моновалентность продукта, которая препятствует повышенной avidности вследствие поливалентного связывания, а другим - его короткий период полужизни. Попытки преодоления этих проблем включают бивалентный (scFv)₂, полученный из scFv, содержащего дополнительный С-концевой цистеин, путем химического сопряжения (Adams et al. (1993), Can Res 53:4026-4034 and McCartney et al. (1995), Protein Eng, 8:301-314) или путем спонтанной сайт-специфической димеризации scFv, содержащего неспаренный С-концевой остаток цистеина (Kipriyanov et al. (1995), Cell. Biophys 26:187-204). Альтернативно, можно инициировать формирование мультимеров из ScFv путем укорочения пептидного линкера до 3-12 остатков для образования "диател" (Holliger et al PNAS (1993), 90:6444-6448). Укорочение линкера может также привести к образованию тримеров ScFv ("триател", см. Kortt et al. (1997), Protein Eng, 10:423-433) и тетрамеров ("тетрател", Le Gall et al. (1999), FEBS Lett, 453:164-168). Конструирования бивалентных молекул ScFv также можно достичь путем генетического слияния с димеризующими мотивами белков для образования "миниантител" (Pack et al. (1992), Biochemistry 31:1579-1584) и "минител" (Hu et al. (1996), Cancer Res. 56:3055-3061). Тандемы ScFv-ScFv ((ScFv)₂) также могут быть получены с помощью соединения двух единиц ScFv третьим пептидным линкером (см. Kurucz et al. (1995), J. Immunol, 154:4576-4582). Биспецифические диатела могут быть получены посредством нековалентной связи продуктов слияния двух отдельных цепей, содержащих VH-домен из одного выделенного антитела, соединенный с помощью короткого линкера с VL-доменом другого выделенного антитела (см. Kipriyanov et al. (1998), Int J Can 77:763-772). Стабильность таких биспецифических диател можно повысить путем введения дисульфидных мостиков или мутаций "выступ во впадину", как описано выше, или путем образования одноцепочечных диател (ScDb), где два гибридных фрагмента ScFv соединены посредством пептидного линкера (см. Kontermann et al. (1999), J. Immunol Methods 226:179-188). Четырехвалентные биспецифические молекулы доступны, например, благодаря слиянию фрагмента ScFv с CH3-доменом молекулы IgG или с фрагментом Fab через шарнирную область (см. Coloma et al. (1997), Nature Biotechnol, 15:159-163). Альтернативно, четырехвалентные биспецифические молекулы были получены путем слияния биспецифических одноцепочечных диател (см. Alt et al. (1999), FEBS Lett 454:90-94). Меньшие четырехвалентные биспецифические молекулы также могут быть образованы путем димеризации или тандемов ScFv-ScFv с линкером, содержащим мотив спираль-петля-спираль (DiBi miniantibodies, см. Muller et al. (1998), FEBS Lett 432:45-49), или одноцепочечной молекулы, содержащей четыре вариабельных домена выделенного антитела (VH и VL) в ориентации, предотвращающей внутримолекулярное спаривание (тандемное диатело, см. Kipriyanov et al. (1999), J. Mol. Biol. 293:41-56). Биспецифические фрагменты F(ab')₂ могут быть созданы путем химического сочетания фрагментов Fab' или путем гетеродимеризации посредством лейциновых "молний" (см. Shalaby et al. (1992), J. Exp Med 175:217-225 и Kostelny et al. (1992), J Immunol 148:1547-1553).

Термин "антитело с единичным вариабельным доменом" относится к вариабельному домену антитела (VH, V_{HH}, VL), который специфически связывает антиген или эпитоп независимо от другой V-области или домена. Антитело с единичным вариабельным доменом может присутствовать в формате (например, гомо- или гетеро-мультимера) с другими, различными вариабельными областями или вариабельными доменами, где другие области или домены необходимы для связывания антигена с помощью единичного вариабельного домена (т.е. где антитело с единичным доменом связывает антиген независи-

мо от дополнительных переменных доменов). "Антитело с доменом" или "dAb" означает то же, что "антитело с единственным переменным доменом", которое способно связываться с антигеном, при использовании этого термина в настоящем документе. Антитело с единственным переменным доменом может быть переменным доменом антитела человека, но оно также включает единичные переменные домены антитела от других видов, таких как V_{HH} dAbs грызуна (например, как описано в WO 00/29004), акулы-няньки и камелида. V_{HH} камелида являются полипептидами с единственным переменным доменом, полученными от видов, включая верблюда, ламу, альпака, одногорбого верблюда и гуанако, продуцирующих антитела с тяжелой цепью, естественным образом лишённые легких цепей. Такие V_{HH}-домены можно гуманизировать в соответствии со стандартными способами, доступными в данной области, и такие домены по-прежнему считают "антителами с доменом" по изобретению. В рамках изобретения термин "VH" включает камелидные V_{HH}-домены.

2.4) Гомологичные антитела или их фрагменты и консервативные варианты.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения связывающей молекулой является антитело или его фрагмент с аминокислотными последовательностями переменной области тяжелой и легкой цепи или аминокислотными последовательностями тяжелой и легкой цепи, которые являются гомологичными аминокислотным последовательностям антител, описываемых в настоящем документе, и где гомологичные антитела или их фрагменты сохраняют необходимые функциональные свойства связывающей молекулы по изобретению.

Например, изобретение относится к выделенному антителу или его фрагменту, содержащим VH и VL, где: VH является по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 90% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14; 18; 22; 25; 28; 31; 34; 37; 40; 83; 87; 90; 93; 112; 130 или 138; VL является по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 90% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16; 20; 85; 114; 132; 140; 147 или 153, где гомологичное антитело специфически связывается с IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP). Гомологичное антитело может проявлять по меньшей мере одно дополнительное функциональное свойство, такое как ингибирование связывания IL18 с IL18R или ингибирование IL-18-зависимого продуцирования IFN- γ .

В других вариантах осуществления аминокислотные последовательности VH и/или VL могут быть на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям, указанным выше. В других вариантах осуществления аминокислотные последовательности VH и/или VL могут быть идентичными, за исключением замены аминокислот не более чем в 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных положениях. Антитело с областями VH и VL с высокой степенью идентичности (т.е. 80% или выше) с областями VH и VL с SEQ ID NO: 14; 18; 22; 25; 28; 31; 34; 37; 40; 83; 87; 90; 93; 112; 130 или 138 и SEQ ID NO: 16; 20; 85; 114; 132; 140; 147 или 153 соответственно, можно получать посредством мутагенеза (например, сайт-направленного или ПЦР-опосредованного мутагенеза) молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих SEQ ID NO: 15; 19; 23; 26; 29; 32; 35; 38; 41; 84; 88; 91; 94; 113; 131; 139; 146 или 152 и 17; 21; 24; 27; 30; 33; 36; 39; 42; 86; 89; 92; 95; 115; 133; 141; 148 или 154 соответственно, с последующим тестированием кодированного измененного антитела для сохраненной функции (т.е. вышеуказанных функций) с использованием функциональных анализов, описываемых в настоящем документе.

Гомологичным антителом может быть, например, антитело человека, гуманизированное антитело или химерное антитело. Предпочтительным антителом является полностью человеческое молчащее антитело IgG1.

В рамках изобретения процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных общих положений последовательностей (т.е. % идентичности=число идентичных положений/общее число положений $\times$ 100), учитывая число пропусков и длину каждого пропуска, которые необходимо вводить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществить с использованием математического алгоритма, как описано ниже.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с использованием алгоритма, описанного в публикации E. Meyers and W. Miller (1988), Comput. Appl. Bio-sci 4:11-17, включенного в программу ALIGN (версии 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM 120, штрафом за удлинение пропуска 12 и штрафом за пропуск 4. Альтернативно, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с использованием алгоритма, описанного в публикации Needleman and Wunsch (1970), J. Mol. Biol. 48:444-453, включенного в программу GAP пакета программного обеспечения GCG (доступную на <http://www.gcg.com>), с использованием или матрицы Blossom 62, или матрицы PAM250, и штрафом за открытие пропуска, составляющим 16, 14, 12, 10, 8, 6, или 4, и штрафом за удлинение пропуска, составляющим 1, 2, 3, 4, 5, или 6.

2.5) Антитела с двойным переменным доменом.

Антитела с двойным переменным доменом (DVD) содержат два или более антигенсвязывающих участков и являются четырехвалентными или поливалентными антителами, как, например, двухвалент-

ными и четырехвалентными. Поливалентное антитело, в частности, сконструировано с двумя или более антигенсвязывающими участками и, как правило, не является природным антителом. Антитела DVD могут быть способны к связыванию двух или более связанных или несвязанных мишеней. Такие антитела DVD могут быть моноспецифическими, т.е. способными связывать один антиген, или полиспецифическими, т.е. способными связывать два или более антигенов. В некоторых вариантах осуществления антитело DVD содержит две тяжелых цепи и две легких цепи. Каждая тяжелая цепь и легкая цепь содержат два антигенсвязывающих участка. Каждый участок связывания содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи с общим количеством 6 CDR, участвующих в связывании антигена, на антигенсвязывающий участок.

В одном из вариантов осуществления связывающей молекулой по настоящему изобретению является антитело с двойным вариабельным доменом (DVD), которое связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

В частности, антитело с двойным вариабельным доменом по изобретению способно связывать IL-18 и вторую мишень. Вторая мишень может быть выбрана из IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-25, IL-33, IL-1 β , TNF альфа/бета и IFN- γ .

2.6) Биспецифические и полиспецифические молекулы и антитела.

В одном из вариантов осуществления связывающей молекулой по настоящему изобретению является выделенное биспецифическое антитело или его фрагмент, содержащие первую специфичность с IL-18 и вторую специфичность с другим полипептидом, например, IL-12; где биспецифическое антитело не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

В частности, биспецифическое антитело по изобретению способно связывать IL-18 и вторую мишень. Вторая мишень может быть выбрана из IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-25, IL-33, IL-1 β , TNF альфа/бета и IFN- γ .

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к связывающей молекуле, которой является выделенное полиспецифическое антитело или его фрагмент, содержащие первую специфичность с IL-18, вторую специфичность с другим полипептидом, например, IL-12, и по меньшей мере третью специфичность с другим полипептидом, где полиспецифическое антитело не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

В частности, полиспецифическое антитело по изобретению способно связывать IL-18, вторую и третью мишень. Вторая и третья мишени могут быть выбраны из IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-25, IL-33, IL-1 β , TNF альфа/бета и IFN- γ .

Биспецифическим выделенным антителом является выделенное антитело со специфичностью связывания по меньшей мере двух различных эпитопов. Способы получения таких антител известны в данной области. Как правило, рекомбинантное получение биспецифических антител основано на коэкспрессии двух иммуноглобулиновых пар Н-цепь/Л-цепь, где две Н-цепи обладают различными специфичностями связывания (см. Millstein et al. (1983), Nature 305:537-539, WO93/08829 и Traunecker et al. (1991), EMBO 10:3655-3659). Вследствие случайной сортировки Н- и Л-цепей получают потенциальную смесь из десяти различных структур выделенного антитела, из которых только одна обладает необходимой специфичностью связывания. Альтернативный подход включает слияние вариабельных доменов с необходимыми специфичностями связывания с константной областью тяжелой цепи, содержащей по меньшей мере часть шарнирной области, СН2- и СН3-области. Предпочтительно иметь по меньшей мере в одном из слияний СН1-область, содержащую участок, необходимый для связывания с легкой цепью. ДНК, кодирующую эти слияния и, при желании, Л-цепь, вставляют в отдельные экспрессирующие векторы и затем котрансфицируют в подходящий организм-хозяин. Это возможно даже для вставки в один экспрессирующий вектор кодирующих последовательностей для двух или всех трех цепей. Согласно одному предпочтительному подходу биспецифическое выделенное антитело состоит из Н-цепи с первой специфичностью связывания в одном плече и пары Н-Л-цепей, обеспечивающей вторую специфичность связывания в другом плече, см. WO 94/04690. Также см. Suresh et al., Methods in Enzymology 121, 210, 1986.

Биспецифические и полиспецифические антитела по изобретению могут быть получены или связаны с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора) для образования биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя различными участками связывания или молекулами-мишенями. Антитело по изобретению может быть фактически получено или связано более чем с одной другой функциональной молекулой для образования полиспецифических молекул, которые связываются более чем с двумя различными участками связывания и/или молекулам-мишенями; такие полиспецифические молекулы также предназначены для включения термина "биспецифическая молекула" в рамках изобретения. Для создания биспецифической молекулы по изобретению антитело по изобретению может быть функционально связано (например, посредством химического сопряжения, генетического слияния, нековалентной связи или иного способа) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, таким образом, чтобы получить

биспецифическую молекулу.

В одном из вариантов осуществления биспецифические молекулы по изобретению содержат в качестве специфичности связывания по меньшей мере одно антитело, или фрагмент антитела, включая, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, или одноцепочечное Fv. Антителом может также быть димер легкой цепи или тяжелой цепи, любой его минимальный фрагмент, такой как Fv или одноцепочечный конструктор, как описано в патенте США № 4946778, принадлежащем Ladner et al.

Другими антителами, которые можно использовать в биспецифических молекулах по изобретению, являются мышинные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

Биспецифические и полиспецифические молекулы по настоящему изобретению можно получать посредством конъюгации составляющей специфичности связывания с использованием известных в данной области способов. Например, каждую специфичность связывания биспецифической молекулы можно получать отдельно, а затем конъюгировать друг с другом. Когда специфичностью связывания являются белки или пептиды, для ковалентной конъюгации можно использовать связывающие или сшивающие средства. Примеры сшивающих средств включают белок А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетил-тиоацетат (SATA), 5,5'-диотибис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky et al. (1984), J. Exp Med; 160:1686; Liu, MA et al. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 82:8648). Другие способы включают те, которые описаны в публикациях Paulus (1985), Behring Inst Mitt; 78:118-132; Brennan et al. (1985), Science; 229:81-83), и Glennie et al. (1987), J. Immunol; 139:2367-2375. Агентами для конъюгации являются SATA и сульфо-SMCC, оба доступны от Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Когда специфичностью связывания являются антитела, их можно конъюгировать посредством сульфгидрильного связывания С-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. В конкретном варианте осуществления шарнирную область модифицируют для получения содержания нечетного числа сульфгидрильных остатков, например одного, перед конъюгацией.

Альтернативно, обе специфичности связывания могут быть кодированы в одном и том же векторе и экспрессированы и собраны в одной и той же клетке-хозяине. Этот способ особенно пригоден, когда биспецифической молекулой является mAb×mAb, mAb×Fab, Fab×F(ab')₂ или лиганд × слитый белок Fab. Биспецифической молекулой по изобретению может быть одноцепочечная молекула, содержащая одноцепочечное антитело и связывающий детерминант, или одноцепочечная биспецифическая молекула, содержащая два связывающих детерминанта. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в патентах США № 5260203; 5455030; 4881175; 5132405; 5091513; 5476786; 5013653; 5258498 и 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями может быть подтверждено с помощью, например, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммунологического анализа (RIA), анализа FACS, биопробы (например, ингибирования роста), или вестерн-блоттинга. Каждый из этих анализов, как правило, детектирует присутствие комплексов белок-антитело, представляющих особый интерес, путем использования меченого реагента (например, антитела), специфичного для исследуемого комплекса.

2.7) Поливалентные антитела.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к поливалентным антителам, содержащим по меньшей мере две идентичные или различные антигенсвязывающие части антител по изобретению, связывающиеся с IL-18 и не связывающие комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

В одном из вариантов осуществления поливалентное антитело представляет собой по меньшей мере две, три или четыре антигенсвязывающие части антител, описываемых в настоящем документе. Антигенсвязывающие части могут быть связаны друг с другом посредством слияния белка или ковалентной или нековалентной связи. Альтернативно, способы связывания описаны для биспецифических молекул. Четырехвалентные соединения можно получать, например, посредством сшивания антител по изобретению с антителом, которое связывается с константными областями антител по изобретению, например, Fc- или шарнирной областью.

2.8) Иммуноконъюгаты.

В другом варианте осуществления связывающей молекулой по настоящему изобретению является антитело или его фрагмент, которые связываются с IL-18, но не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), где антитело или его фрагмент конъюгирован с терапевтической молекулой, такой как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммуносупрессор) или радиотоксин.

Такие конъюгаты обозначают в настоящем документе как "иммуноконъюгаты". Иммуноконъюгаты, которые включают один или несколько цитотоксинов, обозначают как "иммунотоксины". Цитотоксин или цитотоксическое средство включает любое средство, негативно влияющее (например, уничтожающее) клетки. Примеры включают таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, т. колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидрокси-антрацен-дион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи. Терапевти-

ческие средства также включают, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), аблативные агенты (например, мехлоретамин, тиотепа, хлорамбуцил, меифалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфид, дибромоманнит, стрептозотозин, митомицин С и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP), цисплатин, антрациклины (например, даунорубин (ранее известный как дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее известный как актиномицин), блеомицин, митрамицин, и антрамицин (АМС)), и антимитотические средства (например, винкристин и винбластин).

Другие примеры терапевтических цитотоксинов, которые могут быть конъюгированы с антителом по изобретению, включают дуокармицины, калихеамицины, майтансины и ауристатины, и их производные. Пример конъюгата антитела с калихеамицином коммерчески доступен (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Цитотоксины могут быть конъюгированы с антителами по изобретению с использованием технологии линкера, доступной в данной области. Примеры типов линкера, которые были использованы для конъюгирования цитотоксина с антителом, включают, но не ограничиваются ими, гидразоны, тиоэфиры, сложные эфиры, дисульфиды и пептид-содержащие линкеры. Линкер можно выбирать, то есть, например, чувствительный к расщеплению за счет низкого уровня pH в пределах лизосомального компартмента или чувствительный к расщеплению протеазами, такими как протеазы, предпочтительно экспрессируемые в опухолевой ткани, такие как катепсины (например, катепсины В, С, D).

Для более подробного рассмотрения типов цитотоксинов, линкеров и способов конъюгации терапевтических средств с антителами также см. Saito, G et al. (2003), *Adv Drug Deliv Rev*; 55:199-215; Trail, PA et al. (2003), *Cancer Immunol Immunother*; 52:328-337; Payne, G (2003), *Cancer Cell*; 3:207-212; Allen, TM (2002), *NatRev Cancer*; 2:750-763; Pastan, I and Kreitman, R.J. (2002), *Curr Opin Investig Drugs*; 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001), *Adv Drug Deliv Rev*; 53:247-264.

Антитела по настоящему изобретению можно также конъюгировать с радиоактивным изотопом для образования цитотоксических радиофармацевтических средств, также обозначаемых как радиоиммуноконъюгаты. Примеры радиоактивных изотопов, которые можно конъюгировать с антителами для диагностического или терапевтического применения включают, но не ограничиваются ими, йод¹³¹, индий¹¹¹, иттрий⁹⁰ и лютеций¹⁷⁷. Способы получения радиоиммуноконъюгатов разработаны в данной области. Примеры радиоиммуноконъюгатов коммерчески доступны, включая Зевалин™ (DEC Pharmaceuticals) и Веххар™ (Corixa Pharmaceuticals), и аналогичные способы можно использовать для получения радиоиммуноконъюгатов с помощью антител по изобретению.

Конъюгаты антитела по изобретению можно использовать для модифицирования указанного биологического ответа, и не следует считать, что молекула лекарственного средства ограничивается классическими химическими терапевтическими средствами.

Например, молекулой лекарственного средства может быть белок или полипептид, обладающие необходимой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, ферментативно активный токсин, или его активный фрагмент, такой как абрин, рицин А, экзотоксин синегнойной палочки, или дифтерийный токсин; или факторы роста.

Методы конъюгации такой терапевтической молекулы с антителами хорошо известны, см., например, Amon et al "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), и Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates" (1982), *Immunol Rev*; 62:119-58.

2.9) Гетероконъюгированные антитела.

Гетероконъюгированные антитела также составляют вариант осуществления настоящего изобретения. Гетероконъюгированные антитела состоят из двух ковалентно соединенных антител, образованных с использованием любых подходящих способов сшивания, где по меньшей мере одним из соединенных антител является антитело по изобретению, которое связывает IL-18, но не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP). См., например, US 4676980.

2.10) Конструирование каркаса.

Сконструированные антитела по изобретению включают те, в которых произведены модификации каркасных остатков в пределах VH и/или VL, например, для улучшения свойств антитела. Обычно такие модификации каркаса производят для снижения иммуногенности антитела. Например, один подход заключается в "мутировании к первоначальному виду" одного или нескольких каркасных остатков в соответствующую последовательность зародышевой линии. Более конкретно, антитело, прошедшее соматическую мутацию, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело. Такие остатки можно определить путем сравнения кар-

касных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых получено антитело. Для преобразования последовательностей каркасной области обратно в конфигурацию зародышевой линии, соматические мутации можно "мутировать к первоначальному виду" в последовательность зародышевой линии посредством, например, сайт-специфического мутагенеза или ПЦР-опосредованного мутагенеза. Такие антитела, "мутировавшие к первоначальному виду", также предназначены для включения в настоящее изобретение.

Другой тип каркасной модификации включает мутацию одного или нескольких остатков в рамках каркасной области, или даже в рамках одной или нескольких областей CDR, для удаления эпитопов для Т-клеток, для снижения, таким образом, потенциальной иммуногенности антитела. Такой подход также известен как "деимунизация" и более подробно описан в патентной публикации США № 20030153043 автора Carr et al.

2.11) Другие модификации.

Помимо или в качестве альтернативы модификаций, произведенных в рамках каркаса или областей CDR, антитела по изобретению можно сконструировать для включения модификаций в рамках Fc-области, обычно для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как время полувыведения из сыворотки, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антиген-зависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, антитело по изобретению может быть химически модифицировано (например, одна или несколько химических молекул могут быть прикреплены к антителу) или модифицировано для изменения его гликозилирования, снова для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления более подробно описан ниже. Нумерация остатков в Fc-области такая же, как в индексе европейской системы нумерации, представленном у Кабата.

В одном из вариантов осуществления шарнирная область CH1 модифицирована таким образом, что изменено количество остатков цистеина в шарнирной области, например, повышено или понижено.

Такой подход более подробно описан в патенте США № 5677425 автора Bodmer et al. Количество остатков цистеина в шарнирной области CH1 изменяют, например, для обеспечения ансамбля легкой и тяжелой цепи или для повышения или снижения стабильности антитела.

В другом варианте осуществления представлена мутация шарнирной области Fc антитела для уменьшения биологического периода полужизни антитела. Более конкретно, одну или несколько мутаций аминокислот вводят в граничную область доменов CH2-CH3 фрагмента Fc-шарнира таким образом, чтобы антитело ослабило связывание стафилококкового белка А (SpA) относительно связывания нативного домена Fc-шарнира SpA. Этот подход более подробно описан в патенте США № 6165745, принадлежащем Ward et al.

В другом варианте осуществления антитело модифицируют для увеличения его биологического периода полужизни. Возможны различные подходы. Например, можно вводить одну или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375, принадлежащем Ward. Альтернативно, для увеличения биологического периода полужизни антитела можно изменять в пределах области CH1 или CL для получения содержания эпитопа связывания рецептора спасения, взятого из двух петель CH2-домена Fc-области IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022 автором Presta et al.

В других вариантах осуществления Fc-область изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторных функций антитела. Например, одну или несколько аминокислот можно заменить другим аминокислотным остатком таким образом, что меняется аффинность антитела к эффекторному лиганду, но сохраняется его антиген-связывающая способность родительского антитела. Эффекторным лигандом, к которому изменяется аффинность, может быть, например, Fc-рецептор или компонент C1 комплемента. Этот подход более подробно описан в патентах США № 5624821 и 5648260, оба из которых принадлежат Winter et al.

В другом варианте осуществления одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков, можно заменить другим аминокислотным остатком таким образом, что изменяется связывание C1q антитела и/или снижается или устраняется обусловленная комплементом цитотоксичность (CDC). Этот подход более подробно описан в патентах США № 6194551 автором Idusogie et al.

В другом варианте осуществления один или несколько аминокислотных остатков изменяют для изменения, тем самым, способности антитела фиксировать комплемент. Этот подход более подробно описан в публикации PCT WO 94/29351 автором Bodmer et al.

В еще одном варианте осуществления Fc-область модифицируют для повышения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для повышения аффинности антитела для рецептора Fcγ посредством модифицирования одной или нескольких аминокислот. Этот подход более подробно описан в публикации PCT WO 00/42072 автора Presta. Кроме того, обозначены участки связывания на IgG1 человека для FcγR1, FcγR2, FcγR3 и FcRn и описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields, R.L. et al. (2001), J. Biol Chem 276:6591-6604).

В определенных вариантах осуществления используют Fc-домен изотипа IgG1. В некоторых кон-

кретных вариантах осуществления используют мутантный вариант Fc-фрагмента IgG1, например, молчащий Fc IgG1, который снижает или устраняет способность слитого полипептида опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или связывать рецептор Fcγ. Пример молчащего мутанта IgG1 изотипа, где остаток лейцина заменен остатком аланина при положениях аминокислоты 234 и 235 описан в публикации Hezareh et al., J. Virol (2001); 75 (24):12161-8.

В определенных вариантах осуществления Fc-домен является мутантом, предотвращающим гликозилирование при положении 297 Fc-домена. Например, Fc-домен содержит аминокислотную замену остатка аспарагина в положении 297. Примером такой замены аминокислоты является замена N297 глицином или аланином.

В еще одном варианте осуществления модифицируют гликозилирование антитела. Например, можно получить агликозилированное антитело (т.е. антитело с отсутствием гликозилирования). Гликозилирование можно изменять для, например, повышения аффинности антитела к антигену. Такие карбогидратные модификации можно осуществить посредством; например, изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в рамках последовательности антитела. Например, можно произвести одну или несколько замен аминокислот, приводящих к устранению одной или нескольких участков гликозилирования каркаса вариабельных областей для устранения, тем самым, гликозилирования на этом сайте. Такое агликозилирование может повышать аффинность антитела к антигену. Такой подход более подробно описан в патентах США № 5714350 и 6350861 автором Co et al.

Дополнительно или альтернативно, можно получить антитело с измененным типом гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело со сниженным количеством фукозильных остатков или антитело с увеличенными бисекторными структурами GlcNac. Показано, что такие паттерны гликозилирования демонстрируют повышение способности ADCC антител. Такие карбогидратные модификации можно произвести посредством, например, экспрессирования антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования описаны в данной области, и их можно использовать в качестве клеток-хозяев для экспрессирования рекомбинантных антител по изобретению с получением, таким образом, антитела с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195 автора Hang et al. описана линия клеток с функционально прерванным геном FUT8, кодирующим фукозилтрансферазу, так что антитела, экспрессированные в такой линии клеток, демонстрируют гипофукозилирование. Таким образом, в одном из вариантов осуществления антитела по изобретению получают посредством рекомбинантной экспрессии в линии клеток, показывающей паттерн гипофукозилирования, например, линии клеток млекопитающего с дефектной экспрессией гена FUT8, кодирующего фукозилтрансферазу. В публикации PCT WO 03/035835 автора Presta описан вариант линии клеток CHO, Lec13 клетки, со сниженной способностью прикрепления фукозы к Asn(297)-связанным карбогидратам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессированных в этой клетке-хозяине (также см. Shields, R.L. et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740). В публикации PCT WO 99/54342 автора Umana et al. описаны линии клеток, сконструированные для экспрессирования гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)) таким образом, что антитела, экспрессированные в сконструированных линиях клеток, демонстрируют увеличенные бисекторные структуры GlcNac, что приводит к повышенной активности ADCC антител (также см. Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180). Альтернативно, антитела по изобретению можно получать в дрожжах или нитевидных грибах, созданных для паттерна гликозилирования, подобного млекопитающему, и с возможностью получения антител с отсутствием фукозы в качестве паттерна гликозилирования (см., например, EP1297172B1).

Другой модификацией антител в настоящем документе, предполагаемой по изобретению, является пегилирование. Антитело может быть пегилировано для, например, увеличения биологического (например, сывороточного) периода полужизни антитела. Для пегилирования антитела обычно проводят реакцию антитела или его фрагмента с полиэтиленгликолем (PEG), таким как реактивное сложноэфирное или альдегидное производное PEG, в условиях, при которых происходит прикрепление одной или нескольких PEG-групп к антителу или фрагменту антитела. Пегилирование можно проводить путем реакции ацилирования или реакции алкилирования с реактивной молекулой PEG (или аналогичным реактивным водорастворимым полимером). В рамках изобретения термин "полиэтиленгликоль" предназначен для включения любой из форм PEG, используемой для получения других белков, таких как моно (C1-C10) алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. В определенных вариантах осуществления антителом для пегилирования является агликозилированное антитело. Способы пегилирования белков известны в данной области и могут применяться по отношению к антителам по изобретению. См., например, EP 0154316, принадлежащий Nishimura et al. и EP 04 01384, принадлежащий Ishikawa et al.

Другой модификацией антител, предполагаемой по изобретению, является конъюгат или слитый белок, по меньшей мере антигенсвязывающей области антитела по изобретению с сывороточным белком, таким как сывороточный альбумин человека или его фрагмент, для увеличения периода полужизни полученной в результате молекулы. Такой подход описан, например, в Ballance et al. EP0322094.

3. Перенос антигенсвязывающих доменов в альтернативные каркасы или структурные скелеты.

Широкий спектр каркасов или структурных скелетов антитело/иммуноглобулинов можно использовать при условии, что получаемый полипептид включает по меньшей мере одну связывающую область, которая специфически связывается с IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и где связывающая молекула не является IL-18BP. Такие каркасы или структурные скелеты включают 5 основных идиотипов иммуноглобулинов человека или их фрагментов (таких как те, которые описаны в иных местах в настоящем документе), и включают иммуноглобулины других видов животных, предпочтительно с гуманизированными аспектами. В этом отношении антитела с одной тяжелой цепью, такие как те, которые определены в камелидах, представляют особый интерес. Специалисты в данной области продолжают открывать и разрабатывать новые каркасы, структурные скелеты и фрагменты.

3.1) Неиммуноглобулиновые каркасы.

Известные или созданные в будущем неиммуноглобулиновые каркасы и структурные скелеты можно использовать при условии, что они содержат связывающую область, специфическую для IL-18 и не связывающую комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и где связывающая молекула не является IL-18BP. Такие соединения обозначены в настоящем документе как "полипептиды, содержащие мишень-специфическую связывающую область". Известные неиммуноглобулиновые каркасы или структурные скелеты включают, но не ограничиваются ими, аднектины (Adnectins® - Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), дарпины, авимеры, Affibodys® (Affibody AG, Sweden), антикарины (Pieris Proteolab AG, Freising, Germany), Affilins® (гамма-кристаллин или убиквитин; Scil Proteins GmbH, Halle, Germany) и миметики эпитопа белка (PEM; Polyphor® Ltd, Allschwil, Switzerland).

3.2) Молекулы фибронектина и аднектины.

В одном из аспектов изобретения связывающей молекулой является молекула фибронектина. Молекула фибронектина имеет структурный скелет, предпочтительно основанный на домене фибронектина III типа (например, десятом модуле фибронектина типа III (домене 10 Fn3)). В одном из вариантов осуществления связывающей молекулой является аднектин (Adnectins®).

Домен фибронектина типа III имеет 7 или 8 бета-цепей, распределенных между двумя бета-складками, которые упакованы друг против друга с образованием ядра белка, и дополнительно содержит петли (аналогично CDR), связывающие бета-цепи между собой, и доступны для действия растворителя. Существуют по меньшей мере три такие петли на каждом краю сэндвича р-складки, где край представляет собой границу белка, перпендикулярную направлению р-цепей (US 6818418).

Данные структурные скелеты на базе фибронектина не являются иммуноглобулином, хотя общая складка очень близка складке самого маленького функционального фрагмента антитела, вариативной области тяжелой цепи, которая содержит полный элемент распознавания антигена в IgG верблюда и ламы. В связи с этой структурой неиммуноглобулиновое антитело имитирует свойства связывания антигена, которые аналогичны по природе и аффинности данным свойствам антител. Эти структурные скелеты можно использовать в стратегии рандомизации петель и перетасовки *in vitro*, подобно процессу созревания аффинности антител *in vivo*. Эти молекулы на основе фибронектина можно использовать в качестве структурных скелетов, где области петель молекулы могут быть заменены CDR по изобретению с использованием стандартных методов клонирования.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула является молекулой фибронектина, которая связывается (например, специфически связывается) с IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

В других вариантах осуществления связывающая молекула представляет собой аднектин, который связывается (например, специфически связывается) с IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

3.3) Дарпины.

Технология основана на использовании белков с анкириновыми повторами в качестве структурных скелетов для вариативных областей, которые можно использовать для связывания с различными мишенями. Анкириновые повторы представляют собой полипептид из 33 аминокислот, состоящий из двух антипараллельных α -спиралей и β -изгиба. Связывание вариативных областей главным образом оптимизируют посредством использования рибосомного дисплея.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула представляет собой анкирин/дарпин, который связывается (например, специфически связывается) с IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

3.4) Авимеры.

Авимеры получают из нативного белка, содержащего А-домен, такого как LRP-1. Эти домены используют по существу для взаимодействий белок-белок, и у человека свыше 250 белков структурно основаны на А-доменах. Авимеры состоят из ряда различных мономеров "А-домен" (2-10), связанных посредством аминокислотных линкеров. Можно создавать авимеры, которые связываются с целевым антигеном, с использованием методов, описанных, например, в US20040175756; US20050053973; US20050048512 и US20060008844.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула является авимером,

который связывается (например, специфически связывается) с IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

3.5) Affibody®.

Affibody® представляет собой маленькие, простые белки, состоящие из пучка трех спиралей на основе структурного скелета одного из IgG-связывающих доменов белка А. Белок А является поверхностным белком, полученным от бактерии *Staphylococcus aureus*. Этот домен структурного скелета состоит из 58 аминокислот, 13 из которых рандомизированы для генерации библиотек Affibody® с большим количеством вариантов лигандов (см., например, US 5831012). Молекулы Affibody® имитируют антитела; их молекулярная масса составляет 6 кДа по сравнению с молекулярной массой антител, составляющей 150 кДа. Несмотря на свой маленький размер, участок связывания молекул Affibody® аналогичен участку связывания антитела.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула является аффителом, которое связывается (например, специфически связывается) с IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

3.6) Anticalins®.

Anticalins® являются продуктами, разработанными компанией Pieris ProteoLab AG. Их получают из липокалинов, распространенной группы маленьких и устойчивых белков, которые, как правило, участвуют в физиологическом транспорте или накоплении химически чувствительных или нерастворимых соединений. Некоторые природные липокарины возникают в тканях или биологических жидкостях человека.

Структура белка напоминает иммуноглобулины, с гипервариабельными петлями наверху ригидного каркаса. Однако в противоположность антителам или их рекомбинантным фрагментам, липокарины состоят из единичной полипептидной цепи со 160-180 аминокислотными остатками, будучи только незначительно больше, чем единичный иммуноглобулиновый домен.

Группа из четырех петель, которая создает связывающий карман, демонстрирует выраженную структурную пластичность и допускает множество боковых цепей. Таким образом, участок связывания может быть видоизменен в частном способе для того, чтобы распознавать предназначенные молекулы-мишени различной формы с высокой аффинностью и специфичностью.

Один из белков семейства липокалинов, билин-связывающий белок (BBP) от Pieris Brassicae, использовали для разработки антикалинов посредством мутагенеза группы из четырех петель. Примером патентной заявки, в которой описаны "антикарины", является PCT WO 199916873.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула является антикалином, который связывается (например, специфически связывается) с IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

3.7) Affilin®.

Молекулы Affilin® являются небольшими неиммуноглобулиновыми белками, которые созданы для специфической аффинности по отношению к белкам и низкомолекулярным соединениям. Новые молекулы Affilin® можно легко выбрать из двух библиотек, базой каждой из которых является другой белок структурного скелета человека.

Молекулы Affilin® не демонстрируют структурной гомологии с иммуноглобулиновыми белками. Компания Scil Proteins использует два структурных скелета Affilin™, одним из которых является гамма-кристаллин, структурный белок хрусталика глаза человека, а другим являются белки суперсемейства "убиквитина". Оба структурных скелета человека очень маленькие, проявляют высокую термостабильность и в существенной степени устойчивы к изменениям pH и денатурирующим агентам. Эта высокая стабильность в основном обусловлена расширенной структурой β-складки белков. Примеры белков, полученных из гамма-кристаллина, описаны в WO200104144, и примеры "убиквитин-подобных" белков описаны в WO2004106368.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула является аффилином, который связывается (например, специфически связывается) с IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

3.8) Миметики эпитопа белка.

Миметиками эпитопа белка (РЕМ) являются молекулы циклические, пептидоподобные молекулы среднего размера (около 1-2 кДа), имитирующие вторичные структуры бета-шпильки белков, главная вторичная структура участвует во взаимодействиях белок-белок.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления связывающая молекула является миметиком эпитопа белка, который связывается (например, специфически связывается) с IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

4. Полинуклеотиды, кодирующие связывающие молекулы по изобретению.

Другой аспект изобретения относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим связывающие молекулы по изобретению.

Полинуклеотиды с вариабельным доменом тяжелой цепи, кодирующие выделенные антитела чело-

века, описанные в настоящем документе, представлены в SEQ ID NO: 15, 19, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 84, 88, 91, 94, 113, 131, 139, 146 и 152. Полинуклеотиды с вариабельным доменом легкой цепи, кодирующие выделенные антитела человека, описанные в настоящем документе, представлены в SEQ ID NO: 17, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 86, 89, 92, 95, 115, 133, 141, 148 и 154. Другие полинуклеотиды, кодирующие антитела по изобретению, включают мутированные полинуклеотиды, тем не менее, являющиеся по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95 процентов идентичными последовательностям, описанным выше, такие как полинуклеотиды, оптимизированные для экспрессии белка в клетках млекопитающего, например, линиях клеток CHO.

Вариант осуществления 89: варианты нуклеиновые кислоты, где не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов изменено посредством делеции, вставки или замещения нуклеотидов в вариабельных областях, по сравнению с вариабельными областями, изображенными в последовательностях, описанных выше.

Вариант осуществления 90: выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельный домен тяжелой цепи антитела или его фрагмента по изобретению, где полинуклеотид:

а) является по меньшей мере на 90% идентичным SEQ ID NO: 15, или SEQ ID NO: 19, или SEQ ID NO: 23, или SEQ ID NO: 26, или SEQ ID NO: 29, или SEQ ID NO: 32, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 38, или SEQ ID NO: 41, или SEQ ID NO: 84, или SEQ ID NO: 88, или SEQ ID NO: 91, или SEQ ID NO: 94, или SEQ ID NO: 113, или SEQ ID NO: 131, или SEQ ID NO: 139, или SEQ ID NO: 146, или SEQ ID NO: 152, или

б) содержит SEQ ID NO: 15, или SEQ ID NO: 19, или SEQ ID NO: 23, или SEQ ID NO: 26, или SEQ ID NO: 29, или SEQ ID NO: 32, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 38, или SEQ ID NO: 41, или SEQ ID NO: 84, или SEQ ID NO: 88, или SEQ ID NO: 91, или SEQ ID NO: 94, или SEQ ID NO: 113, или SEQ ID NO: 131, или SEQ ID NO: 139, или SEQ ID NO: 146, или SEQ ID NO: 152, или

в) состоит по существу из SEQ ID NO: 15, или SEQ ID NO: 19, или SEQ ID NO: 23, или SEQ ID NO: 26, или SEQ ID NO: 29, или SEQ ID NO: 32, или SEQ ID NO: 35, или SEQ ID NO: 38, или SEQ ID NO: 41, или SEQ ID NO: 84, или SEQ ID NO: 88, или SEQ ID NO: 91, или SEQ ID NO: 94, или SEQ ID NO: 113, или SEQ ID NO: 131, или SEQ ID NO: 139, или SEQ ID NO: 146, или SEQ ID NO: 152.

Вариант осуществления 91: выделенный полинуклеотид, кодирующий вариабельный домен легкой цепи антитела или его фрагмента по изобретению, где полинуклеотид:

а) является по меньшей мере на 90% идентичным SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 21, или SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 27, или SEQ ID NO: 30, или SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 36, или SEQ ID NO: 39, или SEQ ID NO: 42, или SEQ ID NO: 86, или SEQ ID NO: 89, или SEQ ID NO: 92, или SEQ ID NO: 95, или SEQ ID NO: 115, или SEQ ID NO: 133, или SEQ ID NO: 141, или SEQ ID NO: 148, или SEQ ID NO: 154, или

б) содержит SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 21, или SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 27, или SEQ ID NO: 30, или SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 36, или SEQ ID NO: 39, или SEQ ID NO: 42, или SEQ ID NO: 86, или SEQ ID NO: 89, или SEQ ID NO: 92, или SEQ ID NO: 95, или SEQ ID NO: 115, или SEQ ID NO: 133, или SEQ ID NO: 141, или SEQ ID NO: 148, или SEQ ID NO: 154, или

в) состоит по существу из SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 21, или SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 27, или SEQ ID NO: 30, или SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 36, или SEQ ID NO: 39, или SEQ ID NO: 42, или SEQ ID NO: 86, или SEQ ID NO: 89, или SEQ ID NO: 92, или SEQ ID NO: 95, или SEQ ID NO: 115, или SEQ ID NO: 133, или SEQ ID NO: 141, или SEQ ID NO: 148, или SEQ ID NO: 154.

Вариант осуществления 92: выделенный полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь антитела по изобретению, где полинуклеотид:

а) является по меньшей мере на 90% идентичным SEQ ID NO: 44, или SEQ ID NO: 48, или SEQ ID NO: 51, или SEQ ID NO: 54, или SEQ ID NO: 57, или SEQ ID NO: 101, или SEQ ID NO: 159, или SEQ ID NO: 97, или SEQ ID NO: 104, или SEQ ID NO: 117, или SEQ ID NO: 143, или SEQ ID NO: 135, или SEQ ID NO: 149, или SEQ ID NO: 155; или

б) содержит SEQ ID NO: 44, или SEQ ID NO: 48, или SEQ ID NO: 51, или SEQ ID NO: 54, или SEQ ID NO: 57, или SEQ ID NO: 101, или SEQ ID NO: 159, или SEQ ID NO: 97, или SEQ ID NO: 104, или SEQ ID NO: 117, или SEQ ID NO: 143, или SEQ ID NO: 135, или SEQ ID NO: 149, или SEQ ID NO: 155; или

в) состоит по существу из SEQ ID NO: 44, или SEQ ID NO: 48, или SEQ ID NO: 51, или SEQ ID NO: 54, или SEQ ID NO: 57, или SEQ ID NO: 101, или SEQ ID NO: 159, или SEQ ID NO: 97, или SEQ ID NO: 104, или SEQ ID NO: 117, или SEQ ID NO: 143, или SEQ ID NO: 135, или SEQ ID NO: 149, или SEQ ID NO: 155.

Вариант осуществления 93: выделенный полинуклеотид, который кодирует легкую цепь антитела по изобретению, где полинуклеотид:

а) является по меньшей мере на 90% идентичным SEQ ID NO: 46, или SEQ ID NO: 49, или SEQ ID NO: 52, или SEQ ID NO: 55, или SEQ ID NO: 58, или SEQ ID NO: 102, или SEQ ID NO: 161, или SEQ ID NO: 99, или SEQ ID NO: 105, или SEQ ID NO: 119, или SEQ ID NO: 145, или SEQ ID NO: 137, или SEQ ID NO: 151, или SEQ ID NO: 157; или

б) содержит SEQ ID NO: 46, или SEQ ID NO: 49, или SEQ ID NO: 52, или SEQ ID NO: 55, или SEQ ID NO: 58, или SEQ ID NO: 102, или SEQ ID NO: 161, или SEQ ID NO: 99, или SEQ ID NO: 105, или SEQ

ID NO: 119, или SEQ ID NO: 145, или SEQ ID NO: 137, или SEQ ID NO: 151, или SEQ ID NO: 157; или

с) состоит по существу из SEQ ID NO: 46, или SEQ ID NO: 49, или SEQ ID NO: 52, или SEQ ID NO: 55, или SEQ ID NO: 58, или SEQ ID NO: 102, или SEQ ID NO: 161, или SEQ ID NO: 99, или SEQ ID NO: 105, или SEQ ID NO: 119, или SEQ ID NO: 145, или SEQ ID NO: 137, или SEQ ID NO: 151, или SEQ ID NO: 157.

Полинуклеотид может присутствовать в цельных клетках, в клеточном лизате или может быть представлен в частично очищенном или по существу очищенном виде. Полинуклеотид является "выделенным" или "считается по существу чистым" при его очистке от других клеточных компонентов или других примесей, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, с помощью стандартных способов, включая обработку щелочью/SDS (ДЧН), CsCl-бэндинг, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в данной области. См. F. Ausubel, et al. (1987), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Полинуклеотид по изобретению может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать или может не содержать интронные последовательности. В одном из вариантов осуществления полинуклеотидом является молекула кДНК. Полинуклеотид может присутствовать в векторе, таком как вектор фагового дисплея, или в рекомбинантном плазмидном векторе.

Полинуклеотиды по изобретению могут быть получены с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Для антител, экспрессированных гибридами (например, гибридами, полученными от трансгенных мышей, несущих гены иммуноглобулинов человека, как описано ниже), кДНК, кодирующую легкую и тяжелую цепи антитела, полученного посредством гибридомы, можно получать путем стандартной ПЦР-амплификации или методами клонирования кДНК. Для антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с использованием методов фагового дисплея), полинуклеотиды, кодирующие антитело, можно получать из различных фаговых клонов, являющихся членами библиотеки.

После получения фрагментов ДНК, кодирующих сегменты VH и VL, этими фрагментами ДНК можно дополнительно управлять посредством стандартных технологий рекомбинантной ДНК, например, для преобразования генов варибельной области в гены полноразмерной цепи антитела, в гены фрагмента Fab или в ген scFv. При этих манипуляциях фрагмент, кодирующий ДНК VL или VH, функционально связан с другой молекулой ДНК, или с фрагментом, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. Термин "функционально связан", при использовании в этом контексте, предназначен для обозначения двух фрагментов ДНК, соединенных функциональным образом, например, таким образом, что аминокислотные последовательности, закодированные двумя фрагментами ДНК, остаются внутри рамки, или таким образом, что белок экспрессирован под контролем необходимого промотора.

Выделенная ДНК, кодирующая область VH, может быть преобразована в полноразмерный ген тяжелой цепи посредством функционального связывания ДНК, кодирующей VH, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека известны в данной области (см., например, Kabat, E. A., et al., (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получать посредством стандартной ПЦР-амплификации. Константной областью тяжелой цепи может быть константная область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи выбрана из IgG1 изоформ. Для гена фрагмента Fab тяжелой цепи ДНК, кодирующая VH, может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область тяжелой цепи CH1.

Выделенная ДНК, кодирующая область VL, может быть преобразована в полноразмерный ген легкой цепи (а также в ген Fab легкой цепи) посредством функционального связывания ДНК, кодирующей VL, с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи, CL. Последовательности генов константной области легкой цепи человека известны в данной области (см., например, Kabat, E. A., et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получать посредством стандартной ПЦР-амплификации. Константной областью легкой цепи может быть константная область каппа или ламбда.

Для создания гена scFv фрагменты ДНК, кодирующие VH и VL, функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly4-Ser)3, таким образом, что VH- и VL-последовательности могут экспрессироваться в виде смежного одноцепочечного белка с областями VL и VH, соединенными посредством гибкого линкера (см., например, Bird et al., 1988 *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty et al. (1990), *Nature* 348:552-554).

Полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 89-93 может быть модифицирован in-vitro таким образом, что при введении его в клетки млекопитающих он предотвращает расщепление полинуклеотида и обеспечивает механизм трансляции клеток млекопитающего для получения антитела, начиная

с модифицированного полинуклеотида (такого, как описано в патенте США № 8278036 В2, принадлежащем Kariko et al.). Затем такую синтезированную модифицированную *in vitro* РНК можно вводить в клетки млекопитающих или пациенту как часть генотерапии.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения включает способ индуцирования клеткой млекопитающего с целью получения антитела, как описано в настоящем документе, включающий: взаимодействие указанной клетки млекопитающего с синтезированной модифицированной *in vitro* РНК, полученной от полинуклеотида по любому из вариантов осуществления 89-93, где указанная синтезированная модифицированная *in vitro* РНК содержит одну или несколько модификаций, как описано в патенте США № 8278036 В2.

5. Получение антител.

Моноклональные антитела (mAbs) можно получать различными способами, включая общепринятую методологию моноклональных антител, например, стандартный метод гибридизации соматических клеток, описанный Kohler и Milstein (1975), Nature 256: 495. Можно использовать многие способы получения моноклонального антитела, например, вирусную или онкогенную трансформацию В-лимфоцитов.

Протоколы и способы иммунизации для выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в данной области. Сливающиеся клетки (например, мышинные миеломные клетки) и процессы слияния также известны.

Химерные или гуманизированные моноклональные антитела по настоящему изобретению можно получать на основе последовательности мышинного моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующую тяжелую и легкую цепь иммуноглобулинов, можно получать из представляющей интерес мышинной гибридомы и сконструировать для получения последовательностей иммуноглобулинов, не мышинных (например, человеческих), с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела мышинные вариабельные области можно связывать с константными областями человека известными в данной области способами (см., например, патент США № 4816567 Cabilly et al.). Для создания гуманизированного антитела мышинные CDR-области могут быть вставлены в каркас человека известными в данной области способами. См., например, патент США № 5225539, принадлежащий Winter, и патенты США № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, принадлежащие Queen et al.

Моноклональные антитела человека можно получать с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих скорее части иммунной системы человека, чем системы мыши. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, обозначаемых в настоящем документе как мыши HuMAb и мыши КМ, соответственно, и совместно обозначаемых в настоящем документе как "мыши с Ig человека".

HuMAb Mouse® (Medarex, Inc.) содержит минилокусы гена иммуноглобулина человека, которые кодируют неперегруппированные последовательности тяжелой (μ и γ) и к легкой цепи иммуноглобулина человека, вместе с направленными мутациями, которые инактивируют локусы эндогенных цепей μ и κ (см., например, Lonberg et al. (1994), Nature; 368(6474): 856-859). Соответственно, мыши проявляют пониженную экспрессию IgM или κ мыши, и в ответ на иммунизацию введенные трансгены тяжелой и легкой цепи человека подвергаются смене класса и соматической мутации с возникновением высокоаффинного моноклонального антитела IgGк человека (Lonberg, N et al. (1994), выше; reviewed in Lonberg, N (1994), Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N and Huszar, D (1995), Intern Rev Immunol; 13: 65-93, и Harding, F and Lonberg, N (1995), Ann N Y Acad Sci; 764:536-546). Получение и использование мышей HuMAb и геномные модификации, носителями которых являются такие мыши, более подробно описаны в публикациях Taylor, L et al. (1992), Nucl Acids Res; 20:6287-6295; Chen, J et al. (1993), Int Immunol; 5: 647-656; Tuaillon et al. (1993), Proc Natl Acad Sci USA; 94:3720-3724; Choi et al. (1993), Nature Gen; 4:117-123; Chen, J et al. (1993), EMBO J; 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994), J. Immunol; 152:2912-2920; Taylor, L et al. (1994), Int Immuno; 6:579-591; и Fishwild, D et al. (1996), Nature Biotech; 14: 845-851, содержание каждой из которых, в частности, полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. См. также патенты США № 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; и 5770429; все принадлежат Lonberg и Kay; патент США № 5545807, принадлежащий Surani et al.; публикации PCT № WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все принадлежат Lonberg и Kay; и публикацию PCT № WO 01/14424, принадлежащую Korman et al.

В одном из вариантов осуществления антитела человека по изобретению можно индуцировать с использованием мыши, несущей последовательности иммуноглобулина человека на трансгенах и трансхромосомах, такой как мышь, несущая трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши обозначены в настоящем документе как "мыши КМ", более подробно описанные в публикации PCT WO 02/43478, принадлежащей Ishida et al.

Кроме того, в данной области доступны альтернативные трансгенные системы животного, экспрессирующие гены иммуноглобулинов человека, и их можно использовать для индуцирования антител по изобретению. Например, можно использовать альтернативную трансгенную систему, обозначаемую как

Xenomouse (Abgenix, Inc.). Такие мыши описаны, например, в патентах США № 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963, принадлежащих Kucherlapati et al.

Кроме того, в данной области доступны альтернативные трансхромосомные системы животного экспрессирующие гены иммуноглобулинов человека, и их можно использовать для индуцирования антител по изобретению. Например, можно использовать мышей, несущих как трансхромосому тяжелой цепи человека, так и трансхромосому легкой цепи человека, обозначаемых как "мыши ТС"; такие мыши описаны в публикации Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Кроме того, в данной области описаны коровы, несущие трансхромосомы тяжелой и легкой цепи человека (Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotech 20:889-894).

Рекомбинантные антитела человека по изобретению также можно получать с использованием способов фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулинов человека. Такие способы фагового дисплея для выделения антител человека установлены в данной области или описаны в примерах ниже. См., например, патенты США № 5223409; 5403484; и 5571698, принадлежащие Ladner et al.; патенты США № 5427908 и 5580717, принадлежащие Dower et al.; патенты США № 5969108 и 6172197, принадлежащие McCafferty et al.; и патенты США № 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081, принадлежащие Griffiths et al.

Моноклональные антитела человека по изобретению также можно получать с использованием мышей SCID, в которых реконструировали иммунные клетки человека таким образом, что ответную реакцию антитела человека можно получать при иммунизации. Такие мыши описаны, например, в патентах США № 5476996 и 5698767, принадлежащих Wilson et al.

Антитела по изобретению также можно получать в трансфектоме клетки-хозяина с использованием, например, комбинации технологий рекомбинантной ДНК и способов трансфекции генов, хорошо известных в данной области (например, Morrison, S. (1985), Science 229:1202).

Например, для экспрессирования антител или фрагментов антител ДНК, кодирующие частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, можно получать стандартными методами молекулярной биологии (например, ПЦР-амплификацией или клонированием кДНК с использованием гибридомы, которая экспрессирует исследуемое антитело), и ДНК можно встраивать в клонирующие или экспрессирующие векторы таким образом, чтобы гены были функционально связаны с последовательностями транскрипционного и трансляционного контроля. Предполагается, что в этом контексте термин "функционально связан" означает то, что ген антитела лигирован в вектор таким образом, что последовательности транскрипционного и трансляционного контроля в векторе служат для их предполагаемой функции регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Клонированный или экспрессирующий вектор и контролирующие экспрессию последовательности выбирают так, чтобы они были совместимы с используемой для экспрессии клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно встроить в отдельный вектор, или, чаще, оба гена встраивают в один и тот же экспрессирующий вектор. Гены антитела вставляют в экспрессирующий вектор стандартными способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и вектора или лигированием по "ту-пым" концам, если сайты рестрикции отсутствуют). Вариативные области легкой и тяжелой цепи антител, описываемые в настоящем документе, можно использовать для создания генов полноразмерного антитела любого изотипа антитела посредством встраивания их в экспрессирующие векторы, уже кодирующие константные области тяжелой и легкой цепей необходимого изотипа таким образом, чтобы VH-сегмент был функционально связан с CH-сегментом(ами) в векторе и VL-сегмент был функционально связан с CL-сегментом в векторе. В дополнение или в качестве альтернативы, рекомбинантный экспрессирующий вектор может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор таким образом, чтобы сигнальный пептид был связан с сохранением рамки считывания с аминоконцом гена цепи антитела. Сигнальным пептидом может быть иммуноглобулиновый сигнальный пептид или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из белка, не относящегося к иммуноглобулину).

В одном из аспектов изобретение относится к клонирующему или экспрессирующему вектору, содержащему один или несколько полинуклеотидов по изобретению.

Вариант осуществления 94: клонирующий или экспрессирующий вектор, содержащий по меньшей мере один полинуклеотид, выбранный из: SEQ ID NO: 44, или SEQ ID NO: 48, или SEQ ID NO: 51, или SEQ ID NO: 54, или SEQ ID NO: 57, или SEQ ID NO: 101, или SEQ ID NO: 159, или SEQ ID NO: 97, или SEQ ID NO: 104, или SEQ ID NO: 117, или SEQ ID NO: 143, или SEQ ID NO: 135, или SEQ ID NO: 149, или SEQ ID NO: 155, или SEQ ID NO: 46, или SEQ ID NO: 49, или SEQ ID NO: 52, или SEQ ID NO: 55, или SEQ ID NO: 58, или SEQ ID NO: 102, или SEQ ID NO: 161, или SEQ ID NO: 99, или SEQ ID NO: 105, или SEQ ID NO: 119, или SEQ ID NO: 145, или SEQ ID NO: 137, или SEQ ID NO: 151, или SEQ ID NO: 157.

В дополнение к полинуклеотидам, кодирующим цепи антитела, клонирующие или экспрессирующие векторы по изобретению несут регуляторные последовательности, контролирующие экспрессию генов цепей антитела в клетке-хозяине. Термин "регуляторная последовательность" предназначен для включения промоторов, энхансеров и других элементов контроля экспрессии (например, сигналов поли-

аденилирования), контролирующих транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в публикации Goeddel (Gene expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990). Специалистам в данной области понятно, что разработка экспрессирующего вектора, включая селекцию регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клеток-хозяев для трансформирования, необходимый уровень экспрессии белка и т.д. Регуляторные последовательности для экспрессии клетки-хозяина млекопитающего включают вирусные элементы, направляющие высокие уровни экспрессии белка в клетки млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из цитомегаловируса (CMV), вируса 40 обезьяны (SV40), аденовируса (например, главный поздний промотор аденовируса (AdMLP)) и полиомы. Альтернативно, можно использовать невирусные регуляторные последовательности, такие как промотор убиквитина или промотор Р-глобина. Кроме того, регуляторные элементы, состоящие из последовательностей из различных источников, таких как SRA промоторная система, содержащая последовательности из раннего промотора SV40 и длинноконцевого повтора вируса Т-клеточного лейкоза 1 типа человека (Takebe, Y. et al., 1988 Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Кроме того, клонирующие или экспрессирующие векторы по изобретению могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, регулирующие репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, участки начала репликации), и селективируемые маркерные гены. Селективируемые маркерные гены облегчают отбор клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США № 4399216, 4634665 и 5179017, все принадлежат Axel et al.). Например, обычно селективируемый маркерный ген придает резистентность к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, в клетке-хозяине, в которую был введен этот вектор. Селективируемые маркерные гены включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в клетках-хозяевах DHFR с селекцией/амплификацией при действии метотрексата) и ген нео (для отбора G418).

Для экспрессии легких и тяжелых цепей экспрессирующий(ие) вектор(ы), кодирующий(е) тяжелые и легкие цепи, трансфицируют в клетку-хозяина стандартными способами. Различные формы термина "трансфекция" предназначены для включения широкого спектра методов, широко используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например, электропорация, осаждение фосфатом кальция, DEAE-декстран трансфекция и т.п. Теоретически возможно экспрессирование антител по изобретению или в прокариотических, или эукариотических клетках-хозяевах. Рассмотрена экспрессия антител в эукариотических клетках, например, клетках-хозяевах млекопитающего, дрожжах или нитевидных грибах, поскольку в таких эукариотических клетках, и в частности, клетках млекопитающих, более вероятны (по сравнению с прокариотическими клетками) сборка и секреция иммунологически активного антитела с правильной укладкой. Было опубликовано, что прокариотическая экспрессия генов антител является неэффективной для получения большого выхода активного антитела (Boss, M. A. and Wood, C. R., 1985 Immunology Today 6:12-13).

Подходящими клетками-хозяевами для клонирующих или экспрессирующих векторов, кодирующих антитела по изобретению, являются прокариотические, дрожжевые или высшие эукариотические клетки. Подходящие прокариотические клетки включают зубактерии, например, энтеробактерии, такие как *Escherichia*, например, *E.coli* (например, ATCC 31, 446; 31, 537; 27,325), рода *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, рода *Serratia*, например, *Serratia marcescens*, и *Shigella*, а также бактерии класса *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis* (см. DD 266710), рода *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*, и рода *Streptomyces*. Среди клеток-хозяев дрожжей или грибов предполагаются также *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluveromyces* (например, ATCC 16,045; 12,424; 24178; 56,500), *Yarrowia* (EP402, 226), *Pichia pastoris* (EP183070, см. также Peng et al. (2004), J Biotechnol; 108:185-192), *Candida*, *Trichoderma reesei* (EP244234), *Penicillium*, *Tolypocladium*, и клетки-хозяева рода *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

Несмотря на то, что прокариотические и дрожжевые клетки-хозяева конкретно предполагаются по изобретению, предпочтительными, однако, клетками-хозяевами по настоящему изобретению являются высшие эукариотические клетки.

Таким образом, в одном из аспектов настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей один или несколько клонирующих или экспрессирующих векторов, содержащих полинуклеотиды, как описано в настоящем документе.

В другом аспекте изобретение относится к стабильно трансформированной или трансфицированной клетке-хозяину, содержащей один или несколько полинуклеотидов, как описано в настоящем документе.

Вариант осуществления 95: стабильно трансформированная клетка-хозяин, содержащая вектор, кодирующий тяжелую цепь и/или легкую цепь выделенного антитела или его фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-88. Предпочтительно такие клетки-хозяева содержат первый вектор, кодирующий легкую цепь, и второй вектор, кодирующий указанную тяжелую цепь.

Подходящие высшие эукариотические клетки-хозяева включают клетки млекопитающих, такие как COS-1 (ATCC No.CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), линия почки эмбриона человека 293, клетки почки детеныша хомячка (BHK) (ATCC CRL.1632), BHK570 (ATCC NO: CRL 10314), 293 (ATCC NO.CRL 1573), клетки яичника китайского хомяка CHO (например, CHO-K1, ATCC NO: CCL 61, линия клеток

DHFR-CHO, такая как DG44 (см. Urlaub et al. (1986), *Somatic Cell Mol. Genet.* 12, 555-556)), в частности те линии клеток CHO, которые адаптированы для суспензионной культуры, клетки Сертоли мыши, клетки почки обезьяны, клетки почки африканской зеленой мартышки (ATCC CRL-1587), клетки HELA, клетки почки собаки (ATCC CCL 34), клетки легкого человека (ATCC CCL 75), клетки Нер G2 и миеломы или лимфомы, например, NSO (см. US5807715), Sp2/0, YO.

Предпочтительно клетки-хозяева млекопитающего для экспрессирования связывающей молекулы по изобретению включают линии клеток млекопитающих с недостаточной экспрессией гена FUT8, например, как описано в US6946292.

Клетки-хозяева, трансформированные с помощью векторов, кодирующих связывающие молекулы, можно культивировать любым способом, известным специалистам в данной области. Клетки-хозяева можно культивировать во вращающихся флаконах, роллерных флаконах или системах полых волокон, но для крупномасштабного производства предпочтительно использовать реакторы с мешалкой, в частности, для суспензионных культур. Предпочтительно реакторы с мешалкой адаптированы для аэрации с использованием, например, распределителей, перегородок или лопастных мешалок с низкой скоростью сдвига. Для барботажных колонок и реакторов с подачей воздуха можно использовать прямую аэрацию пузырьками воздуха или кислорода. В тех случаях, когда клетки-хозяева культивируют в бессывороточных средах, предпочтительно, чтобы данные среды были дополнены агентом, защищающим клетки, таким как Pluronic F-68, для содействия предотвращению клеточного повреждения в результате процесса аэрации. В зависимости от характеристик клетки-хозяина можно использовать или микроносители в качестве ростовых субстратов для якорь-зависимых клеточных линий, или клетки можно адаптировать к суспензионной культуре (что является типичным). При культивировании клеток-хозяев, особенно клеток-хозяев позвоночных, можно использовать различные режимы работы, такие как культивирование с подпиткой, циклическая периодическая обработка (см. Drapeau et al. (1994), *Cytotechnology*, 15: 103-109), продленная периодическая обработка или перфузируемая культура. Несмотря на то, что рекомбинантно трансформированные клетки-хозяева млекопитающих можно культивировать в среде, содержащей сыворотку, такую как эмбриональная телячья сыворотка (FCS), предпочтительно культивирование таких клеток-хозяев в синтетических бессывороточных средах, таких как описано в публикации Keen et al. (1995), *Cytotechnology* 17:153-163, или коммерчески доступных средах, таких как ProCHO-CDM или Ultra-CHO(TM) (Cambrex NJ, USA), дополненных при необходимости источником энергии, таким как глюкоза, и синтетическими факторами роста, такими как рекомбинантный инсулин. Для бессывороточного культивирования клеток-хозяев может потребоваться адаптация этих клеток к росту в бессывороточных условиях. Один из подходов адаптации состоит в культивировании таких клеток-хозяев в среде, содержащей сыворотку, и повторной замене 80% культуральной среды на бессывороточную среду для того, чтобы клетки-хозяева научились адаптироваться к бессывороточным условиям (см., например, Scharfenberg K et al. (1995), in *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E.G. et al eds), pp619-623, Kluwer Academic publishers).

Связывающие молекулы по изобретению, секретированные в среду, могут быть выделены и очищены с использованием различных методов для обеспечения степени очистки, подходящей для предполагаемого применения. Например, использование выделенных антител по изобретению для лечения пациентов-людей обычно требует по меньшей мере 95%-ной очистки, более типично 98%-ной или 99%-ной или еще более высокой степени очистки (по сравнению с неочищенной средой для культивирования). В первом случае клеточный дебрис из культуральных сред обычно удаляют с использованием центрифугирования, с последующей стадией очистки супернатанта с использованием, например, микрофильтрации, ультрафильтрации и/или глубокой фильтрации. Доступны и многие другие методы, такие как диализ и электрофорез в геле, и хроматографические методы, такие как аффинная хроматография с гидроксипатитом (НА) (необязательно включающая систему аффинного мечения, такую как полигистидин) и/или хроматография с гидрофобным взаимодействием (ННС, см. US5429746). В одном из вариантов осуществления антитела по изобретению после различных стадий очистки иммобилизуют с использованием аффинной хроматографии с белком А или G, с последующими дополнительными хроматографическими стадиями, такими как ионообменная и/или НА-хроматография, анионо- или катионообменная хроматография, эксклюзионная хроматография и осаждение сульфатом аммония. Как правило, также используют стадии удаления различных вирусов (например, нанофильтрация с использованием, например, фильтра DV-20). После этих различных стадий получают очищенный (предпочтительно моноклональный) препарат, содержащий по меньшей мере 75 мг/мл или более, например, 100 мг/мл или более выделенного антитела по изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, который, таким образом, образует воплощение изобретения. Соответственно, такие препараты по существу не содержат агрегированных форм антител по изобретению.

Бактериальные системы можно использовать для экспрессирования неиммуноглобулиновых связывающих молекул, описанных выше. Бактериальные системы также, в частности, подходят для экспрессирования фрагментов выделенных антител. Такие фрагменты локализируются внутриклеточно или в пределах периплазмы. Нерастворимые периплазматические белки можно экстрагировать и свертывать для образования активных белков способами, известными специалистам в данной области, см. Sanchez et al.

(1999), J. Biotechnol. 72, 13-20 и Cu pit PM et al. (1999), Lett Appl Microbiol, 29, 273-277.

Таким образом, в одном из аспектов настоящее изобретение предлагает способ получения связывающей молекулы, которая связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), включающий культивирование клетки-хозяина в условиях, подходящих для получения связывающей молекулы, где клетка-хозяин содержит вектор, как описано в настоящем документе.

Вариант осуществления 95: способ получения антитела человека или его фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-88, включающий культивирование клетки-хозяина в условиях, подходящих для получения связывающей молекулы, где клетка-хозяин содержит вектор, как описано в настоящем документе.

6. Фармацевтические композиции.

Изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим связывающую молекулу, которая связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и где связывающая молекула не является IL-18BP и фармацевтически приемлемым носителем.

Вариант осуществления 96: фармацевтические композиции, содержащие антитело человека или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-88 и фармацевтически приемлемый носитель.

Композиции могут дополнительно содержать другие терапевтические средства, подходящие для лечения или профилактики заболевания или расстройства человека, отмеченного ниже. Фармацевтические носители улучшают или стабилизируют композицию, или способствуют получению композиции.

Фармацевтически приемлемые носители включают растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства замедления абсорбции и т.п., которые являются физиологически совместимыми.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить различными известными в данной области способами. Путь и/или способ введения варьируется в зависимости от необходимых результатов. Предпочтительным введением является внутривенное, внутримышечное, интраперитонеальное или подкожное введение, или введение вблизи сайта мишени. Фармацевтически приемлемый носитель должен быть подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения активное соединение (в частности, химические структурные единицы с низкой молекулярной массой) может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Композиция должна быть стерильной и жидкой. Подходящее жидкое состояние можно сохранить, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем сохранения необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях в композицию предпочтительно включать средства придания изотоничности, например, сахара, полиспирты, такие как маннит или сорбит, и хлорид натрия. Длительной абсорбции инъектируемых композиций можно достичь приблизительно за счет включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, моностеарата алюминия или желатина.

Фармацевтические композиции по изобретению можно получать в соответствии со способами, хорошо известными и стандартно практикуемыми в данной области. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; and Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Фармацевтические композиции предпочтительно получают при условиях надлежащей производственной практики (GMP). Обычно в фармацевтических композициях по изобретению используют терапевтически эффективную дозу или действующую дозу антитела по изобретению, описываемого в настоящем документе. Их обычно включают в состав фармацевтически приемлемых лекарственных форм с помощью общепринятых способов, известных специалистам в данной области. Режимы дозирования корректируют для обеспечения оптимально необходимой ответной реакции (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить единичный болюс, можно вводить несколько дробных доз в течение продолжительного периода, или дозу можно пропорционально снижать или увеличивать, как указывает острота положения при терапии. Особенно предпочтительно получение парентеральных композиций в стандартной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозирования. Стандартная лекарственная форма в рамках изобретения относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для индивидуумов, которым необходимо лечение; каждая единица содержит predetermined количество активного соединения, рассчитанного для достижения необходимого терапевтического эффекта совместно с необходимым фармацевтическим носителем.

Фактические уровни дозирования активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться для получения количества активного ингредиента, являющегося эффективным для достижения необходимого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсичного воздействия на пациента. Выбранный уровень дозирования зависит от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций по настоящему изобретению, или их сложного эфира, соли или амида, способ введения, время введения, скорость экскреции конкретного используемого соединения, длительность лечения,

другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, массу, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни (анамнез) пациента, получающего лечение, и подобные факторы.

Врач может начать с более низкого уровня дозирования антител по изобретению, используемых в фармацевтической композиции, чем требуется для достижения необходимого терапевтического эффекта, и постепенно повышать дозу до получения желаемого действия. Как правило, эффективные дозы композиций по настоящему изобретению для лечения фиброзирующего заболевания или расстройства, описываемого в настоящем документе, варьируются в зависимости от многих различных факторов, включая способ введения, целевой сайт, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, другие вводимые лекарственные средства и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Лечебные дозы необходимо титровать для оптимизации безопасности и эффективности. Для введения антитела диапазоны доз составляют приблизительно от 0,0001 до 100 мг/кг и более, обычно от 0,01 до 5 мг/кг, от массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела, или находиться в пределах диапазона 1-10 мг/кг. Иллюстративная схема лечения предусматривает введение один раз в две недели или один раз в месяц, или один раз в 3-6 месяцев.

Связывающие молекулы по изобретению, в частности, антитела и их фрагменты, как правило, вводят время от времени. Интервалы между единичными дозами могут составлять неделю, месяц или год. Интервалы могут быть нерегулярными, как показывает измерение уровня терапевтического белка в крови пациента. В некоторых способах дозу корректируют для достижения концентрации антитела в плазме, составляющей 1-1000 мкг/мл и в некоторых способах 25-300 мкг/мл. Альтернативно, антитела по изобретению можно вводить в виде состава длительного высвобождения, в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота введения варьируются в зависимости от времени полужизни антитела у пациента. Как правило, гуманизированные антитела показывают более длительный период полужизни, чем химерные антитела и не человеческие антитела. Дозировка и частота введения может варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактическом применении вводят относительно низкую дозу при относительно нечастых интервалах в течение длительного периода времени. Лечение некоторых пациентов продолжается в течение всей оставшейся жизни. При терапевтическом применении иногда требуется относительно высокая доза при относительно коротких интервалах до снижения или прекращения прогрессирования заболевания, и предпочтительно до момента появления у пациента частичного или полного улучшения состояния симптомов заболевания. В дальнейшем, пациенту можно вводить профилактический режим дозирования.

Фармацевтическая композиция может содержать (например, в качестве единственного терапевтически активного ингредиента) связывающую молекулу, которая связывается с IL18 (например, специфически связывается) и не связывает комплекс IL-18/IL-18 связывающего белка (IL-18BP), где связывающая молекула не является IL-18BP, где связывающая молекула выбрана из: выделенного антитела, фрагмента выделенного антитела, антитела с единичным варибельным доменом, би- или полиспецифического антитела, поливалентного антитела, антитела с двойным варибельным доменом, иммуноконъюгата, молекулы фибронектина, аднектина, дарпина, авимера, аффитела, антикалина, аффилина, миметика эпитопа белка или их сочетаний, и где композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель.

Обычно композиция представлена в форме для внутривенного, ингаляционного или подкожного введения. В других вариантах осуществления композиция может быть в лиофилизированной форме.

Предпочтительно связывающей молекулой является антитело, предпочтительно моноклональное интактное антитело (например, человеческое, гуманизированное или химерное) или его фрагмент, как описано в настоящем документе.

Вариант осуществления 97: фармацевтическая композиция содержит (например, в качестве единственного терапевтически активного ингредиента) антитело или его фрагмент, которые связывают IL18 (например, специфически связывают) и не связывают комплекс IL-18/IL-18 связывающего белка (IL-18BP), где указанное антитело содержит:

- (a) CDRH1 с SEQ ID NO: 3;
- (b) CDRH2 с SEQ ID NO: 9;
- (c) CDRH3 с SEQ ID NO: 5;
- (d) CDRL1 с SEQ ID NO: 6;
- (e) CDRL2 с SEQ ID NO: 7 и
- (f) CDRL3 с SEQ ID NO: 8.

Вариант осуществления 98: фармацевтическая композиция по варианту осуществления 97, где антитело конкурирует с мышинным антителом 125-2Н за связывание IL-18.

Вариант осуществления 99: фармацевтическая композиция содержит (например, в качестве единственного терапевтически активного ингредиента) антитело или его фрагмент, которые связывают IL18 (например, специфически связывают) и не связывают комплекс IL-18/IL-18 связывающего белка (IL-18BP), где указанное антитело содержит:

- (a) CDRH1 с SEQ ID NO: 3;

- (b) CDRH2 с SEQ ID NO: 10;
- (c) CDRH3 с SEQ ID NO: 5;
- (d) CDRL1 с SEQ ID NO: 6;
- (e) CDRL2 с SEQ ID NO: 7 и
- (f) CDRL3 с SEQ ID NO: 8.

Вариант осуществления 100: фармацевтическая композиция содержит (например, в качестве единственного терапевтически активного ингредиента) антитело или его фрагмент, которые связывают IL18 (например, специфически связывают) и не связывают комплекс IL-18/IL-18 связывающего белка (IL-18BP),

где указанное антитело содержит:

- (a) CDRH1 с SEQ ID NO: 3;
- (b) CDRH2 с SEQ ID NO: 13;
- (c) CDRH3 с SEQ ID NO: 5;
- (d) CDRL1 с SEQ ID NO: 6;
- (e) CDRL2 с SEQ ID NO: 7 и
- (f) CDRL3 с SEQ ID NO: 8.

Вариант осуществления 101: фармацевтическая композиция по варианту осуществления 100, где антитело конкурирует с мышинным антителом 125-2H за связывание IL-18.

Вариант осуществления 102: фармацевтическая композиция содержит (например, в качестве единственного терапевтически активного ингредиента) антитело или его фрагмент, которые связывают IL18 (например, специфически связывают) и не связывают комплекс IL-18/IL-18 связывающего белка (IL-18BP), где указанное антитело содержит:

- (a) CDRH1 с SEQ ID NO: 106;
- (b) CDRH2 с SEQ ID NO: 107;
- (c) CDRH3 с SEQ ID NO: 108;
- (d) CDRL1 с SEQ ID NO: 109;
- (e) CDRL2 с SEQ ID NO: 110 и
- (f) CDRL3 с SEQ ID NO: 111.

Вариант осуществления 103: фармацевтическая композиция содержит (например, в качестве единственного терапевтически активного ингредиента) антитело, которое связывает IL18 (например, специфически связывает) и не связывает комплекс IL-18/IL-18 связывающего белка (IL-18BP), где указанное антитело содержит:

- a) переменный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 14 и переменный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 16, или
- b) переменный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 25 и переменный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 16, или
- c) переменный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 28 и переменный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 16, или
- d) переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 18 и переменный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 20, или
- e) переменный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 37 и переменный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 20, или
- f) переменный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 40 и переменный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 20, или
- g) переменный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 112 и переменный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 114.

Вариант осуществления 104: фармацевтическая композиция по варианту осуществления 103, где указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 14 и переменный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 16 или переменный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 18 и переменный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 20.

Вариант осуществления 105: фармацевтическая композиция по варианту осуществления 104, где антитело конкурирует с мышинным антителом 125-2H за связывание IL-18.

Вариант осуществления 106: фармацевтическая композиция содержит (например, в качестве единственного терапевтически активного ингредиента) антитело, которое связывает IL18 (например, специфически связывает) и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), где указанное антитело содержит:

- a) переменный домен тяжелой цепи, который может быть кодирован выделенным полинуклеотидом, являющимся идентичным по меньшей мере на 90% (например, 95% или более, а именно 96, 97, 98 или 99%) выделенному полинуклеотиду, кодирующему SEQ ID NO: 14, или 18, или 25, или 28, или 37, или 40, или 112, и

- b) переменный домен легкой цепи, который может быть кодирован выделенным полинуклеотидом, являющимся идентичным по меньшей мере на 90% (например, 95% или более, а именно 96, 97, 98

или 99%) выделенному полинуклеотиду, кодирующему SEQ ID NO: 16, или 20, или 114.

Вариант осуществления 107: фармацевтическая композиция содержит (например, в качестве единственного терапевтически активного ингредиента) антитело, которое связывает IL18 (например, специфически связывает) и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), где указанное антитело содержит:

- a) тяжелую цепь с SEQ ID NO: 43 и вариабельный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 45, или
- b) тяжелую цепь с SEQ ID NO: 47 и вариабельный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 45, или
- c) тяжелую цепь с SEQ ID NO: 50 и вариабельный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 45, или
- d) вариабельный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 53 и вариабельный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 160, или
- e) вариабельный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 100 и вариабельный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 160, или
- f) вариабельный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 158 и вариабельный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 160, или
- g) вариабельный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 116 и вариабельный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 118.

Вариант осуществления 108: фармацевтическая композиция по варианту осуществления 107, где антитело содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 43 и вариабельный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 45 или вариабельный домен тяжелой цепи с SEQ ID NO: 158 и вариабельный домен легкой цепи с SEQ ID NO: 160.

Вариант осуществления 109: фармацевтическая композиция по варианту осуществления 108, где антитело конкурирует с мышинным антителом 125-2Н за связывание IL-18.

Вариант осуществления 110: фармацевтическая композиция содержит (например, в качестве единственного терапевтически активного ингредиента) антитело, которое связывает IL18 (например, специфически связывает) и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), где указанное антитело содержит:

- a) тяжелую цепь, которая может быть кодирована выделенным полинуклеотидом, являющимся идентичным по меньшей мере на 90% (например, 95% или более, а именно 96, 97, 98 или 99%) выделенному полинуклеотиду, кодирующему SEQ ID NO: 43, или 47, или 50, или 53, или 100, или 116, или 158, и
- b) легкую цепь, которая может быть кодирована выделенным полинуклеотидом, являющимся идентичным по меньшей мере на 90% (например, 95% или более, а именно 96, 97, 98 или 99%) выделенному полинуклеотиду, кодирующему SEQ ID NO: 45, или 160, или 118.

7. Клиническое применение.

Было показано, что экспрессия IL-18 повышается при нескольких аутоиммунных, сердечно-сосудистых и воспалительных заболеваниях.

Таким образом, связывающие молекулы по изобретению, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и где связывающие молекулы не являются IL-18BP, можно использовать в терапии.

Вариант осуществления 110: антитело по любому из вариантов осуществления 1-88 для применения в терапии.

В одном из аспектов настоящего изобретения представлен способ лечения и/или профилактики аутоиммунных заболеваний, включая ревматоидный артрит (РА), ювенильный артрит с системным началом (SOJA), системный ювенильный идиопатический артрит (сЮИА), анкилозирующий спондилит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (АЛПС), болезнь Бехчета, болезнь Бергера (IgA-нефропатия), буллезный пемфигоид, синдром Черджа-Строса, колит, болезнь Крона (БК), диабет 1 типа, диабет 2 типа, синдром Шегрена (СШ), реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ), гломерулонефрит, волчанку, рассеянный склероз (РС), псориаз, ревматическую лихорадку, саркоидоз, склеродермию, болезнь Стилла, развивающуюся у взрослых (АОСД), системную красную волчанку (СКВ), язвенный колит, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (ГЛГ, также известный как гематофагоцитарный синдром, синдром активации макрофагов), семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (FHL) и другие синдромы иммунодефицита, гигантоклеточный артериит (ГТА), ишемическую болезнь сердца (CAD), коронарную васкулопатию (CV), острые коронарные синдромы (ОКС), застойную сердечную недостаточность (ЗНС), атеросклероз, артериосклероз, инфаркт миокарда (ИМ), кардиоренальный синдром (КРС), острую почечную недостаточность (ОПН), диабетическую нефропатию, резистентность к инсулину, ожирение и метаболический синдром (МС), заболевания легких, включая саркоидоз легкого, в частности, саркоидоз с легочным фиброзом, астму, особенно тяжелую астму, увеит, географическую атрофию, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), кистозный фиброз, респираторный дистресс-синдром взрослых (ОРДС), острое повреждение легких (ОПЛ), вентиляционное повреждение легких (VILI), легочную артериальную гипертензию (ЛАГ), болезнь Альцгеймера (AD) и сепсис и любые их сочетания, причем способ включает введение пациенту-млекопитающему терапевтически эффективного количества связывающей молекулы (например, антитела) или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, которая связывает IL-18 и

не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

Вариант осуществления 111: способ лечения и/или профилактики саркоидоза, в частности, саркоидоза легкого, гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ), семейного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (FHL), хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), болезни Стилла, развивающейся у взрослых (AOSD), атеросклероза, системного ювенильного идиопатического артрита (сЮИА), тяжелой астмы, увеита, географической атрофии, гигантоклеточного артериита (ГТА), диабета 1-го типа, диабета 2-го типа и любого их сочетания у пациента-млекопитающего, включающий введение пациенту-млекопитающему терапевтически эффективного количества связывающей молекулы (например, антитела) или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, которая связывает IL-18 и не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и где связывающая молекула не является IL-18BP.

Вариант осуществления 112: связывающие молекулы или фармацевтические композиции по изобретению, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и где связывающая молекула не является IL-18BP, для применения в лечении и/или профилактике саркоидоза, в частности, саркоидоза легкого, гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ), семейного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (FHL), хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), болезни Стилла, развивающейся у взрослых (AOSD), атеросклероза, системного ювенильного идиопатического артрита (сЮИА), тяжелой астмы, увеита, географической атрофии, гигантоклеточного артериита (ГТА), диабета 1-го типа, диабета 2-го типа и любого их сочетания у пациента-млекопитающего.

Вариант осуществления 113: способ лечения и/или профилактики аутоиммунных заболеваний, включая ревматоидный артрит (РА), ювенильный артрит с системным началом (SOJA), системный ювенильный идиопатический артрит (сЮИА), анкилозирующий спондилит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (АЛПС), болезнь Бехчета, болезнь Бергера (IgA-нефропатия), буллезный пемфигоид, синдром Черджа-Строса, колит, болезнь Крона (БК), диабет 1 типа, диабет 2 типа, синдром Шегрена (СП), реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ), гломерулонефрит, волчанку, рассеянный склероз (РС), псориаз, ревматическую лихорадку, саркоидоз, склеродермию, болезнь Стилла, развивающуюся у взрослых (AOSD), системную красную волчанку (СКВ), язвенный колит, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (ГЛГ, также известный как гемофагоцитарный синдром, синдром активации макрофагов), семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (FHL) и другие синдромы иммунодефицита, гигантоклеточный артериит (ГТА), ишемическую болезнь сердца (CAD), коронарную васкулопатию (CV), острые коронарные синдромы (ОКС), застойную сердечную недостаточность (ЗНС), атеросклероз, артериосклероз, инфаркт миокарда (ИМ), кардиоренальный синдром (КРС), острую почечную недостаточность (ОПН), диабетическую нефропатию, резистентность к инсулину, ожирение и метаболический синдром (МС), заболевания легких, включая саркоидоз легкого, в частности, саркоидоз с легочным фиброзом, астму, особенно тяжелую астму, увеит, географическую атрофию, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), кистозный фиброз, респираторный дистресс-синдром взрослых (ОРДС), острое повреждение легких (ОПЛ), вентиляционное повреждение легких (VILI), легочную артериальную гипертензию (ЛАГ), болезнь

Альцгеймера (AD) и сепсис и любые их сочетания, причем способ включает введение пациенту-млекопитающему терапевтически эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, как описано в любом одном из вариантов осуществления 1-88 или 96-110, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

Вариант осуществления 114: способ лечения и/или профилактики саркоидоза, в частности, саркоидоза легкого, гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ), семейного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (FHL), хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), болезни Стилла, развивающейся у взрослых (AOSD), атеросклероза, системного ювенильного идиопатического артрита (сЮИА), тяжелой астмы, увеита, географической атрофии, гигантоклеточного артериита (ГТА), диабета 1-го типа, диабета 2-го типа и любого их сочетания у пациента-млекопитающего, включающий введение пациенту-млекопитающему терапевтически эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, как описано в любом одном из вариантов осуществления 1-88 или 96-110, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP).

Вариант осуществления 115: антитело или фармацевтическая композиция, как описано в любом одном из вариантов осуществления 1-88 или 96-110, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и где связывающая молекула не является IL-18BP, для применения в лечении и/или профилактике саркоидоза, в частности, саркоидоза легкого, гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ), семейного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (FHL), хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), болезни Стилла, развивающейся у взрослых (AOSD), атеросклероза, системного ювенильного идиопатического артрита (сЮИА), тяжелой астмы, увеита, географической атрофии, гигантоклеточного артериита (ГТА), диабета 1-го типа, диабета 2-го типа и любого их сочетания у пациента-млекопитающего.

8. Диагностическое применение и наборы.

Одним из преимуществ связывающей молекулы или выделенного антитела или его фрагмента, как

описано в настоящем документе, является то, что они связывают IL-18, но не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), и то, что они не являются IL-18BP. Таким образом, связывающая молекула или выделенное антитело или его фрагмент, как описано в настоящем документе, способны только к детектированию свободного IL-18, не связанного с IL-18BP. Так как свободный IL-18 является биологически активной молекулой, сразу становится очевидным, что связывающая молекула, способная распознавать только такую единицу, может обеспечить различие между свободным IL-18 и IL-18, связанным с IL-18BP, который является неактивным. Кроме того, поскольку связывающие молекулы по изобретению не включают IL-18BP, как выделенный, так и нативный, они позволяют применение не только как терапевтических средств, но также средств во многих других вариантах применения, таких как диагностика или диагностический набор.

Таким образом, в другом аспекте настоящее изобретение относится к связывающим молекулам или выделенным антителам или их фрагментам, как описано в настоящем документе, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), где связывающая молекула не является IL-18BP, для применения в диагностике или для применения в диагностическом наборе.

Связывающие молекулы или выделенное антитело или его фрагмент, как описано в настоящем документе, можно использовать в комбинации с детектированием антител при проведении анализов ELISA, вестерн-блоттинга и т.д. и можно использовать не только для детектирования присутствия свободного IL-18, но также для измерения количества свободного IL-18.

Таким образом, в другом аспекте настоящее изобретение относится к связывающим молекулам или выделенным антителам или их фрагментам, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), где связывающая молекула не является IL-18BP, для применения в диагностике или для применения в детектировании и/или измерении присутствия и/или количества свободного IL-18 (т.е. IL-18, не связанного с IL-18BP) в образце.

В еще одном дополнительном аспекте настоящего изобретения представлен способ детектирования и/или измерения присутствия и/или количества свободного IL-18 (т.е. IL-18, не связанного с IL-18BP) в образце, где образцом необязательно является образец человека, где способ включает взаимодействие образца со связывающей молекулой или выделенным антителом или его фрагментом, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), где связывающая молекула не является IL-18BP.

В еще одном дополнительном аспекте настоящего изобретения представлен способ, включающий стадии:

а) взаимодействия образца, полученного от индивидуума (например, индивидуума с воспалительным заболеванием или расстройством), со связывающей молекулой или выделенным антителом или его фрагментом, как описано в настоящем документе, которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), где связывающая молекула не является IL-18BP;

б) измерения уровня свободного IL-18;

с) необязательно, измерения уровня общего содержания IL-18 и IL-18BP;

д) где стадии б) и с) можно проводить одновременно или последовательно, или в обратном порядке (например, стадию б) проводить перед стадией с) или стадию с) перед стадией б).

Образцом может быть образец, выделенный из организма млекопитающего, предпочтительно из организма человека. Выделенный образец может:

i) быть из доступного участка организма, например, слизистой оболочки носа, кожи, конъюнктивы, ротовой полости или горла, ануса, вагины, уретры, шейки матки; и или

ii) содержать жидкие или полужидкие (например, физиологическую жидкость или полужидкие, например, выделения, рвотную массу, секрет, экстреты, желудочный и/или кишечный сок, мокроту, кровь, сыворотку крови, плазму, мочу, слезы, синовиальную жидкость, семенную жидкость, секрет простаты, слюну, гомогенат или слизь ткани); и или

iii) содержать твердое вещество (например, образец стула, ткани или биопсии); и/или

iv) содержать культуру (например, культуру макрофагов);

Образцом может быть кровь человека или часть крови человека, такая как плазма.

Выделенный образец может быть предпочтительно выбран из цельной крови человека, макрофагов, полученных из моноцитов в крови человека, и макрофагов легкого человека.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к диагностическому набору, содержащему связывающую молекулу или выделенное антитело или его фрагмент (которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP), где связывающая молекула не является IL-18BP, и/или комплекс, содержащий IL-18 и эту связывающую молекулу, где набор необязательно содержит первое контрольное соединение.

Контрольным соединением является соединение, являющееся индикатором функционирования диагностического набора.

Контрольное соединение может быть положительным или отрицательным, и оно подтверждает правильность каких-либо результатов.

Первым контрольным соединением может быть свободный IL-18, и набор необязательно может со-

держат второе контрольное соединение, которым является мышиное антитело 125-2Н.

В другом аспекте настоящего изобретения представлено медицинское или диагностическое устройство, содержащее связывающую молекулу или выделенное антитело или его фрагмент (которые связывают IL-18 и не связывают комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка (IL-18BP)) и/или комплекс, где связывающая молекула не является IL-18BP, содержащий IL-18 и эту связывающую молекулу.

9. Примеры.

Примеры последовательностей антитела по настоящему изобретению, приведенные в настоящем документе, наряду с таблицей корреляции последовательностей, описаны в завершающей части описания настоящего изобретения.

9.1) Материалы.

Рекомбинантный IL-18 человека (генерированный в *E.coli* с использованием способа, описанного в публикации Liu et al. (2000), Cytokine 12 (10):1519-25).

Рекомбинантный IL18 яванского макака (генерированный в *E.coli* с использованием способа, описанного в патенте США № 6432678).

Рекомбинантный TNF α человека (R&D #210-TA).

Рекомбинантный IL-18-связывающий белок-IgG₁ человека Fc (hIL-18BP α -Fc, R&D Systems # 119-BP-100).

IgG₁ мыши против IL-18 человека (125-2H; R&D Systems # D044-3).

Антитело человека против лизоцима (Morphosys MOR03207).

Линия клеток KG-1 (ATCC #CCL-246).

Клеточная среда: RPMI 1640 (Invitrogen #31870), дополненная 10% эмбриональной телячьей сывороткой (Invitrogen #10108-157), 1% L-глутамином (Invitrogen #25030-03), 1% пенициллином/стрептомицином (Invitrogen #15140-148).

Плоскостонные 96-луночные планшеты, обработанные тканевой культурой (Costar #3596).

DuoSet ELISA анализ IFN- γ человека (R&D #DY285).

Микротитровочные планшеты Maxisorb (Sigma #M9410).

Гепарин (Sigma #H3393).

Рекомбинантный IL-12 человека (R&D Systems #219-IL-CF).

LPS (Sigma #L4516).

Пробирки Falcon (Corning #430829).

Ficoll-Paque TMPlus (GE Healthcare Life Sciences #17-1440-02).

Клетки KG-1 сохраняли в RPMI-1640 с добавлением 10% FBS, 1% L-глутамин и 1% пенициллина/стрептомицина при плотности от 2×10^5 до 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

9.2) Антитела и их фрагменты, отобранные для функционального анализа.

Антитела и их фрагменты получали с помощью фагового дисплея. Использованная библиотека фагмидов основана на концепции HuCAL[®] (Knappik, A. et al. (2000), J. Mol. Biol. 296, 57-86), в которой использована технология CysDisplayTM для отображения Fab на поверхности фага (WO 01/05950). Для повышения аффинности и биологической активности выбранных фрагментов антител области L-CDR3 и H-CDR2 оптимизировали параллельно посредством кассетного мутагенеза с использованием тринуклеотид-направленного мутагенеза (Virnekas, B et al. (1994), Nucleic acids Res 22, 5600-5607), в то время как каркасные области оставались неизменными. Антитела из различных родительских каркасов выбирали для конверсии IgG и функциональной характеристики. Эти антитела и их фрагменты показаны в табл. 1А.

Таблица 1А

ИgGs и Fabs, выбранные для функционального анализа

	Каркас
MOR08776	VL1/VH4
MOR10497	VL1/VH4
MOR10501	VL1/VH4
MOR10502	VL1/VH4
MOR8775	VL1/VH1
MOR9441	VL1/VH1
MOR9464	VL1/VH1
MOR9465	VL1/VH1
MOR9466	VL1/VH1
MOR10579	VL1/VH1
MOR10222	VL1/VH1
MOR13363	VK1/VH3
MOR13361	VK1/VH3
MOR13341	VK1/VH1
MOR13342	VK1/VH1
MOR13347	VK1/VH1

При составлении жидкого состава с антителом MOR9464 через некоторое время состав показал потерю активности. Была выдвинута гипотеза, что молекула может претерпеть модификации, которые повлияли на ее активность. MOR9464 инкубировали при температуре выше, чем физиологическая температура, для ускорения появления потери активности. Посредством комбинирования комплексных биофизических методов, включая масс-спектрометрию и обращенно-фазовую ВЭЖХ, выделяли две отчетливые, еще неизвестные формы MOR9464.

Некоторые модификации белка могут возникнуть во внеклеточных средах во время манипуляции *in vitro* и циклизации *in vivo*. Независимо от вида модификации, она может оказать существенное воздействие на свойства, относящиеся к фармацевтическим средствам на основе белка. Таким образом, чрезвычайно важно понять структурно-функциональные взаимоотношения этих модификаций. Внеклеточными модификациями являются модификации, возникающие вскоре после прохождения терапевтическими белками пути миграции, достижения ими клеточной поверхности, и их высвобождение происходит во внеклеточной среде с инкубированием в течение периода продуцирования. Они также включают модификации, возникающие во время манипуляции *in vitro*, такой как очистка и вхождение в состав в подходящих буферах, или даже циклизации *in vivo* (Zhong X. and Wright J.F., Int J of Cell Biol., 2013, 1-19). Наиболее типичным является протеолитический процессинг, и получаемые в результате внеклеточные модификации хорошо известны. Характеризация окисления единичных аминокислотных остатков может представлять трудности и может включать остатки метионина, а также остатки триптофана, цистеина, гистидина и тирозина. Образование N-концевого пироглутамата также является хорошо известной внеклеточной модификацией, в результате чего N-концевые остатки глутамина или глутамата легко могут циклизироваться со своей концевой группой с образованием пирролидонкарбоновой кислоты. Также известны дезамидирование остатков аспарагина и аспартата или изомеризация аспартата, не являющиеся хорошо изученными модификациями.

Если внеклеточные модификации возникают в конкретных областях антитела, то они могут оказать сильное влияние на функциональные характеристики антитела, такие как потеря активности. Если модификация возникает в CDR или очень близко к ней, она может оказать воздействие на способность антитела распознавать и/или специфически связывать его антиген.

Анализ последовательности MOR9464 проводили для определения потенциального сайта внеклеточных модификаций. Получали мутанты, представленные в табл. 1В.

Таблица 1В

Мутанты MOR9464/MOR10222

MOR9464_N30T
MOR9464_N30A
MOR9464_N30E
MOR9464_N30H
MOR9464_N30K
MOR9464_N30Q
MOR9464_N30G
MOR9464_N30V
MOR9464_N30Y
MOR9464_N30R
MOR9464_N30I
MOR9464_N30L
MOR9464_N30S
MOR10222_E1Q
MOR10222_E1Q_N30S
MOR10222_E1Q_N30D
MOR10222_E1Q_N30T
MOR10222_E1Q_N30S_M54Y
MOR10222_E1Q_N30S_M54N
MOR10222_E1Q_N30S_M54I (далее обозначаемый как MOR10222_N30S_M54I)
MOR10222_E1Q_S31T
MOR10222_E1Q_S31N
MOR10222_E1Q_S31A
MOR10222_E1Q_S31T_M54Y
MOR10222_E1Q_S31T_M54N
MOR10222_E1Q_S31T_M54I
MOR10222_E1Q_S31N_M54Y
MOR10222_E1Q_S31N_M54N
MOR10222_E1Q_S31N_M54I

В качестве возможного сайта модификации был рассмотрен аспарагин 30, расположенный рядом с H-CDR1 MOR9464, наряду с серином 31 в H-CDR1 и метионином 54 в H-CDR2. Неферментативное дезаминирование остатков аспарагина и глутамин до аспартата и глутамата происходит за счет гидролитической реакции и является зависимым от pH, температуры и ионной силы. Оно также зависит от аминокислотных остатков, предшествующих остаткам аспарагина и глутамин, с повышением скорости дезамидирования серином и треонином.

Большинство мутантов MOR10222_S31X, с или без метиониновой мутации, сильно агрегировали после продуцирования. По этой причине, эти мутанты далее не характеризовали.

9.3) Определение аффинности с использованием титрования равновесного раствора (SET).

Для определения K_D с помощью титрования равновесного раствора (SET) использовали мономерные фракции антител (анализируемые путем аналитической SEC).

Определение аффинности в растворе по существу проводили, как описано в литературе (Friguet B et al. (1985), J. Immunol Methods; 77(2):305-19). С целью повышения чувствительности и точности способа SET, его перевели с классического ELISA на технологию на основе электрохимической люминесценции (ECL) (Haenel C et al. (2005), Anal Biochem; 339 (1):182-4).

Антитела, специфичные к фрагменту (Fab)₂ козы против человека (Dianova) метили MSD SULFO-TAG™ NHS-Ester (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA) по инструкциям производителя. Эксперименты проводили в полипропиленовых планшетах для микротитрования и буфере на основе фосфатов для анализа. Немеченый IL-18 человека серийно разбавляли, начиная с концентрации, по меньшей мере в

10 раз превышающей ожидаемую K_D . Лунки без антигена использовали для определения значений $B_{\max}$; лунки с буфером для анализа использовали для определения фона. После добавления неизменного количества антитела или его фрагмента (например, 10 пМ конечной концентрации в 60 мкл конечного объема) смесь инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Концентрация использованных антител или их фрагментов была аналогичной или ниже ожидаемой K_D .

Планшеты MSD, покрытые стрептавидином, блокировали фосфатным буфером, содержащим БСА, в течение ночи. После блокировки планшета добавляли биотинилированный IL-18 человека и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем на эти планшеты переносили эквilibрированные образцы и инкубировали в течение короткого периода времени при комнатной температуре. После промывки меченное MSD SULFO-TAG детектированное антитело ((Fab)₂ козы против человека) добавляли к планшету MSD и инкубировали в течение короткого периода времени при комнатной температуре.

После промывки планшета и добавления буфера считывания T MSD с поверхностно-активным веществом, электрохемилуминесцентные сигналы детектировали с использованием Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA).

Данные оценивали с использованием специально разработанных подходящих по параметрам моделей программного обеспечения XLfit (IDBS). Для определения K_D молекул Fab использовали следующую подходящую по параметрам модель (согласно Haenel et al., 2005), измененную согласно Abraham et al., 1996):

$$y = B_{\max} - \left(\frac{B_{\max}}{2[Fab]_i} \left([Fab]_i + x + K_D - \sqrt{([Fab]_i + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_i} \right) \right)$$

[Fab]_i: общая примененная концентрация Fab;

x: общая примененная концентрация растворимого антигена (участки связывания);

$B_{\max}$: максимальный сигнал Fab без антигена;

K_D : аффинность.

По существу, применяли одинаковый протокол для определения значений K_D для антител и фрагментов со следующими различиями: целые антитела добавляли к серии разведений антигена и давали отстояться в течение ночи при комнатной температуре. Затем образцы обрабатывали, как описано выше.

Для оценки данных, т.е. определения K_D молекул IgG, использовали следующую подходящую по параметрам модель для IgG (измененную согласно Piehler et al., 1997):

$$y = \frac{2B_{\max}}{[IgG]} \left(\frac{[IgG]}{2} - \frac{\left(\frac{x + [IgG] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{(x + [IgG] + K_D)^2}{4} - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right)$$

[IgG]: общая примененная концентрация IgG;

x: общая примененная концентрация растворимого антигена (участки связывания);

$B_{\max}$: максимальный сигнал IgG без антигена;

K_D : аффинность.

Значения аффинности антител к IL-18 или их фрагментов определяли в растворе с использованием условий анализа, описанных выше, и они указаны в табл. 2А (столбец 2). В том случае, когда также тестировали IL-18 от яванского макака (см. IL-18), полученная в результате K_D указана в скобках.

9.4) Ингибирование высвобождения IFN- γ из МКПК, стимулированных IL-18 человека.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из гепаринизированной цельной крови человека с использованием стандартных способов. В кратком изложении, разбавленную кровь, содержащую гепарин (15 U/мл) в качестве антикоагулянта, наносили слоями на Ficoll-Paque™ Plus и центрифугировали (800×g, 20 мин, 18°C). МКПК собирали с интерфазы на границе раздела плазма-фиколл и промывали дважды (600×g, 10 мин, 4°C) перед ресуспендированием в среде.

МКПК ресуспендировали в среде и наносили на 96-луночный планшет для культур клеток для получения конечной плотности клеток, составляющей $1,5 \times 10^6$ /мл (в конечном объеме анализа, составляющем 200 мкл). Для обеспечения распознавания антителом и его фрагментом по изобретению нативного IL-18, который может быть гликозилирован, МКПК стимулировали с помощью LPS и IL-12, что индуцирует IFN- γ посредством IL-18-зависимого аутокринного ответа.

Клетки стимулировали с помощью 3 нМ рекомбинантного IL-18 человека вместе с IL-12 (1 нг/мл) или LPS (3 мкг/мл) вместе с IL-12 (10 нг/мл) для индуцирования секретирования нативного белка IL-18 (все конечные концентрации). В случае рекомбинантного IL-18 человека, выбранную концентрацию предварительно определяли как приблизительную EC_{80} в этом анализе. В случае нативного IL-18, LPS стимулирует продуцирование IL-18, в то время как IL-12 повышает экспрессию рецептора IL-18 (Yoshimoto T et al. (1998), J. Immunol; 161(7):3400-7). Степень IL-18-зависимости в этом анализе определяли путем включения высокоспецифичного белка, IL-18-связывающего белка-IgG₁ человека Fc (hIL-18BP_a-Fc) в качестве положительного контроля (точечная линия на фиг. 3 (A-D)).

Для оценки их активности и эффективности антителам и их фрагментам предварительно давали отстояться в течение 30 мин с IL-12 и LPS (природные условия) или IL-12 и IL-18 (рекомбинантные условия) перед применением на клетки с конечной концентрацией от 0,1 до 300 нМ. Контрольное антитело MOR03207 против лизоцима использовали в качестве отрицательного контроля.

Из каждой экспериментальной группы среднюю величину $\pm$ стандартная ошибка средней величины (где $n=3$ или более) определяли, исходя из $n=2-5$ лунок.

Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 24 ч после обработки, затем супернатант собирали посредством центрифугирования (1200 об/мин, в течение 5 мин) и хранили при -20°C для последующего анализа. Уровни белка IFN- γ оценивали с использованием ELISA в соответствии с инструкциями производителя.

Все антитела и их фрагменты дозозависимо ингибировали продуцирование IFN- γ с аналогичным уровнем эффективности, достигаемым при самой высокой концентрации, как отмечено для рекомбинантного IL-18BP α -Fc (табл. 2А, столбцы 5-6, табл. 2В столбец 2 и фиг. 3 (А-Д), где эффективность IL-18BP α обозначена точечной линией). Контрольное антитело, MOR03207 (контрольное антитело против лизоцима), не ингибировало ответную реакцию IL-18. Гуманизирование антител (например, MOR10579 из MOR09441 и MOR10222) из MOR09464 не изменило в существенной степени их нейтрализующую способность. Мутанты MOR9464 и MOR10222, в частности, MOR9464_N30K и MOR10222_N30S_M54I, не обладали сопоставимой нейтрализующей способностью по отношению к антителам дикого типа.

Таблица 2А

Значения K_D, аффинности IL-18 и значения IC₅₀ (нМ) для ингибирования высвобождения IFN γ , индуцированного рекомбинантным (гетерологичным) IL-18 человека (1 нМ) и нативным IL-18

	K _D (SET, нМ) IL-18 человека	IL-18 человека в KG-1	IL-18 яванского макака в KG-1	IL-18 человека в МКПК	нативный IL-18 в МКПК
MOR08776	38	18	ND	50,8	5,9
MOR010497	2	0,3	0,3	5,8 $\pm$ 2,2	1,8 $\pm$ 0,6
MOR010501	1	0,3	0,2	6,3 $\pm$ 1,5	1,3 $\pm$ 0,5
MOR010502	4	0,4	0,2	6,3 $\pm$ 0,7	2,3 $\pm$ 1,1
MOR08775	65	68	22	9,2	0,7
MOR09465	6	0,3	1,8	0,6	0,89 $\pm$ 0,3
MOR09466	5	0,4	5,6	1,2	2,1 $\pm$ 0,6
MOR09441	1	0,6 $\pm$ 0,1	16,4 $\pm$ 7,1	2,5 $\pm$ 1,0	0,45 $\pm$ 0,1
MOR09464	3	0,8 $\pm$ 0,2	8,3 $\pm$ 1,6	1,3 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,03
MOR010579	N/A	0,8 $\pm$ 0,2	9,8 $\pm$ 5,3	1,9 $\pm$ 0,6	0,3 $\pm$ 0,02
MOR010222	N/A	0,7 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 2,0	2,3 $\pm$ 0,5	0,22 $\pm$ 0,03
IL-18BP-Fc	N/A	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,5	0,17 $\pm$ 0,02
MOR09464_N30K	2 $\pm$ 1 (20 $\pm$ 10)	0,36 $\pm$ 0,15	4,7		0,2 $\pm$ 0,14
MOR1022_N30S_M54I	3 $\pm$ 2 (30 $\pm$ 0)	4,21 $\pm$ 0,14	8,12		0,05 $\pm$ 0,03
MOR13363	10 $\pm$ 0 (10 $\pm$ 0)	0,49 $\pm$ 0,9*	0,28 $\pm$ 0,16 [#]		0,18 $\pm$ 0,1
MOR13361	7 $\pm$ 3 (6 $\pm$ 1)	0,41*	0,13 [#]		0,5 $\pm$ 0,01
MOR13341	3 $\pm$ 2 (30 $\pm$ 0)	0,13 $\pm$ 0,08*	2,8 $\pm$ 0,26 [#]		0,8 $\pm$ 0,7
MOR13342	N/A	0,11 $\pm$ 0,03*	2,9 [#]		0,5 $\pm$ 0,4
MOR13347	N/A	0,12 $\pm$ 0,07*	2,8 $\pm$ 0,3 [#]		0,5 $\pm$ 0,4

N/A=отсутствуют данные; *концентрация IL-18 человека=[0,5 нМ]; [#]концентрация IL-18 яванского макака=[0,2 нМ].

Таблица 2В

Значения IC_{50} (нМ) для ингибирования высвобождения $IFN\gamma$, индуцированного рекомбинантным (гетерологичным) IL-18 человека (1 нМ), нативным IL-18

Наименование	IL-18 человека в KG-1	нативный IL-18 в МКПК
MOR1022_N30S	3,3 $\pm$ 2,1	0,05 $\pm$ 0,00
MOR1022_N30S_M54Y	4,8 $\pm$ 0,3	0,09 $\pm$ 0,01
MOR1022_N30S_M54N	5,2 $\pm$ 4,4	0,03 $\pm$ 0,02
MOR1022_N30S_M54I	4,2 $\pm$ 1,4	0,05 $\pm$ 0,03*
MOR09464_N30T	0,31 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,09
MOR09464_N30E	0,49 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,05
MOR09464_N30H	0,23 $\pm$ 0,11	0,10 $\pm$ 0,05
MOR09464_N30K	0,36 $\pm$ 0,15	0,20 $\pm$ 0,14
MOR09464_N30Q	0,22 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,14
MOR09464_N30G	0,54 $\pm$ 0,06	0,11 $\pm$ 0,07
MOR09464_N30V	0,29 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,02
MOR09464_N30Y	0,23 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01
MOR09464_N30R	0,47 $\pm$ 0,49	0,04 $\pm$ 0,01
MOR09464_N30I	0,32 $\pm$ 0,09	0,11 $\pm$ 0,06
MOR09464_N30L	0,23 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,04

(n=2; среднее $\pm$ стандартное отклонение) n=3 среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего * n=2, среднее $\pm$ стандартное отклонение.

9.5) Ингибирование высвобождения $IFN\gamma$ из клеток KG-1, стимулированных IL-18.

Антитела к IL-18 и их фрагменты анализировали на их способность ингибировать высвобождение $IFN\gamma$ из клеток KG-1, стимулированных IL-18. При отсутствии антагониста IL-18 способствует максимальной стимуляции высвобождения $IFN\gamma$ в присутствии дополнительного стимула, такого как $TNF\alpha$ и IL-12, посредством положительной регуляции рецепторов IL-18 (Nakamura S. et al. (2000), Leukemia; 14(6):1052-9). Ингибирующую активность антител и фрагментов оценивали относительно 1 нМ IL-18 человека или яванского макака (если не указано иное), предварительно определенную как EC_{80} в этой системе на основе клеток.

Клетки KG-1 ресуспендировали в средах для культивирования и наносили на 96-луночный планшет для культур клеток для получения конечной плотности клеток, составляющей $0,3 \times 10^6$ /мл (в конечном объеме анализа, составляющем 200 мкл). Клетки стимулировали с помощью 1 нМ рекомбинантного IL-18 человека или яванского макака, а также $TNF\alpha$ (с конечной концентрацией 20 нг/мл). Концентрацию отобранного рекомбинантного IL-18 предварительно определяли как приблизительную EC_{80} в этом анализе.

Для оценки активности и эффективности этих антител, антителам и их фрагментам предварительно давали отстояться в течение 30 мин с $TNF\alpha$ и IL-18 (человека или яванского макака) перед применением на клетки с конечной концентрацией от 0,1 до 300 нМ. Контрольное антитело MOR03207 против лизоцима использовали в качестве отрицательного контроля.

Из каждой экспериментальной группы среднюю величину $\pm$ стандартная ошибка средней величины (при наличии таковой) определяли исходя из n=2-5 лунок.

Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 24 ч после обработки, затем супернатант собирали посредством центрифугирования ($885 \times g$ в течение 5 мин) и хранили при -20°C для последующего анализа. Уровни белка $IFN\gamma$ оценивали с использованием ELISA в соответствии с инструкциями производителя.

Все антитела и их фрагменты дозозависимо ингибировали продуцирование $IFN\gamma$, полного ингибирования достигали при самой высокой концентрации. Для аффинно-зрелых антител значения IC_{50} варьировались от 0,3-0,8 нМ в противоположность 0,8 нМ IL-18 человека, таким образом, представляя собой молярное отношение антитело:антиген не менее 1:1. Антитела (MOR08776, MOR010501, MOR010502) с каркасом VH4_3b проявили аналогичную активность по отношению к IL-18 как человека, так и яванского макака, в то время как антитела с каркасом VH1A_3 показали меньшую эффективность по отношению к IL-18 яванского макака (табл. 2, столбцы 3 и 4). Контрольное антитело, MOR03207, не ингибировало ответную реакцию IL-18.

9.6) Высвобождение INF- γ , индуцированное IL-18, в цельной крови человека.

Анализ цельной крови включает как присутствие, так и функцию эндогенного IL-18-связывающего белка, поскольку IL-18BP преимущественно генерируется селезенкой и систематически присутствует на уровне приблизительно 10-20 нг/мл у здоровых индивидуумов. IL-18BP связывается с высокой аффинностью с IL-18 и нейтрализует его активность и, таким образом, может накапливать антитела, распознающие доступные эпитопы этого комплекса.

Активность антител к IL-18 оценивали в гепаринизированной цельной крови человека, взятой от здорового добровольца. Все реагенты получали в двадцатикратной конечной необходимой концентрации с использованием бессывороточной среды. Клетки стимулировали с помощью или 7 нМ рекомбинантного IL-18 человека вместе с IL-12 (1 нг/мл), или LPS (10 мкг/мл) вместе с IL-12 (10 нг/мл) для индуцирования секретирования нативного белка IL-18 (все конечные концентрации). В случае рекомбинантного IL-18 человека, выбранную концентрацию предварительно определяли как приблизительную EC_{80} в этом анализе. В случае нативного IL-18, LPS стимулирует продуцирование IL-18, в то время как IL-12 повышает экспрессию рецептора IL-18, и степень IL-18-зависимости определяют посредством включения рекомбинантного IL-18-связывающего белка-IgG₁ человека Fc (hIL-18BP α -Fc) в качестве положительного контроля.

Для оценки активности и эффективности этих антител, антителам и их фрагментам предварительно давали отстояться в течение 30 мин с надлежащим стимулом перед применением на клетки с конечной концентрацией от 0,1 до 1000 нМ. Контрольное антитело MOR03207 против лизоцима использовали в качестве отрицательного контроля.

Стимулирующую смесь (+/- антитело или фрагмент) добавляли в каждую лунку 96-луночного микротитровочного стерильного планшета для тканевой культуры по 30 мкл, и затем добавляли 170 мкл гепаринизированной цельной крови в каждую лунку, до получения конечного объема в каждой лунке 200 мкл. Затем планшеты возвращали в увлажненный инкубатор (37°C). Спустя 24 ч планшеты центрифугировали (885 $\times$ g, 4°C, 5 мин) и супернатанты удаляли и оценивали на продуцирование hIFN- γ с использованием коммерчески доступного набора ELISA. Конечные данные получали в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего от 3-5 здоровых доноров-людей.

Все антитела и фрагменты дозозависимо ингибировали продуцирование IFN γ по отношению к любому стимулу. Полного ингибирования ответной реакции, индуцированного рекомбинантным IL-18, достигали при самой высокой концентрации, в то время как аналогичную эффективность наблюдали в отношении стимулирования LPS/IL-12, такого как для IL-18BP α -Fc (табл. 3; фиг. 7 (А-Е) и 8 (А-Е)). Гуманизирование MOR09441 и MOR09464 в значительной степени не изменило их нейтрализующую способность. Контрольное антитело, MOR03207, не ингибировало ответную реакцию IL-18. Выбранные антитела также оценивали на их способность ингибировать биологическую активность рекомбинантного IL-18 яванского макака (7 нМ) в цельной крови, взятой от яванского макака. Все, MOR09441, MOR09464, MOR09465, MOR09466, дозозависимо ингибировали продуцирование IFN- γ , причем полное ингибирование наблюдали при самой высокой концентрации. Наблюдаемые значения IC_{50} составляли 110 $\pm$ 36 нМ, 51 $\pm$ 8 нМ, 55 $\pm$ 3 нМ, 179 $\pm$ 30 нМ соответственно.

Таблица 3

Значения IC_{50} (нМ) для ингибирования высвобождения IFN- γ , индуцированного IL-18 в цельной крови

Наименование	Цельная кровь человека, стимулированная рекомбинантным IL-18 человека (7 нМ)	Цельная кровь человека, стимулированная LPS/IL-12
MOR010497	16,1 $\pm$ 6,6	107,9 $\pm$ 8,3
MOR010501	20,3 $\pm$ 5,6	101,3 $\pm$ 44
MOR010502	17,9 $\pm$ 5,0	110,4
MOR09465	4,2 $\pm$ 1,0	19,4 $\pm$ 7,8
MOR09466	5,6 $\pm$ 0,5	18,5 $\pm$ 1,6
MOR09441	8 $\pm$ 2,1	16,3 $\pm$ 5,4
MOR09464	3,6 $\pm$ 0,4	9,8 $\pm$ 3,2
MOR010579	5,6 $\pm$ 1,4	16,7 $\pm$ 7,0
MOR010222	4,7 $\pm$ 1,5	21,6 $\pm$ 9,9
IL-18BP-Fc	5,7 $\pm$ 2,0	12,1 $\pm$ 6,2
MOR13363	29,4	91,7 $\pm$ 66,9
MOR13361	15,72 $\pm$ 5,5	39,4 $\pm$ 13,5
MOR13341	5,6 $\pm$ 0,4	19,6 $\pm$ 5,3
MOR13342	6,6 $\pm$ 1,0	21,5 $\pm$ 6,7
MOR13347	3,5	8,3
MOR1022_N30S	58,4 $\pm$ 14,4	16,9 $\pm$ 7,4
MOR1022_N30S_M54Y	34,3 $\pm$ 16,6	18,8 $\pm$ 6,5
MOR1022_N30S_M54N	46,5 $\pm$ 9,9	16,1 $\pm$ 5,1
MOR1022_N30S_M54I	47,3 $\pm$ 15,1	9,3 $\pm$ 4,4
MOR09464_N30T	12,46 $\pm$ 2,67	20,76 $\pm$ 5,74
MOR09464_N30E	12,88 $\pm$ 2,79	19,16 $\pm$ 6,67
MOR09464_N30H	11,93 $\pm$ 2,14	22,98 $\pm$ 11,04
MOR09464_N30K	8,62 $\pm$ 2,62	17,09 $\pm$ 3,64
MOR09464_N30Q	8,10 $\pm$ 1,00	13,40 $\pm$ 2,91
MOR09464_N30G	25,14 $\pm$ 5,26	15,07 $\pm$ 2,80
MOR09464_N30V	12,68 $\pm$ 1,86	19,60 $\pm$ 4,90
MOR09464_N30Y	12,39 $\pm$ 1,59	17,85 $\pm$ 5,12
MOR09464_N30R	10,07 $\pm$ 1,32	11,03 $\pm$ 1,26
MOR09464_N30I	11,42 $\pm$ 2,37	13,15 $\pm$ 4,53
MOR09464_N30L	9,85 $\pm$ 1,64	15,46 $\pm$ 2,29
	n=3-4 среднее +/- стандартная ошибка среднего	n=3-4 среднее +/- стандартная ошибка среднего *n=2, среднее +/- стандартное отклонение

Мутанты MOR9464 и MOR10222, в частности, MOR9464_N30K и MOR10222_N30S_M54I, не обладали сопоставимой нейтрализующей способностью по отношению к антителам дикого типа.

9.7) ELISA для связывания антител против IL-18 с комплексом IL-18-IL-18BP.

Для подтверждения того, что антитела к IL18 или их фрагменты, описываемые в настоящем документе, не распознают IL-18, связанный с IL-18BP (комплексом IL-18/IL-18BP), IL-18 инкубировали с IL-18BP (rhIL-18BP/Fc, R&D Systems, кат.номер 119) в молярном избытке. Антитела к IL18 и фрагменты добавляли, как описано ниже, и детектировали связывание с комплексом. Как правило, сигналы при высокой концентрации антител к IL-18 и фрагментов детектировали в случае, когда они связывают доступные эпитопы на антигене, отличные от IL-18BP (т.е. признают комплекс IL-18/IL-1-BP). На первой стадии контрольные антитела и антитела к IL18 и фрагменты разбавляли с использованием PBST/0,5% БСА и добавляли к биотинилированному комплексу IL-18/IL18BP (инкубация в полипропиленовых планше-

тах в течение 30 мин при комнатной температуре и легком встряхивании). Контрольными антителами были MOR03207 (против лизоцима) в качестве отрицательного контроля, MOR08741, а также 125-2Н мыши, IgG мыши против IL-18 человека, в качестве положительного контроля антител (они оба распознают комплекс IL-18/IL-18BP) (Argiriadi MA et al. (2009), J. Biol Chem; 284(36) :24478-89). Весь комплекс охватывали посредством молекул биотина на нейтравидиновых планшетах, которые блокировали в ночное время с помощью 1× ChemiBlocker-PBS.

Планшеты отмывали 5× с помощью PBST и инкубировали в течение 1 ч с помощью 20 мкл/лунку детекторного антитела против Fab-AP - козы против IgG человека, специфичного к фрагменту F(ab)₂ (Jackson Immuno Research, 109-055-097, лот: 69655) или IgG (полноразмерная молекула)-AP против мыши (SIGMA, #A4312), оба разводили в 0,5% БСА/0,05% Tween20/1× PBS 1:5000. Планшеты отмывали 5× с помощью ТРИС-буферизированного физраствора, добавляли 20 мкл раствора AttoPhos (Roche) (разведенного в ddH₂O 1:5) и флуоресценцию измеряли на Tecan Reader.

Для антител MOR8775 и MOR8776 против IL-18, которые не связывают комплекс IL-18/IL-18BP, сигналы связывания были значительно слабее, или не наблюдали никаких сигналов (фиг. 9(A)). Для сравнения, сильный сигнал наблюдали в присутствии 125-2Н мыши, поддерживающего отмеченную способность этого контрольного антитела к связыванию эпитопа, отличного от эпитопа IL-18BP. Аналогично, дозозависимый сигнал наблюдали в присутствии контрольного антитела MOR08741.

На второй стадии эксперимент проводили аналогичным образом, за исключением использования небиотинилированного IL-18 человека. Комплекс IL-18/IL-18BP охватывали на планшете Maxisorp посредством Fc-метки rhIL-18BP/Fc с использованием IgG козы против человека (специфичного к фрагменту Fc-гамма, Jackson ImmunoResearch #109-005-098). Сигнал, зависящий от концентрации, наблюдали для контрольных MOR08741, в очередной раз обращая внимание на способность этого антитела распознавать комплекс IL-18/IL-18BP. Для сравнения, сигнал не наблюдали для MOR09441, MOR09464, MOR09465, MOR09466, что подтверждает то, что они не связывают комплекс IL-18/IL-18BP.

9.8) Эпитоп-специфическая сортировка антител к IL18 и фрагментов посредством ELISA.

Для эпитоп-специфической сортировки использовали две модели. По первой модели фрагмент антитела (Fab A) титровали и инкубировали с помощью биотинилированного IL-18 человека. Fab A тестировали с неизменной концентрацией антител B (IgG B). В качестве положительного контроля Fab A анализировали также с ними в формате IgG. Нейтравидиновые планшеты (Thermo Scientific, кат.номер 15402) блокировали с помощью Chemiblocker (разведенного в PBS 1:1) и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре (или в течение ночи при 4°C). На следующие сутки планшеты промывали 2× с помощью PBST и Fabs титровали с 500 нМ до 2 нМ в фосфатно-солевом буфере, содержащем 10 нМ конечной концентрации биотинилированного IL-18 человека. Комплекс фрагментов антител и биотинилированного IL-18 добавляли к нейтравидиновым планшетах и инкубировали в течение 1 ч. После промывки 3× с помощью PBST IgG B добавляли при 20 нМ к соответствующим лункам нейтравидиновых планшетов. Спустя 20 мин инкубации и промывки 3× с помощью PBST, детекторные антитела против Fab-AP - козы против IgG человека, специфичного к Fc гамма-цепи (Jackson Immuno Research, 109-055-098) и IgG (полноразмерная молекула)-AP против мыши (SIGMA, #A4312, Lot: 067K4863), добавляли разведенными 1:5000 в 0,5% БСА/0,05% Tween20/1× PBS.

Планшеты отмывали 5× с помощью PBST, добавляли 20 мкл раствора AttoPhos (разведенного в ddH₂O 1:5) и планшеты измеряли на Tecan Reader. Флуоресценцию при 535 нм фиксировали при экстракции при 430 нм.

Как правило, сигналы могли получить, только когда IgG B был способен связываться с доступными эпитопами на антигене, отличными от тестируемого Fab A (т.е. антитело связывается с другим эпитопом). В противоположность этому, для антител с частичным перекрытием или идентичными эпитопами сигналы связывания были значительно слабее по сравнению с контролями.

Вторую модель ELISA проводили на планшетах Maxisorp. Fab A покрывали до различных концентраций в PBS и инкубировали в ночное время при 4°C. На следующие сутки планшеты отмывали 3× с помощью PBST и блокировали в течение 2 ч при комнатной температуре с помощью 5% MPBST (100 мкл/лунку). После стадии промывки 3× с помощью PBST добавляли IL-18 человека с неизменной концентрацией в течение 1 ч. Планшеты отмывали 3× с помощью PBST и биотинилированный фрагмент антитела (биотинилированный Fab B) титровали (макс. конц. 5, 10 или 20 мкг/мл). Для образования комплекса Fab A с IL-18 и биотинилированным Fab B планшеты инкубировали в течение 1 ч, затем промывали 3× с помощью PBST и детекторное антитело, стрептавидин-щелочную фосфатазу ZyMax (Zymed, каталожный номер 43-8322, лот 51102099) разводили в PBST 1:2000 и добавляли 20 мкл/лунку к планшетам ELISA. Планшеты отмывали 5× с помощью ТРИС-буферизированного физраствора, добавляли 20 мкл раствора AttoPhos (Roche) (разведенного в ddH₂O 1:5) и планшеты измеряли на Tecan Reader.

В этом случае, при первой модели, сигналы можно было получить, только когда биотинилированный Fab B был способен связываться с эпитопами на антигене, которые отличались от тестируемого Fab A (т.е. антитело связывается с другим эпитопом).

Как показано на фиг. 10A, антитела MOR8775 конкурируют с мышинным антителом 125-2Н (ячейки,

заполненные черным), в то время как MOR8776 не конкурирует со 125-2Н за связывание с IL-18 (ячейки без заполнения). Оба антитела конкурируют с IL-18BP-Fc за связывание IL-18 (ячейки, заполненные черным). Ни MOR8775, ни MOR8776 не конкурируют с антителом АВТ325 (патентная заявка США с серийным номером 09/780035 и 10/988360). В зависимости от экспериментальных условий, MOR8775 и MOR8776 конкурируют друг с другом (ячейки, заполненные в полоску).

Во второй модели экспериментов антитела MOR9464, MOR9464_N30K, MOR10222_N30S_M54I и MOR13341 тестировали на их способность связывать IL-18 в присутствии любого из этих антител, IL-18BP-Fc, АВТ325 и мышиного антитела 125-2Н, с использованием устройства Proteon XPR36, биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR), функционирующего без использования меток в режиме реального времени. Перед проведением анализа подтверждали целостность белков и оценивали концентрацию с помощью LC-MS.

Все антитела и IL18BP-FC иммобилизовали в точках взаимодействия сенсорного чипа GLC посредством стандартного связывания аминов. На первой стадии IL18 инъецировали в качестве аналита 1, и на второй стадии или антитело к IL18, или IL18BP-Fc инъецировали в качестве аналита 2.

Лиганды для иммобилизации получали при концентрации или 20 мкг/мл (антитела), или 10 мкг/мл (IL18BP-Fc) в 10 mM ацетатного буфера при pH 4,0. Аналиты разбавляли в PBS (TEKNOVA), содержащем 0,005% Tween 20, такой же буферный раствор использовали в качестве рабочего буфера для устройства. Аналит 1 (25 nM IL18) инъецировали при скорости потока, составляющем 50 мкл/мин, в течение 180 секунд, при времени диссоциации, составляющем 60 секунд. Аналит 2 (25 nM IL18BP-Fc или антитело к IL18) инъецировали при скорости потока, составляющем 50 мкл/мин, в течение 180 секунд, при времени диссоциации, составляющем 180 секунд. Регенерацию проводили с помощью 10 mM глицина, pH 1,5, при скорости потока, составляющем 100 мкл/мин, в течение 20 секунд. Проводили две независимых серии экспериментов. Основой для оценки данных было наличие повышения сигнала в сенсограмме при введении аналита 2 по сравнению с сигналом от аналита 1. При повышении сигнала был сделан вывод о том, что иммобилизованный лиганд и введенный аналит 2 распознавали различные эпитопы. При отсутствии повышения сигнала приходили к заключению о том, что у обоих были общие или перекрывающиеся эпитопы.

Как показано на фиг. 10В, антитела MOR9464, MOR9464_N30K, MOR10222_N30S_M54I и MOR13341 конкурируют друг с другом (ячейки, заполненные черным), с IL-18BP-FC и с мышиным антителом 125-2Н. Ни одно из этих антител не конкурирует с АВТ325 (ячейки, заполненные белым).

Антитела, такие как MOR9464_N30K и MOR10222_N30S_M54I, которые двойственно конкурируют с IL-18BP-Fc и с мышиным антителом 125-2Н, имеют преимущество, заключающееся не только в связывании свободного IL-18, не связанного с нативным ингибитором IL-18BP-Fc, но также, как представляется, обладают потенциалом предотвращать связывание IL-18 с IL-18R α / β . Как описано у Wu et al. (Wu C. et al., J. Immunol. 2003, 170: 5571-5577), IL-18R β не показывает связывания только IL-18, но образует функциональный высокоаффинный рецепторный комплекс с IL-18R α , способный давать сигнал в ответ на IL-18. С помощью биохимических данных, совмещенных с картированием эпитопов 125-2Н на IL-18, выяснили, что 17 C-концевых аминокислот IL-18 человека имеют критическое значение для передачи сигнала через гетеродимерный рецептор. Таким образом, как представляется, антитела, способные связываться в пределах эпитопа 125-2Н и в равной степени конкурирующие с IL-18-связывающим белком за связывание IL-18, обладают потенциалом предотвращения IL-18-зависимой активации пути не только посредством блокирования связывания с IL-18R α , но также посредством блокирования связывания IL-18 с комплексом IL-18R α / β . Как очевидно из раздела 9.11, антитело MOR9464_N30K связывает, наряду с другими, аминокислоты Glu177 и Leu180, которые находятся в пределах 17-аминокислотного удлинения, описанного у Wu et al.

9.9) IL-18 картирование эпитопов посредством моделирования.

IL-18 человека от SwissProt entry Q14116 использовали для поиска структурной информации в PDB (Berman H.M et al. (2000), Nucl Acids Res; 28:235-242). Обнаружили три структуры с кодом 1J0S (Kato Z et al. (2003), Nat Struct Biol; 10:966), 2VXT (Argiriadi MA et al. (2009), J. Biol Chem; 284:24478) и 3F62 (Krumm B et al. (2008), Proc Natl Acad Sci USA; 105:20711). 1J0S является ЯМР-структурой IL-18 человека. 2VXT является кристаллической структурой сконструированного IL-18 человека в комплексе с фрагментом антитела 125-2Н мыши при разрешении 1,49 Å, и 3F62 является кристаллической структурой сконструированного IL-18 человека в комплексе с IL-18-связывающим белком от поксвируса при разрешении 2,0 Å.

Три участка связывания на IL-18 определяли посредством мутационного анализа. Два из них, сайт 1 и 2, имеют важное значение для связывания IL-18R α , и третий из них, сайт 3, для связывания IL-18R β (Kato Z. et al. (2003), Nat. Struct. Biol, 10:966). Сайт 2 также имеет значение для связывания IL-18BP.

Также доступен структурный комплекс между IL-1 β и IL-1R1 (HTB, Vigers G.P et al. (1997), Nature, 386:190). Структура комплекса IL-1 β с IL-1R1 показывает, что IL-1 β имеет два участка связывания для рецептора, сайт 1 и 2 (фиг. 11 (А)). Ввиду отсутствия структуры для комплекса IL-18 с IL-18R α , кристаллическую структуру IL-1 β в комплексе с IL-1R1 использовали в качестве шаблона для моделирования

белка (PDB код HTB). Модель IL-18R α конструировали с использованием структуры IL-1R1 в качестве шаблона. Кристаллическую структуру IL-18 (pdb код 2VXT, Argiriadi M.A et al. (2009), J.Biol.Chem. 284:24478) и смоделированную структуру IL-18R α структурно накладывали на комплекс IL-1 β /IL-1R1 и модель IL-18/IL-18R α , полученную таким образом, корректировали для получения конечной структурной модели (фигура 11 (B)). MOE v2009,1 (Chemical Computing Group Inc.) является программным обеспечением, использованным для моделирования комплекса IL-18 с IL-18R α . Панель гомологичного моделирования использовали для построения модели IL-18R α путем выбора силового поля AMBER99 и параметров панели по умолчанию. Использовали панель минимизации энергии в MOE для уточнения конечного комплекса IL-18/IL-18R α .

Общая структура IL-18 человека показывает аналогию с IL-1 β . В частности, RMSD (среднеквадратическое отклонение) между атомами IL-18 и IL-1 β C α во вторичных структурных элементах указывает на то, что они являются родственными белками, принадлежащими к одному структурному классу (Kato Z. et al. (2003), Nat.Struct.Biol, 10:966). При сравнении структур IL-1 β и IL-18 выяснилось, что сайты 1 и 2 в IL-18 соответствуют сайтам 1 и 2 в IL-1 β . На фиг. 11 (B) сайты 1 и 2 показаны на модели комплекса между IL-18 и IL-18R α , также показан сайт 3. Сайт 3 представлен как сайт взаимодействия для IL-18R β (Kato Z. et al. (2003), Nat.Struct.Biol, 10:966).

Участок связывания IL-18 для IL-18BP некоторым образом определили с помощью аланиновых мутаций и посредством рентгенографической кристаллической структуры IL-18BP от поксвируса в комплексе с IL-18 (Krumm et al. (2008), Proc Natl Acad Sci USA; 105(52):20711-20715). Этот предполагаемый участок связывания также соответствует области на IL-18, определенной как сайт 2, одной из двух областей взаимодействия IL-18 с IL-18R α .

9.10) Картирование эпитопов IL-18 посредством масс-спектрометрии, основанной на водород/дейтериевом обмене (H/DxMS).

Масс-спектрометрию, основанную на водород/дейтериевом обмене, использовали для исследования IL-18 человека с целью получения информации относительно эпитопа для MOR9464. Картирование с помощью H/DxMS основано на разнице масс между "нормальными" атомами водорода и "тяжелым" изотопом дейтерием, который также содержит нейтрон в дополнение к единичному протону, присутствующему в нормальном ядре водорода.

При переходе из воды к системе растворителей на основе дейтерия (тяжелая вода), масса белка увеличивается, так как водород амида на основной цепи белка постепенно будет вытесняться дейтронами (более тяжелым изотопом водорода). Вероятность возникновения водород/дейтериевого обмена в большинстве случаев определяют с помощью структуры белка и доступности растворителя. Технологию H/DxMS используют для измерения относительного водород/дейтериевого обмена и как следствие структуры белка и доступности растворителя.

Когда партнер белка по связыванию связывается с антителом (например, взаимодействие антиген/антитело), можно наблюдать экспериментально наблюдаемые изменения в скорости обмена. Обмен поверхностных областей, исключающих использование растворителя при образовании комплекса, происходит намного медленнее. Области, исключающие использование растворителя, пригодны для установления месторасположения участка связывания. В случае взаимодействия антиген-антитело, изменения в скорости обмена могут выявить расположение эпитопа, но также любую другую пертурбацию, возникающую в результате связывания антитела с антигеном. Например, уменьшение количества поглощенного дейтерия в антигене, при указанном времени обмена после связывания антитела, может представлять или повышенную защиту ввиду непосредственного связывания антитела с этой областью, или непрямую пертурбацию структуры (аллостерические изменения) в связи со связыванием антитела. Эти два эффекта трудно различимы, несмотря на то, что наиболее сильный наблюдаемый эффект часто связан с прямой защитой от антитела.

Место уменьшения включения дейтрона после связывания антитела можно установить посредством расщепления целевого белка после водород/дейтериевого обмена (например, с помощью подходящего фермента, такого как пепсин) и последующей масс-спектрометрии для определения массы соответствующих фрагментов.

Контрольные эксперименты с трехкратным повторением проводили с 316 пмоль антигена IL-18 при времени дейтериевого обмена, составляющем 3 и 25 мин, посредством разбавления исходного раствора IL-18 с помощью 95% дейтерированного буфера PBS до концентрации 83,6% D. Дейтерообмен гасили с помощью буфера для гашения (6М мочевины и 1М TCEP). После гашения флакон анализировали с помощью анализа расщепления пепсином в реальном времени/LC-MS. Расщепление пепсином в реальном времени проводили с использованием иммобилизованного пепсина Life Science's Poroszyme, упакованного в колонку 2,0×20 мм, и разделение LC проводили на колонке Thermo C18 BioBasic (1,0×50 мм) при скорости потока, составляющей 100 мкл/мин, с использованием скоростного градиента, чтобы провести элюирование всех пептидов менее чем за 20 мин. Подвижные фазы являются стандартными подвижными фазами обращенно-фазовой хроматографии: 0,1% муравьиной кислоты в воде и 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. В этих экспериментах водороды амида основной цепи, выявленные на поверхности

IL-18, включают дейтроны.

Затем проводили эксперименты по мечению с трехкратным повторением. Сначала антитело MOR9464 иммобилизовали на гранулах агарозы с белком G (Thermo 22851), используя стандартные способы. Гранулы, нагруженные антителом, центрифугировали для удаления раствора PBS. Затем 200 мкл холодного PBS (pH 7,4) и 6 мкл (316 пмоль) IL-18 добавляли к иммобилизованному антителу MOR9464 и инкубировали в течение 15 мин при 4°C. После инкубации комплекс центрифугировали и промывали с помощью 200 мкл PBS и снова центрифугировали. Для дейтерообмена 200 мкл 83,6% дейтерированный буфер PBS добавляли к комплексу антиген-антитело для инкубации при 4°C в течение 3 или 25 мин. Затем дейтерированный буфер удаляли и немедленно добавляли 125 мкл буфера для гашения (как указано выше). После гашения фильтрат переносили в предварительно охлажденный флакон для ВЭЖХ и анализировали с использованием идентичного анализа расщепления пепсином в реальном времени/LC-MS, который использовали в контрольных экспериментах. Амиды основной цепи, присутствующие в области контакта антигена с антителом, включают меньшее количество дейтронов при указанном времени обмена относительно контрольных экспериментов. Посредством сравнения профиля H/Dx контрольных экспериментов и экспериментов по мечению, эпитоп выявляют как область антигена, защищенная от ионного обмена в экспериментах по мечению.

По результатам этого анализа, проведенного с MOR9464, были выявлены три наиболее существенные области защиты на IL-18. Ими были (в отношении SEQ ID NO: 1) аминокислоты с 87 по 99, аминокислоты со 119 по 137 и аминокислоты со 138 по 160. Как показано, эти области содержат аминокислоты, участвующие в связывании IL-18BP (фиг. 12).

9.11) Рентгеновская структурная характеристика IL-18/фрагмента антитела.

Общая идентификация эпитопа посредством моделирования и H/DxMS подтвердили, что антитела и их фрагменты, как описано в настоящем документе, распознают область на IL-18, которую также распознает IL-18BP (фиг. 12). С целью идентификации соответствующих аминокислот на IL-18 в этих областях проводили рентгенографическое определение структуры комплекса IL-18/антитела.

Для получения фрагмента антитела 13 мг MOR9464_N30K, при концентрации 18 мг/мл в 10 mM гистидина с pH 5,0, расщепляли с помощью 1/300 (масс./масс.) папаина в 100 mM Трис-HCl pH 7,0, 10 mM ДТТ в течение 200 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали с помощью 50 мкМ ингибитора папаина E64. Затем фрагмент Fab очищали над колонкой с белком А, уравновешенным 20 mM натрий-фосфатным буфером при pH 7,0.

Очистка комплекса Fab с IL-18: IL-18 человека в 1,33-кратном избытке (1,6 мг в PBS) добавляли к 3,2 мг фрагмента антитела MOR9464_N30K (полученного из элюата белка А). Комплекс IL-18 с фрагментом антитела MOR9464_N30K концентрировали путем ультрафильтрации, загружали на эксклюзионную хроматографию SPX-75 и проводили изократическое элюирование в 10 mM Трис-HCl при pH 7,4, 25 mM NaCl.

Кристаллизация: Комплекс IL-18/фрагмента антитела.

MOR9464_N30K концентрировали путем ультрафильтрации до 11,8 мг/мл и скрининг кристаллизации проводили путем диффузии паров в сидячей капле в 96-луночных планшетах. Эксперименты проводили с помощью роботизированной системы Phoenix и хранили в системе RockImager при 19°C. Определяли и характеризовали две кристаллические формы (форму А и форму В):

1) кристаллическую форму А, выращенную из 0,1M сульфата лития, 0,1M ADA pH 6,5, 12% PEG 4000. (Криопротектором была смесь резервуарного раствора с 20% PEG 4000, 30% глицерином 1:1).

2) кристаллическую форму В, выращенную из 59,5% 2-метил-2,4-пентандиола (MPD), 15% глицерина, 85 mM HEPES при pH 7,5. (Криопротектор не требовался).

Рентгенометрические данные собирали в Swiss Light Source, с пучком синхротронного излучения X10SA, с пиксельным детектором Pilatus. Все дифракционные изображения обрабатывали с помощью XDS (версия от 6 декабря 2010 года), как при использовании в APRV.

Для кристаллической формы А каждое из 720 изображений 0,25° отклонения записывали при расстоянии от кристалла до детектора, составляющем 460 мм, используя рентгеновское излучение с длиной волны 0,99999 Å.

Для кристаллической формы В каждое из 720 изображений 0,25° отклонения записывали при расстоянии от кристалла до детектора, составляющем 430 мм, используя рентгеновское излучение с длиной волны 0,99984 Å.

Структуру кристаллической формы А определяли посредством молекулярного замещения с помощью программы Phaser, используя ввод в PDB 3GBM.pdb и 2VXT.pdb в качестве начальных моделей для фрагмента антитела MOR9464_N30K и молекулы IL-18 соответственно. Вариативный и первый константный домены фрагмента антитела в 3GBM.pdb использовали в качестве независимых поисковых моделей. Легко получали чистый раствор для одного комплекса фрагмента антитела IL-18/MOR9464_N30K на асимметричный фрагмент. Структуру кристаллической формы В определяли таким же образом, но с использованием уточненных моделей, полученных от кристаллической формы А, вместо входа в PDB.

Уточнение структуры: структуру уточняли посредством нескольких циклов проверки карты распределения электронной плотности и повторного построения модели в Coot 0.6.2, с последующим авто-

матизированным уточнением с использованием autoBUSTER (1.11.2/buster 2.11.2). Межмолекулярные контакты определяли с помощью NCONT и расчет площади доступной поверхности производили с помощью AREAIMOL, оба из пакета программ CCP4 (версия 6.1.2). Собранные рентгенометрические и уточненные статистические данные представлены ниже в табл. 4.

Таблица 4

Собранные рентгенометрические и уточненные статистические данные

	Кристаллическая форма А	Кристаллическая форма В
Сбор данных		
Пространственная группа	P2 ₁	C2
Размер ячейки		
a, b, c (Å)	43,46, 85,86, 85,77	213,72, 41,81, 71,37
α , β , γ (°)	90,00, 94,29, 90,00	90,00, 100,13, 90,00
Разрешение (Å)	2,80 (2,87–2,80)*	2,70 (2,77–2,70)*
R _{sum} или R _{merge}	0,10 (0,454)	0,074 (0,487)
I/ σ I	13,0 (3,2)	12,0 (2,8)
Полнота (%)	98,7 (98,2)	98,8 (98,6)
Избыточность	3,4 (3,5)	3,3 (3,4)
Уточнение		
Разрешение (Å)	85,53–2,80	54,19–2,70
Число отражений	15,406	17,335
R _{рабочее} /R _{свободное}	0,175/0,257	0,192/0,254
Число атомов		
Белок	4,447	4,445
Компонент буфера	10 (2 сульфатные ионы)	6 (1 глицерин)
Вода	89	62
B-факторы (Å ²)		
Легкая цепь антитела (L)	54,3 (V _L : 34,6; V _C : 76,5)	50,3
Тяжелая цепь антитела (H)	37,0	51,4
hIL-18 (I)	35,3	64,7
Вода	30,4	51,6
Среднеквадратичное отклонение		
Длины связей (Å) / углы (°)	0,010/1,31	0,010/1,28

Общий вид структуры комплекса IL-18/фрагмента MOR9464_N30K показан на фиг. 13. При образовании комплекса выявили 36 аминокислот на IL-18 с пониженной восприимчивостью к растворителю на связывающем интерфейсе IL-18 с фрагментом антитела. Этими остатками являются Leu41, Glu42, Met87, Tyr88, Lys89, Asp90, Ser91, Gln92, Pro93, Arg94, Gly95, Met96, Ala97, Phe138, Gln139, Arg140, Ser141, Val142, Pro143, Gly144, His145, Asp146, Asn147, Met149, Gln150, Glu152, Ser153, Ser154, Glu157, Gly158, Phe160, Glu177, Asp178, Glu179, Leu180 и Gly181.

С помощью дополнительной характеристики контактов, образованных в интерфейсе комплекса, определили, что Arg140 и Glu152 являются аминокислотами, которые более вероятно вносят наибольший вклад в образование этого конкретного комплекса. Оба остатка расположены в центре связывающего интерфейса и способствуют образованию большого количества межмолекулярных контактов (21 и 18, соответственно, на расстоянии, не превышающем 4,0 Å друг от друга). Arg140 взаимодействует как с остатками L-CDR3 (Tyr94L), так и H-CDR3 (Tyr101H, His102H). Glu152 образует прочное (внедренное) взаимодействие соляного мостика с L-CDR2 Arg51L и принимает H-связь от L-CDR3 Tyr94L. Все остатки в цепях антитела последовательно пронумерованы, буква L или H после номера остатка обозначает остаток в легкой цепи или тяжелой цепи соответственно.

Трехмерная структура комплекса IL-18/фрагмента антитела MOR9464_N30K позволяет более подробно изучить различную перекрестную реактивность между IL-18 человека и IL-18 яванского макака. MOR9464_N30K в 10 раз слабее IL-18 яванского макака (20 пМ) по сравнению с 2 пМ по отношению к IL-18 человека (табл. 2). IL-18 яванского макака отличается от IL-18 человека в 6 положениях (человек

против яванского макака): V47I; S86N; T99A; K115R; F170Y и E177K (фиг. 14(A)). Из этих положений только глутаминовая кислота 177 (Glu177; E177) расположена в интерфейсе комплекса IL-18/фрагмента антитела (фиг. 14 (B)). Таким образом, можно утверждать, что K177 в последовательности IL-18 яванского макака вызывает 10-кратное снижение аффинности по отношению к MOR9464_N30K, как показано в столбце 1 табл. 2А, где K_D (SET, пМ) для MOR9464_N30K для IL-18 человека составляет 2 ± 1 пМ, в то время как для IL-18 яванского макака составляет 20 ± 10 пМ.

С целью определения части IL-18R α , с которой конкурирует фрагмент антитела MOR9464_N30K, накладывали комплекс IL-18/фрагмента антитела MOR9464_N30K на комплекс IL-18/IL-18R α . В кратком изложении, структуры IL-18 в комплексе IL-18/IL-18R α и IL-18 в комплексе IL-18/MOR9464_N30K накладывали с использованием команды выравнивания в PyMol (The PyMol Molecular Graphic system, version 1.2r3pre, Schroedinger LLC).

Как показано на фиг. 15, фрагмент антитела MOR9464_N30K конкурирует с Ig-доменом D3 IL-18R α за связывание IL-18.

Аналогично, структуру комплекса IL-18/фрагмента антитела MOR9464_N30K накладывали на структуру IL-18 человека в комплексе с IL-18BP от поксвируса (использованный координатный файл 3F62.pdb) с помощью команды "выравнивания" в PyMOL (The PyMOL Molecular Graphic system, version 1.5.0., Schrödinger LLC).

Как показано на фиг. 16, IL-18BP поксвируса противоречит варибельному домену тяжелой цепи фрагмента антитела MOR9464_N30K и в подавляющем большинстве случаев конкурирует за связывание аминокислотных остатков с Met87 по Met96 на IL-18.

Эти полученные результаты также подтверждают биохимические данные и данные эпитоп-специфической сортировки, приведенные в настоящем документе, и показывают, что связывающие молекулы, как описано в настоящем документе, в частности, антитела и их фрагменты, не связывают комплекс IL-18/IL-18BP.

В заключение, проводили сравнение мышинового антитела 125-2Н с известным уровнем техники. Анализ проводили с помощью структуры фрагмента антитела 125-2Н, как представлено в файле 2VXT.pdb. В кратком изложении, структуру IL-18 в комплексе с фрагментом антитела MOR9464_N30K накладывали на IL-18 в комплексе с Fab 125-2Н, используя команду "выравнивания" в PyMOL (The PyMOL Molecular Graphic system, version 1.5.0., Schrödinger LLC).

Как показано на фиг. 17, фрагмент антитела MOR9464_N30K (левая сторона наложения) и фрагмент антитела 125-2Н (правая сторона наложения) перекрываются в распознавании IL-18. Однако фрагмент антитела 125-2Н не связывает эпитоп, распознанный IL-18BP, как показано на фиг. 18, где комплекс 125-2Н/IL-18 наложен на комплекс IL-18BP поксвируса/IL. Как данные, представленные в литературе известного уровня техники в отношении 125-2Н (Argiriadi M.A et al. (2009), J.Biol.Chem. 284:24478), так и биохимические данные и данные эпитоп-специфической сортировки, приведенные в настоящем документе, подтверждают, что мышинное антитело 125-2Н связывает комплекс IL-18/IL-18BP.

Наконец, как показано на фиг. 19, лизин в положении 30 в тяжелой цепи MOR9464_N30K образует электростатические/полярные взаимодействия с Asp 146 и Asn 147 IL-18 человека, указывая на то, что лизин 30 участвует в образовании комплекса антитело-антиген. Таким образом, очевидно, что внеклеточная модификация, как описано в разделе 9.2 настоящего документа, такая как дезамидирование аспарагина, может способствовать потере потенциала MOR9464 с течением времени. Замена аспарагина 30 лизином в MOR9464_N30K обеспечивает MOR9464_N30K с повышенной стабильностью.

Таблица корреляции последовательностей

SEQ ID NO:	Определение
1	IL-18 человека
2	IL-18 яванского макака
3	H-CDR1 MOR8775; MOR9464; MOR9441; MOR10222; MOR10579; MOR9464_N30K; MOR10222_N30S_M54I; MOR9465; MOR9466;
4	H-CDR2 MOR8775;
5	H-CDR3 MOR8775; MOR9464; MOR9441; MOR10222; MOR10579; MOR9464_N30K; MOR10222_N30S_M54I; MOR9465; MOR9466;
6	L-CDR1 MOR8775; MOR9464; MOR9441; MOR10222; MOR10579; MOR9464_N30K; MOR10222_N30S_M54I; MOR9465; MOR9466;
7	L-CDR2 MOR8775; MOR9464; MOR9441; MOR10222; MOR10579; MOR9464_N30K; MOR10222_N30S_M54I; MOR9465; MOR9466;
8	L-CDR3 MOR8775; MOR9464; MOR9441; MOR10222; MOR10579; MOR9464_N30K; MOR10222_N30S_M54I; MOR9465; MOR9466;
9	H-CDR2 MOR9464; MOR10222; MOR9464_N30K;
10	H-CDR2 MOR9441; MOR10579;
11	H-CDR2 MOR9465
12	H-CDR2 MOR9466

034610

13	H-CDR2 MOR10222_N30S_M54I;
14	VH MOR9464_N30K
15	Полинуклеотид VH MOR9464_N30K
16	VL MOR9464_N30K; MOR9464; MOR8775; MOR9465; MOR9466; MOR9441
17	Полинуклеотид VL MOR9464_N30K
18	VH MOR10222_N30S_M54I
19	Полинуклеотид VH MOR10222_N30S_M54I
20	VL MOR10222_N30S_M54I; MOR10579; MOR10222
21	Полинуклеотид VL MOR10222_N30S_M54I
22	VH MOR8775;
23	Полинуклеотид VH MOR8775;
24	Полинуклеотид VL MOR8775;
25	VH MOR9441;
26	Полинуклеотид VH MOR9441;
27	Полинуклеотид VL MOR9441;
28	VH MOR9464;
29	Полинуклеотид VH MOR9464;
30	Полинуклеотид VL MOR9464;
31	VH MOR9465;
32	Полинуклеотид VH MOR9465;
33	Полинуклеотид VL MOR9465;
34	VH MOR9466;
35	Полинуклеотид VH MOR9466;
36	Полинуклеотид VL MOR9466;
37	VH MOR10579;
38	Полинуклеотид VH MOR10579;
39	Полинуклеотид VL MOR10579;
40	VH MOR10222;
41	Полинуклеотид VH MOR10222;
42	Полинуклеотид VL MOR10222;
43	Тяжелая цепь MOR9464_N30K
44	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR9464_N30K
45	Легкая цепь MOR9464_N30K; MOR9464; MOR8775; MOR9441

034610

46	Полинуклеотид легкой цепи MOR9464_N30K
47	MOR9464 тяжелой цепи;
48	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR9464;
49	Полинуклеотид легкой цепи MOR9464;
50	MOR9441 тяжелой цепи;
51	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR9441;
52	Полинуклеотид легкой цепи MOR9441;
53	MOR10222 тяжелой цепи;
54	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR10222;
55	Полинуклеотид легкой цепи MOR10222;
56	MOR8775 тяжелой цепи;
57	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR8775;
58	Полинуклеотид легкой цепи MOR8775;
59	(Chothia) H-CDR1 MOR9464;
60	(Chothia) H-CDR2 MOR9464; MOR9464_N30K
61	(Chothia) H-CDR3 MOR9464; MOR9464_N30K; MOR10222_N30S_M54I
62	(Chothia) L-CDR1 MOR9464; MOR9464_N30K; MOR10222_N30S_M54I
63	(Chothia) L-CDR2 MOR9464; MOR9464_N30K; MOR10222_N30S_M54I
64	(Chothia) L-CDR3 MOR9464; MOR9464_N30K; MOR10222_N30S_M54I
65	(Chothia) H-CDR1 MOR9464_N30K;
66	(Chothia) H-CDR1 MOR10222_N30S_M54I
67	(Chothia) H-CDR2 MOR10222_N30K_M54I;
68	(Chothia) H-CDR1 MOR13363;
69	(Chothia) H-CDR2 MOR13363;
70	(Chothia) H-CDR3 MOR13363;
71	(Chothia) L-CDR1 MOR13363;
72	(Chothia) L-CDR2 MOR13363;
73	(Chothia) L-CDR3 MOR13363;
74	H-CDR1 MOR8776; MOR10497; MOR10501; MOR10502;
75	H-CDR2 MOR8776;
76	H-CDR2 MOR10501
77	H-CDR2 MOR1010502;

78	H-CDR2 MOR10497;
79	H-CDR3 MOR8776; MOR10497; MOR10501; MOR10502;
80	L-CDR1 MOR8776; MOR10497; MOR10501; MOR10502;
81	L-CDR2 MOR8776; MOR10497; MOR10501; MOR10502;
82	L-CDR3 MOR8776; MOR10497; MOR10501; MOR10502;
83	VH MOR8776;
84	Полинуклеотид VH MOR8776;
85	VL MOR8776; MOR10497; MOR10501; MOR10502
86	Полинуклеотид VL MOR8776;
87	VH MOR10497;
88	Полинуклеотид VH MOR10497;
89	Полинуклеотид VL MOR10497;
90	VH MOR10501;
91	Полинуклеотид VH MOR10501;
92	Полинуклеотид VL MOR10501;
93	VH MOR10502;
94	Полинуклеотид VH MOR10502;
95	Полинуклеотид VL MOR10502;
96	Тяжелая цепь MOR8776;
97	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR8776;
98	Легкая цепь MOR8776; MOR10497
99	Полинуклеотид легкой цепи MOR8776;
100	MOR10579 тяжелой цепи;
101	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR10579;
102	Полинуклеотид легкой цепи MOR10579;
103	MOR10497 тяжелой цепи;
104	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR10497;
105	Полинуклеотид легкой цепи MOR10497;
106	H-CDR1 MOR13363; MOR13361
107	H-CDR2 MOR13363
108	H-CDR3 MOR13363; MOR13361
109	L-CDR1 MOR13363; MOR13361
110	L-CDR2 MOR13363; MOR13361
111	L-CDR3 MOR13363

112	VH MOR13363
113	Полинуклеотид VH MOR13363
114	VL MOR13363
115	Полинуклеотид VL MOR13363
116	Тяжелая цепь MOR13363
117	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR13363
118	Легкая цепь MOR13363
119	Полинуклеотид легкой цепи MOR13363
120	H-CDR1 MOR13341; MOR13342; MOR13347
121	H-CDR2 MOR13341; MOR13342; MOR13347
122	H-CDR2 MOR13361
123	H-CDR3 MOR13341; MOR13342; MOR13347
124	L-CDR1 MOR13341; MOR13342; MOR13347
125	L-CDR2 MOR13341; MOR13342; MOR13347
126	L-CDR3 MOR13361
127	L-CDR3 MOR13341
128	L-CDR3 MOR13342
129	L-CDR3 MOR13347
130	VH MOR13341; MOR13342; MOR13347
131	Полинуклеотид VH MOR13341
132	VL MOR13341
133	Полинуклеотид VL MOR13341
134	MOR13341; MOR13342; MOR13347 тяжелой цепи
135	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR13341
136	MOR13341 легкой цепи
137	Полинуклеотид легкой цепи MOR13341
138	VH MOR13361
139	Полинуклеотид VH MOR13361
140	VL MOR13361
141	Полинуклеотид VL MOR13361
142	MOR13361 тяжелой цепи
143	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR13361
144	MOR13361 легкой цепи
145	Полинуклеотид легкой цепи MOR13361

146	Полинуклеотид VH MOR13342
147	VL MOR13342
148	Полинуклеотид VL MOR13342
149	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR13342
150	MOR13342 легкой цепи
151	Полинуклеотид легкой цепи MOR13342
152	Полинуклеотид VH MOR13347
153	VL MOR13347
154	Полинуклеотид VL MOR13347
155	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR13347
156	MOR13347 легкой цепи
157	Полинуклеотид легкой цепи MOR13347
158	Тяжелая цепь MOR10222_N30S_M54I
159	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR10222_N30S_M54I
160	Легкая цепь MOR10222_N30S_M54I; MOR10222; MOR10579
161	Полинуклеотид легкой цепи MOR10222_N30S_M54I
162	(Chothia) H-CDR1 MOR10497
163	(Chothia) H-CDR2 MOR10497
164	(Chothia) H-CDR3 MOR10497
165	(Chothia) L-CDR1 MOR10497
166	(Chothia) L-CDR2 MOR10497
167	(Chothia) L-CDR3 MOR10497
168	MOR10501 тяжелой цепи
169	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR10501
170	MOR10501 легкой цепи
171	Полинуклеотид легкой цепи MOR10501
172	MOR10502 тяжелой цепи
173	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR10502
174	MOR10502 легкой цепи
175	Полинуклеотид легкой цепи MOR10502
176	MOR9465 тяжелой цепи
177	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR9465
178	MOR9465 легкой цепи
179	Полинуклеотид легкой цепи MOR9465

034610

180	MOR9466 тяжелой цепи
181	Полинуклеотид тяжелой цепи MOR9466
182	MOR9466 легкой цепи
183	Полинуклеотид легкой цепи MOR9466
184	(Chothia) H-CDR1 MOR8776
185	(Chothia) H-CDR2 MOR8776
186	(Chothia) H-CDR3 MOR8776
187	(Chothia) L-CDR1 MOR8776
188	(Chothia) L-CDR2 MOR8776
189	(Chothia) L-CDR3 MOR8776
190	(Chothia) H-CDR1 MOR10501
191	(Chothia) H-CDR2 MOR10501
192	(Chothia) H-CDR3 MOR10501
193	(Chothia) L-CDR1 MOR10501
194	(Chothia) L-CDR2 MOR10501
195	(Chothia) L-CDR3 MOR10501
196	H-CDR2 MOR10502
197	(Chothia) H-CDR1 MOR10502
198	(Chothia) H-CDR2 MOR10502
199	(Chothia) H-CDR3 MOR10502
200	(Chothia) L-CDR1 MOR10502
201	(Chothia) L-CDR2 MOR10502
202	(Chothia) L-CDR3 MOR10502
203	(Chothia) H-CDR1 MOR8775
204	(Chothia) H-CDR2 MOR8775
205	(Chothia) H-CDR3 MOR8775
206	(Chothia) L-CDR1 MOR8775
207	(Chothia) L-CDR2 MOR8775
208	(Chothia) L-CDR3 MOR8775
209	(Chothia) H-CDR1 MOR9441
210	(Chothia) H-CDR2 MOR9441
211	(Chothia) H-CDR3 MOR9441
212	(Chothia) L-CDR1 MOR9441
213	(Chothia) L-CDR2 MOR9441

034610

214	(Chothia) L-CDR3 MOR9441
215	(Chothia) H-CDR1 MOR9465
216	(Chothia) H-CDR2 MOR9465
217	(Chothia) H-CDR3 MOR9465
218	(Chothia) L-CDR1 MOR9465
219	(Chothia) L-CDR2 MOR9465
220	(Chothia) L-CDR3 MOR9465
221	(Chothia) H-CDR1 MOR9466
222	(Chothia) H-CDR2 MOR9466
223	(Chothia) H-CDR3 MOR9466
224	(Chothia) L-CDR1 MOR9466
225	(Chothia) L-CDR2 MOR9466
226	(Chothia) L-CDR3 MOR9466
227	(Chothia) H-CDR1 MOR10579
228	(Chothia) H-CDR2 MOR10579
229	(Chothia) H-CDR3 MOR10579
230	(Chothia) L-CDR1 MOR10579
231	(Chothia) L-CDR2 MOR10579
232	(Chothia) L-CDR3 MOR10579
233	(Chothia) H-CDR1 MOR10222
234	(Chothia) H-CDR2 MOR10222
235	(Chothia) H-CDR3 MOR10222
236	(Chothia) L-CDR1 MOR10222
237	(Chothia) L-CDR2 MOR10222
238	(Chothia) L-CDR3 MOR10222
239	H-CDR2 MOR10222_N30S_M54I
240	(Chothia) H-CDR1 MOR13341
241	(Chothia) H-CDR2 MOR13341
242	(Chothia) H-CDR3 MOR13341
243	(Chothia) L-CDR1 MOR13341
244	(Chothia) L-CDR2 MOR13341
245	(Chothia) L-CDR3 MOR13341
246	(Chothia) H-CDR1 MOR13342
247	(Chothia) H-CDR2 MOR13342

034610

248	(Chothia) H-CDR3 MOR13342
249	(Chothia) L-CDR1 MOR13342
250	(Chothia) L-CDR2 MOR13342
251	(Chothia) L-CDR3 MOR13342
252	(Chothia) H-CDR1 MOR13347
253	(Chothia) H-CDR2 MOR13347
254	(Chothia) H-CDR3 MOR13347
255	(Chothia) L-CDR1 MOR13347
256	(Chothia) L-CDR2 MOR13347
257	(Chothia) L-CDR3 MOR13347
258	(Chothia) H-CDR1 MOR13361
259	(Chothia) H-CDR2 MOR13361
260	(Chothia) H-CDR3 MOR13361
261	(Chothia) L-CDR1 MOR13361
262	(Chothia) L-CDR2 MOR13361
263	(Chothia) L-CDR3 MOR13361

Список последовательностей**SEQ ID NO:1**

MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENLES DYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNR
PLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPD
NIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSYEGYFLACEKERDLFKLILKKDELGDRSIMFTV
QNED

SEQ ID NO:2

MAAEPEDNCINFVAMKPIDSTLYFIAEDDENLES DYFGKLESKLSIIRNLNDQVLFIDQGNR
PLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIINMYKDSQPRGMAVAISVKCEKISTLSCENRIISFKEMNPPD
NIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSYEGYFLACEKERDLYKLILKKDELGDRSIMFTV
QNED

SEQ ID NO:3

SYAIS

SEQ ID NO:4

GIPIYGTANYAQKFQG

SEQ ID NO:5

AAYHPLVFDN

SEQ ID NO:6

SGSSSNIGNHYVN

SEQ ID NO:7

RNNHRPS

SEQ ID NO:8

QSWDYSGFSTV

SEQ ID NO:9

NIIPMTGQTYAQKFQG

SEQ ID NO:10

WINPFYIGETFYAQKFQG

SEQ ID NO:11

NIIPHYGFAYYAQKFQG

SEQ ID NO:12

NIIPYSGFAYYAQKFQG

SEQ ID NO:13

NIIPITGQTYYAQKFQG

SEQ ID NO:14EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFKSYAISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYYAQK
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWNWGQGLVTVSS**SEQ ID NO:15**GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGC
TGTAAGCTAGTGGCGGCACCTTCAAGTCCTACGCTATTAGCTGGGTGAGACAGGCCCCAGGT
CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAATATTATCCCTATGACCGGTGAGACCTACTACGCTCAGAAA
TTTCAGGGTAGAGTGAAGTATCACCAGCGACGAGTCTACTAGCACCAGCCTATATGGAAGTGTCT
AGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGCCGCTATCAGCCCCCTGGTG
TTCGATAACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTAGC**SEQ ID NO:16**DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRF
SGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTVFGGGTKLTVL**SEQ ID NO:17**GATATCGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGTCAGCGGCGCTCCCGGTGAGAGAGTGAAGTATAGC
TGTCAGCGGCTCTAGCTCTAATATCGGTAATCACTACGTGAAGTGGTATCAGCAGCTGCCCCGC
ACCGCCCCCTAAGCTGCTGATCTATAGAAACAATCACCAGCCTAGCGGCGTGCCCGATAGGTTT
AGCGGATCTAAGTCAGGCACTAGCGCTAGTCTGGCTATCACCAGGACTGCAGTCAGAGGACGAG
GCCGACTACTACTGTGAGTCCTGGGACTATAGCGGCTTTAGCACCGTGTTCGGCGGAGGCACT
AAGCTGACCGTGCTG**SEQ ID NO:18**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGNIIPITGQTYYAQK
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWNWGQGLVTVSS**SEQ ID NO:19**CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGC
TGTAAGCTAGTGGCGGCACCTTCTCTAGCTACGCTATTAGCTGGGTGAGACAGGCCCCAGGT
CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAATATTATCCCTATCACCAGGTGAGACCTACTACGCTCAGAAA
TTTCAGGGTAGAGTGAAGTATCACCAGCGACGAGTCTACTAGCACCAGCCTATATGGAAGTGTCT
AGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGCCGCTATCAGCCCCCTGGTG
TTCGATAACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTAGC**SEQ ID NO:20**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRF

SGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO:21

CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGCTAGTGGCACCCCTGGTCAGAGAGTGACTATTAGC
TGTAGCGGCTCTAGCTCTAATATCGGTAATCACTACGTGAAGTGGTATCAGCAGCTGCCCGGC
ACCGCCCCCTAAGCTGCTGATCTATAGAAACAATCACCGGCTAGCGGCGTGCCCGATAGGTTT
AGCGGATCTAAGTCAGGGACTAGCGCTAGTCTGGCTATTAGCGGCTGCAGTCAGAGGACGAG
GCCGACTACTACTGTCAGTCCTGGGACTATAGCGGCTTTAGCACCGTGTTCCGGCGGAGGCACT
AAGCTGACCGTGCTG

SEQ ID NO:22

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFNSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPITYGTANYAQK
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:23

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGC
TGCAAAGCCTCCGGAGGCACCTTTAATTCTTATGCTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCCTGGG
CAGGGTCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATTCCGATTTATGGCACTGCGAATTACGCGCAGAAG
TTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCGAGCACCGCGTATATGGAAGTGAGC
AGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGCTGCTTATCATCCTCTTGTT
TTTGATAATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

SEQ ID NO:24

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGTGGCGCACCAAGTCAGCGTGTGACCATCTCG
TGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGAATTGGTACCAGCAGTTGCCCGGG
ACGGCGCCGAAACTTCTGATTTATCGTAATAATCATCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTT
AGCGGATCCAAAAGCGGCACCGAGCGGAGCCTTGCGATTACGGGCTGCAAAGCGAAGACGAA
GCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATTATTCTGGTTTTTCTACTGTGTTTGGCGGCGGCACG
AAGTTAACCGTCCTA

SEQ ID NO:25

EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFNSYAISWVRQAPGQGLEWMGWINPFYIGETFYAQ
KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:26

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCC
TGCAAAGCCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGA
CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACCCTTTCTACATCGGCGAGACATTCTACGCCAG
AAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATCACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTG
TCCTCCCTGCGGTCAGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGCCGCCTACCACCCTCTG

GTGTTGACAACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCC

SEQ ID NO:27

GATATCGTGCTGACCCAGCCTCCTTCTGTGTCTGGCGCCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCC
TGCTCTGGCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCGGA
ACCGCCCCTAAGCTGCTGATCTACCGGAACAACCAACCGGCCTTCCGGCGTGCCCGACCGGTTC
TCCGGCTCCAAGTCTGGCACCTCTGCCTCCCTGGCCATCACCGGCCTGCAGTCCGAGGACGAG
GCCGACTACTACTGCCAGTCCTGGGACTACTCCGGCTTCTCAACCGTGTTCCGGCGGAGGCACC
AAGCTGACCGTGCTG

SEQ ID NO:28

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFNSYAI SWVRQAPQG LEWMGNI I PMTGQTYIAQK
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO:29

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCC
TGCAAGGCCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGA
CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCATCCCTATGACCGGCCAGACCTACTACGCCCAGAAG
TTCCAGGGCAGAGTCACCATCACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCC
TCCCTGCGGTGAGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCAGGGCCGCCTACCACCTCTGGTG
TTCGACAACCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCTCC

SEQ ID NO:30

GACATCGTGCTGACACAGCCTCCCTCTGTGTCTGGCGCCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCC
TGCTCTGGCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCGGA
ACCGCCCCTAAGCTGCTGATCTACCGGAACAACCAACCGGCCTTCCGGCGTGCCCGACCGGTTC
TCCGGCTCCAAGTCTGGCACCTCTGCCTCCCTGGCCATCACCGGCCTGCAGTCAGAGGACGAG
GCCGACTACTACTGCCAGTCCTGGGACTACTCCGGCTTCTCCACCGTGTTCCGGCGGAGGCACC
AAGCTGACCGTGCTG

SEQ ID NO:31

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFNSYAI SWVRQAPQG LEWMGNI I PHYGFAYIAQK
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO:32

GAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGC
TGCAAAGCCTCCGGAGGCACCTTTAATTCTTATGCTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGG
CAGGGTCTCGAGTGGATGGGCAATATTATTCCTCATTATGGTTTTGCTTATTATGCTCAGAAG
TTTCAGGGTCGGGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAGC
AGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTGCTGCTTATCATCTCTTGT

TTTGATAATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

SEQ ID NO:33

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCG
TG TAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGAATTGGTACCAGCAGTTGCCCGGG
ACGGCGCCGAAACTTCTGATTTATCGTAATAATCATCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTT
AGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAA
GCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATTATTCTGGTTTTTCTACTGTGTTTGGCGGCGGCACG
AAGTTAACCGTCCTA

SEQ ID NO:34

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFNSYAI SWVRQAPGQGLEWMGNIIPYSGFAYYAQK
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:35

GAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGC
TGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTAATTCTTATGCTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGG
CAGGGTCTCGAGTGGATGGGCAATATTATTCCTTATTCTGGTTTTGCTTATTATGCTCAGAAG
TTTCAGGGTCGGGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACC GCGTATATGGAAGTGAGC
AGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTGCTGCTTATCATCCTCTTGTT
TTTGATAATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

SEQ ID NO:36

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCG
TG TAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGAATTGGTACCAGCAGTTGCCCGGG
ACGGCGCCGAAACTTCTGATTTATCGTAATAATCATCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTT
AGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAA
GCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATTATTCTGGTTTTTCTACTGTGTTTGGCGGCGGCACG
AAGTTAACCGTCCTA

SEQ ID NO:37

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFNSYAI SWVRQAPGQGLEWMGWINPFYIGETFYAQ
KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:38

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTC AAGGTGTCC
TGCAAGGCCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGA
CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACCCTTTCTACATCGGCGAGACATTCTACGCCAG
AAGTTCAGGGCAGAGTCACCATCACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTG
TCCTCCCTGCGGTGAGAGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGCCGCTACCACCTCTG

GTGTTGACAACCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCTCC

SEQ ID NO:39

CAGTCCGTGCTGACCCAGCCTCCTTCTGCCTCTGGCACCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCC
TGCTCTGGCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCCGA
ACCGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACCGGAACAACCACCGGCCTTCCGGCGTGCCCGACCGGTTT
TCCGGCTCCAAGTCTGGCACCTCCGCCTCCCTGGCCATCTCTGGCCTGCAGTCAGAGGACGAG
GCCGACTACTACTGCCAGTCCTGGGACTACTCCGGCTTCTCCACCGTGTTCCGGCGAGGCACC
AAGCTGACCGTGCTG

SEQ ID NO:40

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFNSYAIWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYIAQK
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:41

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCC
TGCAAGGCCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCCATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGA
CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCATCCCTATGACCGGCCAGACCTACTACGCCCAGAAG
TTCCAGGGCAGAGTCACCATCACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCC
TCCCTGCGGTGAGAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCAGGGCCGCTACCACCCTCTGGTG
TTCGACAACCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCTCC

SEQ ID NO:42

CAGTCCGTGCTGACCCAGCCTCCTTCTGCCTCTGGCACCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCC
TGCTCTGGCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCCGA
ACCGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACCGGAACAACCACCGGCCTTCCGGCGTGCCCGACCGGTTT
TCCGGCTCCAAGTCTGGCACCTCCGCCTCCCTGGCCATCTCTGGCCTGCAGTCAGAGGACGAG
GCCGACTACTACTGCCAGTCCTGGGACTACTCCGGCTTCTCCACCGTGTTCCGGCGAGGCACC
AAGCTGACCGTGCTG

SEQ ID NO:43

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFKSYAIWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYIAQK
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

SEQ ID NO:44

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGC
TGTAAGCTAGTGGCGGCACCTTCAAGTCCTACGCTATTAGCTGGGTGAGACAGGCCCCAGGT
CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAATATTATCCCTATGACCGGTGAGACCTACTACGCTCAGAAA
TTTCAGGGTAGAGTGAATATCACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCT
AGCCTGAGATCAGAGGACACCGCGTCTACTACTGCGCTAGAGCCGCTATCACCCCTGGTG
TTCGATAACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCTCC
GTGTTCCCTCTGGCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGCGCCCTGACCTCTGGC
GTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTCACA
GTGCCTTCAAGCAGCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAAC
ACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCTCCCTGC
CCTGCTCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACC
CTGATGATCTCCCGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCT
GAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGG
GAGGAACAGTACAACCTACCGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAGGACTGG
CTGAACGGCAAAGAGTACAAGTCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAAAAG
ACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGCCGG
GAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGAT
ATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCTGTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAG
CAGGGCAACGTGTTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG
TCCCTGTCCCTGTCTCCCGCAAG

SEQ ID NO:45

DIVLTQPPSVSGAPGQVRTISCSGSSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRF
SGSKSGTSASLAITGLQSEADYQCQSWDYSGFSTVFGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS
EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW
KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:46

GATATCGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGTCAGCGCGCTCCCGGTGAGAGAGTGAATATTAGC
TGTCAGCGGCTCTAGCTCTAATATCGGTAATCACTACGTGAAGTGGTATCAGCAGCTGCCCCGC
ACCGCCCCCTAAGCTGTGATCTATAGAAACAATCACCGGCTAGCGGCGTGCCCGATAGGTTT
AGCGGATCTAAGTCAGGCACTAGCGCTAGTCTGGCTATCACCGGACTGCAGTCAGAGGACGAG
GCCGACTACTACTGTGAGTCTGGGACTATAGCGGCTTTAGCACCGTGTTCGGCGGAGGCACT
AAGCTGACCGTGTGGGTGAGCCTAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCTGTTCCTCCCCCAGCAGC

GAGGAGCTGCAGGCCAACAAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCC
 GTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCC
 AGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGG
 AAGAGCCACAGGTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACCGTG
 GCCCCAACCGAGTGCAGC

SEQ ID NO:47

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFNSYAIISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYIAQK
 FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWQGTLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

SEQ ID NO:48

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCC
 TGCAAGGCCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGA
 CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCATCCCTATGACCGGCCAGACCTACTACGCCCAGAAG
 TTCCAGGGCAGAGTCACCATCACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCC
 TCCCTGCGGTGACAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCAGGGCCGCTACCACCCTCTGGTG
 TTCGACAACCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCC
 GTGTTCCCTCTGGCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTG
 GTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTTGAACTCTGGCGCCCTGACCTCTGGC
 GTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTCACA
 GTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAAC
 ACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGC
 CCTGCTCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACC
 CTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGATCCT
 GAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGG
 GAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG
 CTGAACGGCAAAGAGTACAAGTCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAAG
 ACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGCCGG
 GAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGAT
 ATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCTGTG
 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAACCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAG

CAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG
TCCCTGTCCCTGTCTCCCGCAAG

SEQ ID NO:49

GACATCGTGTGACACAGCCTCCCTCTGTGTCTGGCGCCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCC
TGCTCTGGCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCGGA
ACCGCCCCTAAGCTGCTGATCTACCGGAACAACCACCGGCCTTCCGGCGTGCCCGACCGGTTT
TCCGGCTCCAAGTCTGGCACCTCTGCCTCCCTGGCCATCACCGGCCTGCAGTCAGAGGACGAG
GCCGACTACTACTGCCAGTCTGGGACTACTCCGGCTTCTCCACCGTGTTCCGGCGGAGGCACC
AAGCTGACCGTGTGGGACAGCCTAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCTGTTCCCCCAGCAGC
GAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCC
GTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGAGACCACCACCCCC
AGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGG
AAGAGCCACAGGTCTTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGAAAAAGACCGTG
GCCCCAACCGAGTGCAGC

SEQ ID NO:50

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFNSYAISWVRQAPQGLEWMGWINPFYIGETFYAQ
KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGTTLTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

SEQ ID NO:51

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCC
TGCAAGGCCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGA
CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACCCCTTCTACATCGGCGAGACATTCTACGCCCAG
AAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATCACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTG
TCCTCCCTGCGGTGAGAGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGCCGCCTACCACCCTCTG
GTGTTTCGACAACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCC
TCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTGC
CTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTTGAACTCTGGCGCCCTGACCTCT
GGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTC
ACAGTGCCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCC
AACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCT

TGCCCTGCTCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGAC
 ACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGAT
 CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCT
 CGGGAGGAACAGTACAACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAC
 TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAA
 AAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGC
 CGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCC
 GATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACATAAGACCACCCCTCCT
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGG
 CAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG
 AAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGCAAG

SEQ ID NO:52

GATATCGTGCTGACCCAGCCTCCTTCTGTGTCTGGCGCCCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCC
 TGCTCTGGCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCGGA
 ACCGCCCTAAGCTGCTGATCTACCGGAACAACCACCGGCCCTCCGGCGTGCCCGACCGGTTT
 TCCGGCTCCAAGTCTGGCACCTCTGCCTCCCTGGCCATCACCGGCCGTCAGTCCGAGGACGAG
 GCCGACTACTACTGCCAGTCTGGGACTACTCCGGCTTCTCAACCGTGTTCGGCGGAGGCACC
 AAGCTGACCGTGTGGGACAGCCTAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCTGTTCCCCCAGCAGC
 GAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCC
 GTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCC
 AGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGG
 AAGAGCCACAGGTCTACAGTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACCGTG
 GCCCCAACCGAGTGCAGC

SEQ ID NO:53

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNSYAISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYIAQK
 FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAHYHPLVFDNWQGTLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

SEQ ID NO:54

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCC
 TGCAAGGCCCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCCATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGA

CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCATCCCTATGACCGGCCAGACCTACTACGCCCAGAAG
 TTCCAGGGCAGAGTCACCATCACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGTCC
 TCCCTGCGGTGAGAGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGCCGCCTACCACCTCTGGTG
 TTCGACAACCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCTCC
 GTGTTCCCTCTGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTG
 GTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCTGGC
 GTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTCACA
 GTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAAC
 ACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGC
 CCTGCTCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACC
 CTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCT
 GAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCTCGG
 GAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGG
 CTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAAAAG
 ACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGCCGG
 GAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGAT
 ATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCTGTG
 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAG
 CAGGGCAACGTGTTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG
 TCCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAG

SEQ ID NO:55

CAGTCCGTGCTGACCCAGCCTCCTTCTGCCTCTGGCACCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCC
 TGCTCTGGCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCGGA
 ACCGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACCGGAACAACCACCGCCTTCCGGCGTGCCCGACCGGTTT
 TCCGGCTCCAAGTCTGGCACCTCCGCCTCCCTGGCCATCTCTGGCCTGCAGTCAGAGGACGAG
 GCCGACTACTACTGCCAGTCTTGGGACTACTCCGGCTTCTCCACCGTGTTCCGGCGGAGGCACC
 AAGCTGACCGTGTCTGGGACAGCCTAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCTGTTCACCCCCAGCAGC
 GAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCC
 GTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCC
 AGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCGAGCAGTGG
 AAGAGCCACAGGTCTTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACCGTG
 GCCCCAACCGAGTGCAGC

SEQ ID NO:56

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFNSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPITYGTANYAQK
 FQGRVITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGLVTVSSASTKGPS

VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

SEQ ID NO:57

CAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGC
 TGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTAATTCTTATGCTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGG
 CAGGGTCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATTCCGATTTATGGCACTGCGAATTACGCGCAGAAG
 TTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAGC
 AGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGCTGCTTATCATCTCTTGT
 TTTGATAATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCG
 GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGTGCGCTG
 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC
 GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC
 GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
 ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCCAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCCAACCGTGC
 CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACC
 CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCCT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
 GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGG
 CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAA
 ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCCG
 GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
 ATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTG
 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
 CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
 AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:58

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTGAGCGTGTGACCATCTCG
 TGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGAATTGGTACCAGCAGTTGCCCGG
 ACGGCGCCGAACTTCTGATTTATCGTAATAATCATCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTT
 AGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAA
 GCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATTATTCTGGTTTTTCTACTGTGTTTGGCGGCGGCACG

AAGTTAACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCT
GAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCC
GTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACC
TCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGG
AAGTCCCAACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTG
GCCCCCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:59

GGTFNSY

SEQ ID NO:60

IPMTGQ

SEQ ID NO:61

AAYHPLVFDN

SEQ ID NO:62

SSSNIGNHY

SEQ ID NO:63

RNN

SEQ ID NO:64

WDYSGFST

SEQ ID NO:65

GGTFKSY

SEQ ID NO:66

GGTFSSY

SEQ ID NO:67

IPITGQ

SEQ ID NO:68

GFTFSSY

SEQ ID NO:69

SGEGSN

SEQ ID NO:70

VMIGYGFDY

SEQ ID NO:71

SQSIFNY

SEQ ID NO:72

DSS

SEQ ID NO:73

YSGFLF

SEQ ID NO:74

TGSYYWN

SEQ ID NO:75

EINHMGITYYNPSLKG

SEQ ID NO:76

EIHWSGPTFYNPSLKS

SEQ ID NO:77

EIHGHGFTFYNPSLKS

SEQ ID NO:78

EIQSPGYTFYNNPSLKS

SEQ ID NO:79

TTRYWMSHILAYGMDY

SEQ ID NO:80

SGSSSNIGNHYVS

SEQ ID NO:81

ANTKRPS

SEQ ID NO:82

SSYDGSQSIV

SEQ ID NO:83

QVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKLEWIGEINHMGITYYNP
SLKGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:84

CAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCTGGTGAAACCGGGCGAAACCTGAGCCTGACC
TGCACCGTTTCCGGAGGTAGCATTCTACTGGTTCTTATTATTGGAATTGGATTCGCCAGGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATTGGCGAGATCAATCATATGGGCATTACCTATTATAATCCG
AGCCTGAAAGGCCGGGTGACCATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGAAACTG
AGCAGCGTGACGGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTACTACTCGTTATTGGATG
TCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

SEQ ID NO:85

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGNHYVSWYQQLPGTAPKLLIYANTKRPSGVPDRF
SGSKSGTSASLAITGLQSEADYYCSSYDGSQSIVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO:86

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCG
TG TAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGG
ACGGCGCCGAACTTCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTT
AGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAA
GCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATGGTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGCGGCACGAAG
TTAACCGTCCTA

SEQ ID NO:87

EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKGLEWIGEIQSPGYTFYNP
SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:88

GAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAAACCCTGAGCCTGACC
TGCAACCGTTTCCGGAGGTAGCATTCTACTGGTTCTTATTATTGGAATTGGATTGCCAGGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATTGGCGAGATTAGTCTCCTGGTTATACTTTTTATAATCCT
TCTCTTAAGTCTCGGGTGACCATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGAACTG
AGCAGCGTGACGGCGGCGGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCTACTACTCGTTATTGGATG
TCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACGGTTAGCTCA

SEQ ID NO:89

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCG
TG TAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGG
ACGGCGCCGAACTTCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTT
AGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAA
GCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATGGTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGCGGCACGAAG
TTAACCGTCCTA

SEQ ID NO:90

EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKGLEWIGEIWHSGPTFYNP
SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:91

GAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAAACCCTGAGCCTGACC
TGCAACCGTTTCCGGAGGTAGCATTCTACTGGTTCTTATTATTGGAATTGGATTGCCAGGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATTGGCGAGATTGGCATTCTGGTCCTACTTTTTATAATCCT

TCTCTTAAGTCTCGGGTGACCATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGAAACTG
 AGCAGCGTGACGGCGGCGGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTACTACTCGTTATTGGATG
 TCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

SEQ ID NO:92

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCG
 TGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGG
 ACGGCGCCGAAACTTCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTT
 AGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAA
 GCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATGGTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAG
 TTAACCGTCCTA

SEQ ID NO:93

EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKGLEWIGEIHGHGFTFYNP
 SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:94

GAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCCTGGTGAAACCGGGCGAAACCCTGAGCCTGACC
 TGCACCGTTTCCGGAGGTAGCATTTCTACTGGTTCTTATTATTGGAATTGGATTCCGCCAGGCC
 CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATTGGCGAGATTCATGGTCATGGTTTTACTTTTTATAATCCT
 TCTCTTAAGTCTCGGGTGACCATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGAAACTG
 AGCAGCGTGACGGCGGCGGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTACTACTCGTTATTGGATG
 TCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

SEQ ID NO:95

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCG
 TGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGG
 ACGGCGCCGAAACTTCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTT
 AGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAA
 GCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATGGTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAG
 TTAACCGTCCTA

SEQ ID NO:96

QVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKGLEWIGEINHMGITYYNP
 SLKGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGQGLTVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV

KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:97

CAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCTGGTGAAACCGGGCGAAACCTGAGCCTGACC
TGACCGTTTTCCGGAGGTAGCATTTCTACTGGTTCTTATTATTGGAATTGGATTCGCCAGGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATTGGCGAGATCAATCATATGGGCATTACCTATTATAATCCG
AGCCTGAAAGGCCGGGTGACCATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGAAACTG
AGCAGCGTGACGGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTACTACTCGTTATTGGATG
TCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
GCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
ACAGCGGGCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGGAAC
TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA
ACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTTC
CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTC
ACCGTCTGTCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
CTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG
TACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
TACAAGACCACGCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:98

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGNHYVSWYQQLPGTAPKLLIYANTKRPSGVPDRF
SGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCSSYDGSQSIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSE
ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWK
SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:99

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGTGGCGCACCCAGGTGAGCGTGTGACCATCTCG
TGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCGGG
ACGGCGCCGAACTTCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTT
AGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAA

GCGGATTATTATTGCTCTTCTATGATGGTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAG
 TTAACCGTCCTAGGTGAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAG
 GAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTG
 ACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACCCCTCC
 AAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAG
 TCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCC
 CCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:100

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFNSYAIWVRQAPGQGLEWMGWINPFYIGETFYAQ
 KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGTTLTVSSASTKGF
 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
 TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

SEQ ID NO:101

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTCAAGGTGTCC
 TGCAAGGCCTCCGGCGGCACCTTCAACTCCTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGA
 CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACCCTTTCTACATCGGCGAGACATTCTACGCCAG
 AAGTTCAGGGCAGAGTCACCATCACCGCCGACGAGTCCACCTCCACCGCTACATGGAGCTG
 TCCTCCCTGCGGTGAGAGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGCCGCCTACCACCCTCTG
 GTGTTGACAACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCC
 TCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTGC
 CTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCT
 GCGGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTC
 ACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCC
 AACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCC
 TGCCCTGCTCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCCAAGGAC
 ACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGAT
 CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGCGGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCT
 CGGGAGGAACAGTACAACCTCACCTACCGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACACAGGAC
 TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAA
 AAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTGTACACCTGCCACCCAGC
 CGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCC

GATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCT
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGG
 CAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG
 AAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGCAAG

SEQ ID NO:102

CAGTCCGTGCTGACCCAGCCTCCTTCTGCCTCTGGCACCCCTGGCCAGAGAGTGACCATCTCC
 TGCTCTGGCTCCTCCTCCAATATCGGCAACCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCGGA
 ACCGCCCCAAGCTGCTGATCTACCGGAACAACCAACCGGCTTCCGGCGTGCCCGACCGGTTT
 TCCGGCTCCAAGTCTGGCACCTCCGCTCCCTGGCCATCTCTGGCCTGCAGTCAGAGGACGAG
 GCCGACTACTACTGCCAGTCTGGGACTACTCCGGCTTCTCCACCGTGTTCCGGCGGAGGCACC
 AAGCTGACCGTGCTGGGACAGCCTAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCTGTTCCCCCAGCAGC
 GAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCC
 GTGACCGTGCCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGCCGGCGTGAGAGACCACCACCCCC
 AGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCAGCAGTGG
 AAGAGCCACAGGTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAGACCGTG
 GCCCCAACCGAGTGACGC

SEQ ID NO:103

EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKLEWIGEIQSPGYTFYNP
 SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGQGLVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:104

GAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAAACCTGAGCCTGACC
 TGCACCGTTTCCGGAGGTAGCATTTCTACTGGTTCTTATTATTGGAATTGGATTCGCCAGGCC
 CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATTGGCGAGATTCAGTCTCCTGGTTATACTTTTTATAATCCT
 TCTCTTAAGTCTCGGGTGACCATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACAGTTTAGCCTGAAACTG
 AGCAGCGTGACGGCGGCGGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGGTACTACTCGTTATTGGATG
 TCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
 GCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAAC
 TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC

TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
 GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA
 ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCAGCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG
 GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCTTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
 CTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG
 TACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTC
 AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAA
 TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACC
 GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
 CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:105

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCG
 GTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGG
 ACGGCGCCGAAACTTCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTT
 AGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAA
 GCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATGGTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAG
 TTAACCGTCTTAGGTGAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAG
 GAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTG
 ACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCC
 AAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAG
 TCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCC
 CCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:106

SYAIH

SEQ ID NO:107

VISGEGSNTYYADSVKG

SEQ ID NO:108

VMIGYGFDY

SEQ ID NO:109

RASQSIFNYLN

SEQ ID NO:110

DSSTLQS

SEQ ID NO:111

LQYSGFLETT

SEQ ID NO:112

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVSVISGESENNTYYADS
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVMIGYGFQDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:113

CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGC
TGCCTGCTAGTGGCTTCACCTTCTCTAGCTACGCTATTCAGTGGGTGAGACAGGCCCTGGT
AAAGGCCTGGAGTGGGTGTCAGTGATTAGCGGCGAGGGCTCTAACACCTACTACGCCGATAGC
GTGAAGGGCCGGTTCACTATCTCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAAT
AGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGTGATGATCGGCTACGGCTTC
GACTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTAGC

SEQ ID NO:114

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSI FNYLNWYQQKPKAPKLLIYDSSTLQSGVPSRFS
GSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCLQYSGFLETFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:115

GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATC
ACCTGTAGAGCCTCTCAGTCTATCTTTAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAA
GCCCCTAAGCTGCTGATCTACGACTCTAGCACCTGCAGTCAGGCGTGCCTCTAGGTTTAGC
GGTAGCGGTAGTGGCACCAGCTTCACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCT
ACCTACTACTGCCTGCAGTATAGCGGCTTCCTGTTCACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAG
ATTAAG

SEQ ID NO:116

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVSVISGESENNTYYADS
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVMIGYGFQDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCTPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

SEQ ID NO:117

CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGC
 TGCCTGCTAGTGGCTTCACCTTCTCTAGCTACGCTATTCACTGGGTCAGACAGGCCCTGGT
 AAAGGCCTGGAGTGGGTGTCAGTGATTAGCGGCGAGGGCTCTAACACCTACTACGCCGATAGC
 GTGAAGGGCCGGTTCACTATCTCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCGTACCTGCAGATGAAT
 AGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGTGATGATCGGCTACGGCTTC
 GACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCCCTCCGTG
 TTCCCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTC
 AAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTG
 CACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTCACAGTG
 CCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACC
 AAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCT
 GCTCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTG
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCTGAA
 GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAG
 GAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG
 AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAAAAGACA
 ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGCCGGGAG
 GAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCTTCCGATATC
 GCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACACAAGACCACCCCTCTGTGCTG
 GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAG
 GGCAACGTGTTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCC
 CTGTCCCTGTCTCCCGCAAG

SEQ ID NO:118

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI FNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDSSTLQSGVPSRFS
 GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCLQYSGFLFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKH
 KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:119

GATATTGAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGAATC
 ACCTGTAGAGCCTCTCAGTCTATCTTTAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAA
 GCCCCTAAGCTGCTGATCTACGACTCTAGCACCCCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGC
 GGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCT
 ACCTACTACTGCCTGCAGTATAGCGGCTTCTGTTCACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAG
 ATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCACGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAG

AGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG
TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGC
AAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT
AAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
AGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO:120

TFSIS

SEQ ID NO:121

GIIPIFGTANYAQKFQG

SEQ ID NO:122

TIQSSGENKFYADSVKG

SEQ ID NO:123

GGYGGYYYFDY

SEQ ID NO:124

RASQSIENRLN

SEQ ID NO:125

KGSTLQS

SEQ ID NO:126

HQYSGLLFT

SEQ ID NO:127

QQHKVWLTT

SEQ ID NO:128

QQHYVWSTT

SEQ ID NO:129

QQHYQWLTT

SEQ ID NO:130

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTFSISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQK
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGYGGYYYFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:131

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGC
TGTAAGCTAGTGGCGGCACCTTCAGCACCTTCTCTATTAGCTGGGTCAGACAGGCCCCAGGT
CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGGAATTATCCCTATCTTCGGCACCGCTAACTACGCTCAGAAA

TTTCAGGGTAGAGTGACTATCACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCT
AGCCTGAGATCAGAGGACACCGCGTCTACTACTGCGCTAGGGGCGGCTACGGCGGCTATTAC
TACTTCGACTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTAGC

SEQ ID NO:132

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIENRLNHWYQQKPKAPKLLIYKGSTLQSGVPSRFS
GSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQHKVWLTTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:133

GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATC
ACCTGTAGAGCCTCTCAGTCTATCTCTAATAGGCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAA
GCCCCAAGCTGCTGATCTATAAGGGCTCTACCCTGCAGTCAGGCGTGCCTCTAGGTTTAGC
GGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCT
ACCTACTACTGTGAGCAGCACAAAGTGTGGCTGACTACCTTCGGTCAGGGCCTAAGGTCGAG
ATTAAG

SEQ ID NO:134

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTFSISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFIPTANYAQK
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYGGYYFDYWGQGLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

SEQ ID NO:135

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGC
TGTAAGCTAGTGGCGGCACCTTCAGCACCTTCTCTATTAGCTGGGTGAGACAGGCCCCAGGT
CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGGAATTATCCCTATCTTCGGCACCGCTAACTACGCTCAGAAA
TTTCAGGGTAGAGTGACTATCACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCT
AGCCTGAGATCAGAGGACACCGCGTCTACTACTGCGCTAGGGGCGGCTACGGCGGCTATTAC
TACTTCGACTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCC
TCCGTGTTCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTGC
CTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCT
GGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTC
ACAGTGCCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCC
AACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCTCC

TGCCCTGCTCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGAC
 ACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGAT
 CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCT
 CGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
 TGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAA
 AAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTGTACACCTGCCACCCAGC
 CGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCC
 GATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCT
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGG
 CAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG
 AAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGCAAG

SEQ ID NO:136

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSI SNRLN WYQQKPKAPKLLIYKGSTLQSGVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHKVWLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKH
 KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:137

GATATTGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATC
 ACCTGTAGAGCCTCTCAGTCTATCTCTAATAGGCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAA
 GCCCCTAAGCTGCTGATCTATAAGGGCTCTACCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGC
 GGTAGCGGTAGTGGCACCAGCTTACCCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCT
 ACCTACTACTGTGTCAGCAGCACAAAGTGTGGCTGACTACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAG
 ATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAG
 AGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG
 TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGC
 AAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT
 AAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
 AGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO:138

QVQLLES G GGLVQP G GSLRLS CAASGFT FSSYAIHWVRQAPGKGLEWVSTIQSSGENKFYADS
 VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARVMIGYGFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:139

CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGC
 TGGCTGCTAGTGGCTTACCTTCTCTAGCTACGCTATTCACTGGGTGAGACAGGCCCTGGT

AAAGGCCTGGAGTGGGTCAGCACTATTTCAGTCTAGCGGCGAGAACAAAGTTCTACGCCGATAGC
GTGAAGGGCCGGTTCAGTATCTCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAAT
AGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGTGATGATCGGCTACGGCTTC
GACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGC

SEQ ID NO:140

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSIIFYLNWYQQKPGKAPKLLIYDSSTLQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCHQYSGLLFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:141

GATATTGAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATC
ACCTGTAGAGCCTCTCAGTCTATCTTTAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAA
GCCCCTAAGCTGCTGATCTACGACTCTAGCACCCCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGC
GGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCT
ACCTACTACTGTCACCACTATAGCGGCCTGCTGTTACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAG
ATTAAG

SEQ ID NO:142

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVSTIQSSGENKFYADS
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVMIGYGFYDWGQGLTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGK

SEQ ID NO:143

CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGC
TGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTCTCTAGCTACGCTATTCAGTGGGTCAGACAGGCCCTGGT
AAAGGCCTGGAGTGGGTCAGCACTATTTCAGTCTAGCGGCGAGAACAAAGTTCTACGCCGATAGC
GTGAAGGGCCGGTTCAGTATCTCTAGGGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAAT
AGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGTGATGATCGGCTACGGCTTC
GACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCTCCGTG
TTCCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTC
AAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTG
CACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTCACAGTG
CCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACC

AAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGCCCT
 GCTCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTG
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCTGAA
 GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAG
 GAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCAACGAGGACTGGCTG
 AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAAAAGACA
 ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGCCGGGAG
 GAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATC
 GCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACACAAGACCACCCCTCCTGTGCTG
 GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAG
 GGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCC
 CTGTCCCTGTCTCCCGCAAG

SEQ ID NO:144

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSI FNYLNWYQQKPKAPKLLIYDSSTLQSGVPSRFS
 GSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCHQYSGLLFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLK
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKH
 KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:145

GATATTGAGTACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTACTATC
 ACCTGTAGAGCCTCTCAGTCTATCTTTAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAA
 GCCCCTAAGCTGCTGATCTACGACTCTAGCACCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGC
 GGTAGCGGTAGTGGCACCAGCTTACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCT
 ACCTACTACTGTACACAGTATAGCGGCCTGCTGTTACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAG
 ATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCGACGACGAGCAGCTGAAG
 AGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG
 TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGC
 AAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT
 AAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
 AGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO:146

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGC
 TGTAAGCTAGTGGCGGCACCTTCAGCACCTTCTCTATTAGCTGGGTGAGACAGGCCCCAGGT
 CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGGAATTATCCCTATCTTCGGCACCGCTAACTACGCTCAGAAA
 TTTCAGGGTAGAGTACTATACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCT
 AGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGGGGCGGCTACGGCGGCTATTAC

TACTTCGACTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTAGC

SEQ ID NO:147

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSISNRLNHWYQQKPKAPKLLIYKGSTLQSGVPSRFS
GSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQHYVWSTTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:148

GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATC
ACCTGTAGAGCCTCTCAGTCTATCTCTAATAGGCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAA
GCCCCAAGCTGCTGATCTATAAGGGCTCTACCCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGC
GGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCT
ACCTACTACTGTCAGCAGCACTACGTGTGGTCTACTACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAG
ATTAAG

SEQ ID NO:149

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGC
TGTAAGCTAGTGGCGGCACCTTCAGCACCTTCTCTATTAGCTGGGTGAGACAGGCCCCAGGT
CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGGAATTATCCCTATCTTCGGCACCGCTAACTACGCTCAGAAA
TTTCAGGGTAGAGTGACTATCACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCTATATGGAAGTGTCT
AGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGGGGCGGCTACGGCGGCTATTAC
TACTTCGACTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCC
TCCGTGTTCCTCTGGCCCCCTTCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTGC
CTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGCGCCCTGACCTCT
GGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTC
ACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCC
AACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCC
TGCCCTGCTCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCCAAGGAC
ACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGAT
CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCT
CGGGAGGAAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACACGAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAA
AAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTGTACACCTGCCACCCAGC
CGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCC
GATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCT
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGG
CAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG
AAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGCAAG

SEQ ID NO:150

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSISNRLNHWYQQKPGKAPKLLIYKGSTLQSGVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQHYVWSTTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
 SGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKH
 KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:151

GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATC
 ACCTGTAGAGCCTCTCAGTCTATCTCTAATAGGCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAA
 GCCCCTAAGCTGCTGATCTATAAGGGCTCTACCCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGC
 GGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCT
 ACCTACTACTGTGAGCAGCACTACGTGTGGTCTACTACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAG
 ATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAG
 AGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACCTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG
 TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGC
 AAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT
 AAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
 AGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO:152

CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGC
 TGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCTACTTTCTCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCCCGGGC
 CAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATCCCGATCTTCGGCACTGCGAACTACGCCAGAAA
 TTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCCGATGAAAGCACCAGCACCGCCTATATGGAAGTGAGC
 AGCCTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTGGTTACGGTGGTTACTAC
 TACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA

SEQ ID NO:153

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSISNRLNHWYQQKPGKAPKLLIYKGSTLQSGVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQHYQWLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:154

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATT
 ACCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTTCTAACCGTCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAA
 GCGCCGAAACTATTAATCTACAAAGGTTCTACTCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGC
 GGCAGCGGATCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATTAGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCG
 ACCTATTATTGCCAGCAGCATTACCAAGTGCTGACTACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAA
 ATTAAA

SEQ ID NO:155

CAGGTGCAATTGGTGAGCGGTGCCGAAGTGAAAAACCGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGC
TGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCTACTTTCTCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCCCCGGGC
CAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATCCCGATCTTCGGCACTGCGAACTACGCCAGAAA
TTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCCGATGAAAGCACCAGCACCGCTATATGGAAGTGAAGC
AGCCTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTGGTTACGGTGGTTACTAC
TACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCA
TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC
CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG
ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC
AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCG
TGCCAGCACCTGAAGCAGCGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC
TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG
AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACGCTCCC
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:156

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIENRLNRYQKPKAPKLLIYKSTLQSGVPSRFS
GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQHYQWLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:157

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATT
ACCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTTCTAACCGTCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAA
GCGCCGAAACTATTAATCTACAAAGGTTCTACTCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGC
GGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCCTGACCATTAGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCG
ACCTATTATTGCCAGCAGCATTACCAAGTGGCTGACTACCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAA
ATTAAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAG

AGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG
 TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCACCGAGCAGGACAGC
 AAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC
 AAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
 CGGGGCGAGTGT

SEQ ID NO:158

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGNIIPITGQTYAQK
 FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCKDTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

SEQ ID NO:159

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGC
 TGTAAGCTAGTGGCGGCACCTTCTCTAGCTACGCTATTAGCTGGGTGAGACAGGCCCCAGGT
 CAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAATATTATCCCTATCACCGGTGAGACCTACTACGCTCAGAAA
 TTTCAGGGTAGAGTGACTATCACCGCCGACGAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCT
 AGCCTGAGATCAGAGGACACCGCGTCTACTACTGCGCTAGAGCCGCCTATCACCCCTGGTG
 TTCGATAACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCCCTCC
 GTGTTCCCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGTGCCTG
 GTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGCGCCCTGACCTCTGGC
 GTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTCACA
 GTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAAC
 ACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCG
 CCTGTCTCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCCAAGGACACC
 CTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCT
 GAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGG
 GAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCAAGGACTGG
 CTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAAAAG
 ACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTGTACACCTGCCACCCAGCCGG
 GAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTCCGAT
 ATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCTGTG
 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAG

CAGGGCAACGTGTTCTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG
TCCCTGTCCCTGTCTCCCGCAAG

SEQ ID NO:160

QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRF
SGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS
EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQW
KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:161

CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGCTAGTGGCACCCCTGGTCAGAGAGTGACTATTAGC
TG TAGCGGCTCTAGCTCTAATATCGGTAATCACTACGTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCCCGC
ACCGCCCTAAGCTGCTGATCTATAGAAACAATCACCGGCTAGCGGCGTGCCCGATAGGTTT
AGCGGATCTAAGTCAGGGACTAGCGCTAGTCTGGCTATTAGCGGCTGCAGTCAGAGGACGAG
GCCGACTACTACTGTCAGTCCTGGGACTATAGCGGCTTTAGCACCGTGTTCCGGCGAGGCACT
AAGCTGACCGTGCTGGGTGAGCCTAAGGCTGCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGC
GAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCC
GTGACCGTGCCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCC
AGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGG
AAGAGCCACAGTCTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGAAAAAGACCGTG
GCCCCAACCGAGTGCAGC

SEQ ID NO:162

GGSISTGSY

SEQ ID NO:163

QSPGY

SEQ ID NO:164

TTRYWMSHILAYGMDY

SEQ ID NO:165

SSSNIGNHY

SEQ ID NO:166

ANT

SEQ ID NO:167

YDGSQSI

SEQ ID NO:168

EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKLEWIGEIIWHSIPTFYNP

SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGQGLVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:169

GAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAAACCTGAGCCTGACC
 TGCACCGTTTCCGGAGGTAGCATTCTACTGGTCTTATTATTGGAATTGGATTGCCCAGGCC
 CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATTGGCGAGATTTGGCATCTCTGGTCCTACTTTTTATAATCCT
 TCTCTTAAGTCTCGGGTGACCATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGAAACTG
 AGCAGCGTGACGGCGCGGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCTACTACTCGTTATTGGATG
 TCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
 GCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAAC
 TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC
 TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
 GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA
 ACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCAGCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
 CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG
 GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCTC
 ACCGTCTTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
 CTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG
 TACACCTTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTC
 AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
 TACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
 GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
 CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:170

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGNHYVSWYQQLPGTAPKLLIYANTKRPSGVPDRF
 SGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCSSLYDGSQSIIVFGGGTKLTVLQPKAAPSVTLFPPSSE
 ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSTPEQWK
 SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:171

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCG
TGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGG
ACGGCGCCGAAACTTCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTT
AGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCAGCCTTGCGATTACGGGCCGCAAAGCGAAGACGAA
GCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATGGTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAG
TTAACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAG
GAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTG
ACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCTCC
AAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAG
TCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCC
CCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:172

EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSISTGSYYWNWIRQAPGKGLEWIGEIHGHGFTFYNP
SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTTRYWMSHILAYGMDYWGGQTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:173

GAGGTGCAATTGCAAGAAAGTGGTCCGGGCCTGGTGAAACCGGGCGAAACCTGAGCCTGACC
TGCACCGTTTCCGGAGGTAGCATTCTACTGGTCTTATTATTGGAATTGGATTGCCAGGCC
CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGATTGGCGAGATTTCATGGTCATGGTTTTACTTTTTATAATCCT
TCTCTTAAGTCTCGGGTGACCATTAGCGTTGATACTTCGAAAAACCAGTTTAGCCTGAAACTG
AGCAGCGTGACGGCGGCGGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTACTACTCGTTATTGGATG
TCTCATATTCTTGCTTATGGTATGGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
GCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAC
TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA
ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCAGCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
CCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG

GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTC
 ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
 CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG
 TACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTC
 AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAAC
 TACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
 GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
 CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:174

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTIISCSGSSSNIGNHYVSWYQQLPGTAPKLLIYANTKRPSGVPDRF
 SGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCSSYDGSQSIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSE
 ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWK
 SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:175

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTGAGCGTGTGACCATCTCG
 TGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCCGG
 ACGGCGCCGAAACTTCTGATTTATGCTAATACTAAGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTT
 AGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAA
 GCGGATTATTATTGCTCTTCTTATGATGGTTCTCAGTCTATTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAG
 TTAACCGTCCTAGGTGAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAG
 GAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTG
 ACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACACCTCC
 AAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAG
 TCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCC
 CCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:176

EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFNSYAIISWVRQAPGQGLEWMGNIIPHYGFAYYAQK
 FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

SEQ ID NO:177

GAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGC
TGCAAAGCCTCCGGAGGCACCTTTTAATTCTTATGCTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCCTGGG
CAGGGTCTCGAGTGGATGGGCAATATTATTCCTCATTATGGTTTTGCTTATTATGCTCAGAAG
TTTCAGGGTCTGGGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAG
AGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGCTGCTTATCATCCTCTTGTT
TTTGATAATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCG
GTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC
GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
ACCAAGTGAGACAAGAGAGTTGAGCCCCAAATCTTGAGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAAGCAGCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACC
CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCTT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG
GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:178

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISSGSSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRF
SGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS
EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW
KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:179

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCG
TGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGAATTGGTACCAGCAGTTGCCCGGG
ACGGCGCCGAACTTCTGATTTATCGTAATAATCATCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTT
AGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAAAGCGAAGACGAA
GCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATTATTCTGGTTTTTCTACTGTGTTTGGCGCGGCACG
AAGTTAACCGTCCTAGGTACGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCT

GAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCC
 GTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCC
 TCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGG
 AAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTG
 GCCCCACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:180

EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFNSYAIISWVRQAPGQGLEWMGNIIPYSGFAYYAQK
 FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAAYHPLVFDNWGQGTLLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSPD
 IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

SEQ ID NO:181

GAGGTGCAATTGGTTCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGC
 TGCAAAGCCTCCGGAGGCACTTTTAATTCTTATGCTATTTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCGTGGG
 CAGGGTCTCGAGTGGATGGGCAATATTATTCCTTATTCTGGTTTTGCTTATTATGCTCAGAAG
 TTTCAGGGTCCGGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGGAGC
 AGCCTGCGTAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGCTGCTTATCATCTCTTGT
 TTTGATAAATTGGGGCCAAGGCACCTTGGTGACGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCG
 GTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGC
 GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC
 GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
 ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
 CCAGCACCTGAAGCAGCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACC
 CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCTT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
 GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGG
 CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAA
 ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGG
 GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
 ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACCTACAAGACCACGCTCCCGTG
 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG

CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:182

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGNHYVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRF
SGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTVFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS
EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW
KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:183

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCTTCAGTGAGTGGCGCACCCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCG
TGTAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGTAATCATTATGTGAATTGGTACCAGCAGTTGCCCCGGG
ACGGCGCCGAAACTTCTGATTTATCGTAATAATCATCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTT
AGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCGCAAAGCGAAGACGAA
GCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATTATTCTGGTTTTTCTACTGTGTTGGCGGCGGCACG
AAGTTAACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACCTCTGTTCCCGCCCTCCTCT
GAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCC
GTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACACCC
TCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGG
AAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTG
GCCCCACAGAATGTTCA

SEQ ID NO:184

GGSISTGSY

SEQ ID NO:185

NHMG I

SEQ ID NO:186

TTRYWMSHILAYGMDY

SEQ ID NO:187

SSSNIGNHY

SEQ ID NO:188

ANT

SEQ ID NO:189

YDGSQSI

SEQ ID NO:190

GGSISTGSY

SEQ ID NO:191

WHSGP

SEQ ID NO:192

TTRYWMSHILAYGMDY

SEQ ID NO:193

SSSNIGNHY

SEQ ID NO:194

ANT

SEQ ID NO:195

YDGSQSI

SEQ ID NO:196

EIHGHGFTFYNPSLKS

SEQ ID NO:197

GGSISTGSY

SEQ ID NO:198

HGHGF

SEQ ID NO:199

TTRYWMSHILAYGMDY

SEQ ID NO:200

SSSNIGNHY

SEQ ID NO:201

ANT

SEQ ID NO:202

YDGSQSI

SEQ ID NO:203

GGTFNSY

SEQ ID NO:204

IPIYGT

SEQ ID NO:205

AAYHPLVFDN

SEQ ID NO:206

SSSNIGNHY

SEQ ID NO:207

RNN

SEQ ID NO:208

WDYSGFST

SEQ ID NO:209

GGTFNSY

SEQ ID NO:210

NPFYIGE

SEQ ID NO:211

AAYHPLVFDN

SEQ ID NO:212

SSSNIGNHY

SEQ ID NO:213

RNN

SEQ ID NO:214

WDYSGFST

SEQ ID NO:215

GGTFNSY

SEQ ID NO:216

IPHYGF

SEQ ID NO:217

AAYHPLVFDN

SEQ ID NO:218

SSSNIGNHY

SEQ ID NO:219

RNN

SEQ ID NO:220

WDYSGFST

SEQ ID NO:221

GGTFNSY

SEQ ID NO:222

IPYSGF

SEQ ID NO:223

AAYHPLVFDN

SEQ ID NO:224

SSSNIGNHY

SEQ ID NO:225

RNN

SEQ ID NO:226

WDYSGFST

SEQ ID NO:227

GGTFNSY

SEQ ID NO:228

NPFYIGE

SEQ ID NO:229

AAYHPLVFDN

SEQ ID NO:230

SSSNIGNHY

SEQ ID NO:231

RNN

SEQ ID NO:232

WDYSGFST

SEQ ID NO:233

GGTFNSY

SEQ ID NO:234

IPMTGQ

SEQ ID NO:235

AAYHPLVFDN

SEQ ID NO:236

SSSNIGNHY

SEQ ID NO:237

RNN

SEQ ID NO:238

WDYSGFST

SEQ ID NO:239

NIIPITGQTYYAQKFQG

SEQ ID NO:240

GGTFSTF

SEQ ID NO:241

IPIFGT

SEQ ID NO:242

GGYGGYYFDY

SEQ ID NO:243

SQSI SNR

SEQ ID NO:244

KGS

SEQ ID NO:245

HKVWLT

SEQ ID NO:246

GGTFSTF

SEQ ID NO:247

IPIFGT

SEQ ID NO:248

GGYGGYYFDY

SEQ ID NO:249

SQSI SNR

SEQ ID NO:250

KGS

SEQ ID NO:251

HYVWST

SEQ ID NO:252

GGTFSTF

SEQ ID NO:253

IPIFGT

SEQ ID NO:254

GGYGGYYFDY

SEQ ID NO:255

SQSISNR

SEQ ID NO:256

KGS

SEQ ID NO:257

HYQWLT

SEQ ID NO:258

GFTFSSY

SEQ ID NO:259

QSSGEN

SEQ ID NO:260

VMIGYGFDY

SEQ ID NO:261

SQSIFNY

SEQ ID NO:262

DSS

SEQ ID NO:263

YSGLLF

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное полностью человеческое, гуманизированное или химерное антитело или его фрагмент, который специфически связывает IL-18, но не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка, где выделенное антитело или его фрагмент содержат:

- i) варибельную область тяжелой цепи H-CDR1 с SEQ ID NO: 3, и
- ii) варибельную область тяжелой цепи H-CDR2 с SEQ ID NO: 9, и
- iii) варибельную область тяжелой цепи H-CDR3 с SEQ ID NO: 5, и
- iv) варибельную область легкой цепи L-CDR1 с SEQ ID NO: 6, и
- v) варибельную область легкой цепи L-CDR2 с SEQ ID NO: 7, и
- vi) варибельную область легкой цепи L-CDR3 с SEQ ID NO: 8, и
- vii) мутацию, замещающую аминокислоту аспарагин 30 каркасной области тяжелой цепи на лизин (N30K).

2. Выделенное антитело или его фрагмент по п.1, отличающиеся тем, что антитело представляет собой выделенное полностью человеческое антитело.

3. Выделенное антитело или его фрагмент по п.1, отличающиеся тем, что фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂ и scFv.

4. Выделенное антитело или его фрагмент по п.1, отличающиеся тем, что выделенное антитело или его фрагмент содержат (i) варибельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 14 или последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична ей, и (ii) варибельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 16 или последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична ей.

5. Выделенное антитело по п.1, отличающееся тем, что выделенное антитело содержит (i) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 43 или последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична

ей, и (ii) легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 45 или последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична ей.

6. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент по любому из пп.1-5.

7. Клонированный или экспрессирующий вектор, содержащий один или несколько полинуклеотидов по п.6.

8. Клетка-хозяин, содержащая один или несколько клонирующих или экспрессирующих векторов по п.7.

9. Стабильно трансформированная или трансфицированная клетка-хозяин, содержащая один или несколько полинуклеотидов по п.6.

10. Способ продуцирования выделенного антитела или его фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по п.8 в условиях, подходящих для продуцирования выделенного антитела или его фрагмента.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп.1-5 и фармацевтический носитель, предназначенная для лечения заболевания, выбранного из саркоидоза, гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ), семейного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (FHL) и других синдромов иммунодефицита, гигантоклеточного артериита (ГТА), хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), болезни Стилла, развивающейся у взрослых (AOSD), системного ювенильного идиопатического артрита (сЮИА), тяжелой астмы, увеита, географической атрофии, диабета 1 типа, диабета 2 типа или атеросклероза и любого их сочетания.

12. Фармацевтическая композиция по п.11 в форме для внутривенного, ингаляционного или подкожного введения.

13. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-5 в лечении или профилактике заболевания, выбранного из саркоидоза, гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ), семейного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (FHL) и других синдромов иммунодефицита, гигантоклеточного артериита (ГТА), хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), болезни Стилла, развивающейся у взрослых (AOSD), системного ювенильного идиопатического артрита (сЮИА), тяжелой астмы, увеита, географической атрофии, диабета 1 типа, диабета 2 типа или атеросклероза и любого их сочетания.

14. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-5 в лечении или профилактике саркоидоза легкого.

15. Применение фармацевтической композиции по п.11 или 12 в лечении или профилактике заболевания, выбранного из саркоидоза, гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ), семейного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (FHL) и других синдромов иммунодефицита, гигантоклеточного артериита (ГТА), хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), болезни Стилла, развивающейся у взрослых (AOSD), системного ювенильного идиопатического артрита (сЮИА), тяжелой астмы, увеита, географической атрофии, диабета 1 типа, диабета 2 типа или атеросклероза и любого их сочетания.

16. Применение фармацевтической композиции по п.11 или 12 в лечении или профилактике саркоидоза легкого.

17. Применение по п.13, или 14, или 15, или 16, в котором лечение или профилактику осуществляют у пациента-млекопитающего.

18. Применение по п.17, где пациентом-млекопитающим является человек.

19. Выделенное антитело или его фрагмент, который специфически связывает IL-18, но не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка, содержащее варибельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 14, и варибельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 16.

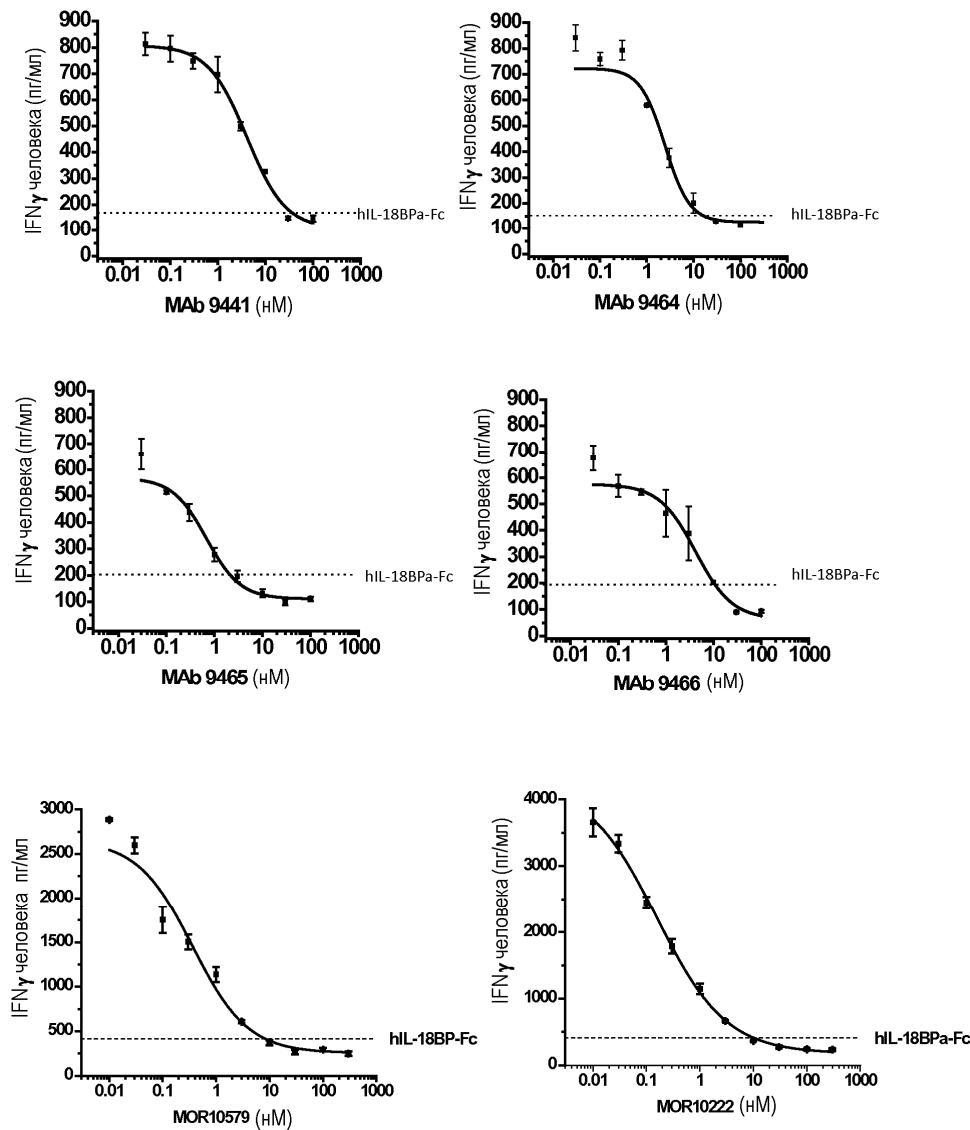
20. Выделенное антитело или его фрагмент, который специфически связывает IL-18, но не связывает комплекс IL-18/IL-18-связывающего белка, содержащее тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 43, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 45.

	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
MOR9464	SYAIS (SEQ ID NO:3)	NIIP-MTGQTYAQQKFG (SEQ ID NO:9)	AAYHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR9464N30K	SYAIS (SEQ ID NO:3)	NIIP-MTGQTYAQQKFG (SEQ ID NO:9)	AAYHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR10222N30SM54I	SYAIS (SEQ ID NO:3)	NIIP-ITGQTYAQQKFG (SEQ ID NO:13)	AAYHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR8775	SYAIS (SEQ ID NO:3)	GIIP-IYGTANYAQQKFG (SEQ ID NO:4)	AAYHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR9465	SYAIS (SEQ ID NO:3)	NIIP-HYGFAYYAQQKFG (SEQ ID NO:11)	AAYHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR9466	SYAIS (SEQ ID NO:3)	NIIP-YSGFAYYAQQKFG (SEQ ID NO:12)	AAYHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR10222	SYAIS (SEQ ID NO:3)	NIIP-MTGQTYAQQKFG (SEQ ID NO:9)	AAYHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR9441	SYAIS (SEQ ID NO:3)	WINPFYIGETFYAQQKFG (SEQ ID NO:10)	AAYHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR10579	SYAIS (SEQ ID NO:3)	WINPFYIGETFYAQQKFG (SEQ ID NO:10)	AAYHPLVFDN (SEQ ID NO: 5)
MOR13363	SYAIIH (SEQ ID NO:106)	VISGEGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:107)	VMIGYGFYD (SEQ ID NO:108)
MOR13361	SYAIIH (SEQ ID NO:106)	TIQSSGENKFYADSVKG (SEQ ID NO:122)	VMIGYGFYD (SEQ ID NO:108)
MOR13341	TFSIS (SEQ ID NO:120)	GIIP-IFGTANYAQQKFG (SEQ ID NO:121)	GGYGGYFFDY (SEQ ID NO:123)
MOR13342	TFSIS (SEQ ID NO:120)	GIIP-IFGTANYAQQKFG (SEQ ID NO:121)	GGYGGYFFDY (SEQ ID NO:123)
MOR13347	TFSIS (SEQ ID NO:120)	GIIP-IFGTANYAQQKFG (SEQ ID NO:121)	GGYGGYFFDY (SEQ ID NO:123)
MOR8776	TGSYYWN (SEQ ID NO:74)	EINHMGITYNPSLKG (SEQ ID NO:75)	TTRYWMSHILAYGMDY (SEQ ID NO: 79)
MOR10497	TGSYYWN (SEQ ID NO:74)	EIQSPGYTFYNPSLKS (SEQ ID NO:78)	TTRYWMSHILAYGMDY (SEQ ID NO: 79)
MOR10501	TGSYYWN (SEQ ID NO:74)	EIWHSGPTFYNPSLKS (SEQ ID NO:76)	TTRYWMSHILAYGMDY (SEQ ID NO: 79)
MOR10502	TGSYYWN (SEQ ID NO:74)	EIHGHGFTFYNPSLKS (SEQ ID NO:77)	TTRYWMSHILAYGMDY (SEQ ID NO: 79)

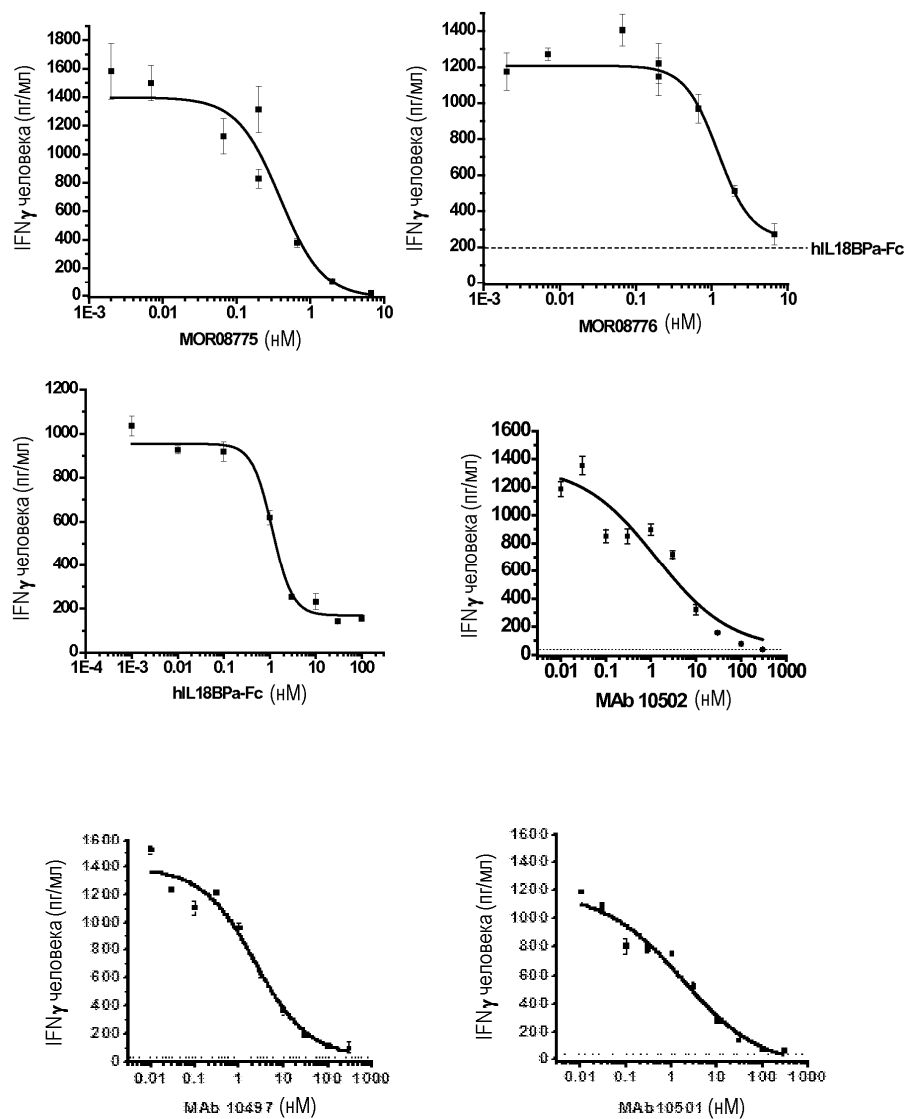
Фиг. 1

	L-CDR1		L-CDR2		L-CDR3
MOR9464	SGSSSNIGNHYVN (SEQ ID NO:6)		RNNHRPS (SEQ ID NO:7)		QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO:8)
MOR9464N30K	SGSSSNIGNHYVN (SEQ ID NO:6)		RNNHRPS (SEQ ID NO:7)		QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO:8)
MOR10222N30SM54I	SGSSSNIGNHYVN (SEQ ID NO:6)		RNNHRPS (SEQ ID NO:7)		QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO:8)
MOR8775	SGSSSNIGNHYVN (SEQ ID NO:6)		RNNHRPS (SEQ ID NO:7)		QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO:8)
MOR9465	SGSSSNIGNHYVN (SEQ ID NO:6)		RNNHRPS (SEQ ID NO:7)		QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO:8)
MOR9466	SGSSSNIGNHYVN (SEQ ID NO:6)		RNNHRPS (SEQ ID NO:7)		QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO:8)
MOR10579	SGSSSNIGNHYVN (SEQ ID NO:6)		RNNHRPS (SEQ ID NO:7)		QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO:8)
MOR10222	SGSSSNIGNHYVN (SEQ ID NO:6)		RNNHRPS (SEQ ID NO:7)		QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO:8)
MOR9441	SGSSSNIGNHYVN (SEQ ID NO:6)		RNNHRPS (SEQ ID NO:7)		QSWDYSGFSTV (SEQ ID NO:8)
MOR13363	RASQSIFNYLN (SEQ ID NO:109)		DSSTLQS (SEQ ID NO:110)		LQYSGFLFT (SEQ ID NO:111)
MOR13361	RASQSIFNYLN (SEQ ID NO:109)		DSSTLQS (SEQ ID NO:110)		HQYSGLLFT (SEQ ID NO:126)
MOR13341	RASQSIENRLN (SEQ ID NO:124)		KGSTLQS (SEQ ID NO:125)		QQHKVWLTT (SEQ ID NO:127)
MOR13342	RASQSIENRLN (SEQ ID NO:124)		KGSTLQS (SEQ ID NO:125)		QQHYVWSTT (SEQ ID NO:128)
MOR13347	RASQSIENRLN (SEQ ID NO:124)		KGSTLQS (SEQ ID NO:125)		QQHYQWLTT (SEQ ID NO:129)
MOR8776	SGSSSNIGNHYVS (SEQ ID NO:80)		ANTKRPS (SEQ ID NO:81)		SSYDGSQSIV (SEQ ID NO:82)
MOR10497	SGSSSNIGNHYVS (SEQ ID NO:80)		ANTKRPS (SEQ ID NO:81)		SSYDGSQSIV (SEQ ID NO:82)
MOR10501	SGSSSNIGNHYVS (SEQ ID NO:80)		ANTKRPS (SEQ ID NO:81)		SSYDGSQSIV (SEQ ID NO:82)
MOR10502	SGSSSNIGNHYVS (SEQ ID NO:80)		ANTKRPS (SEQ ID NO:81)		SSYDGSQSIV (SEQ ID NO:82)

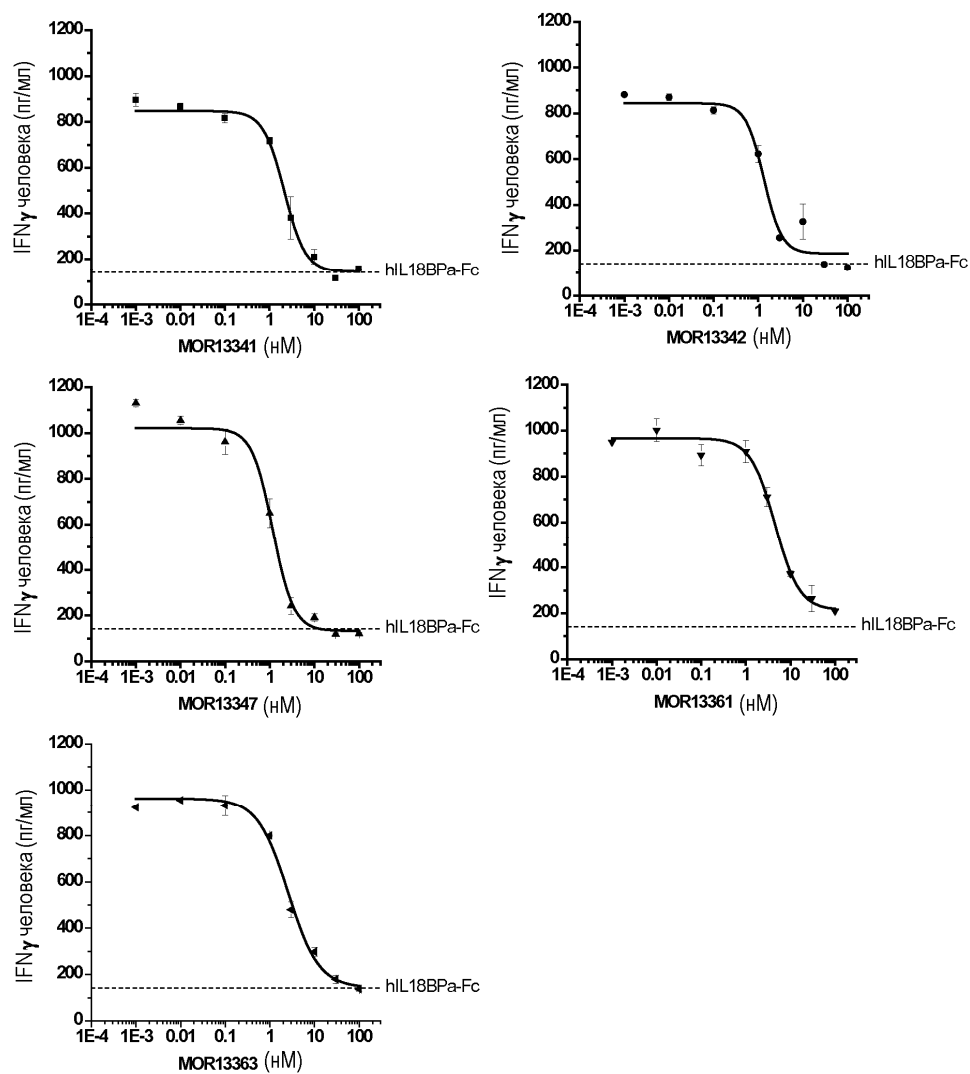
Фиг. 2



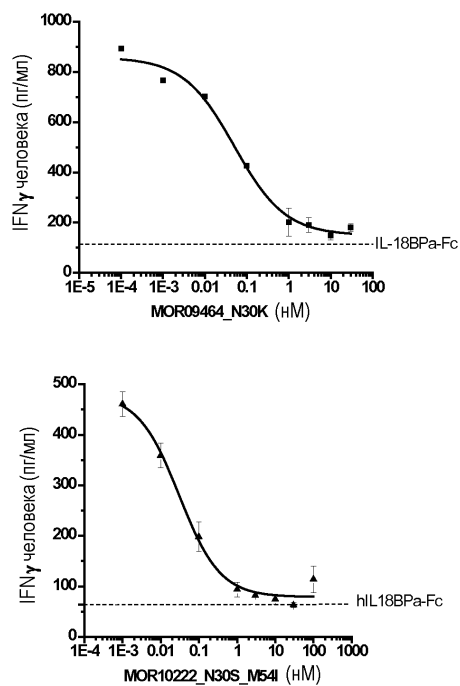
Фиг. 3А



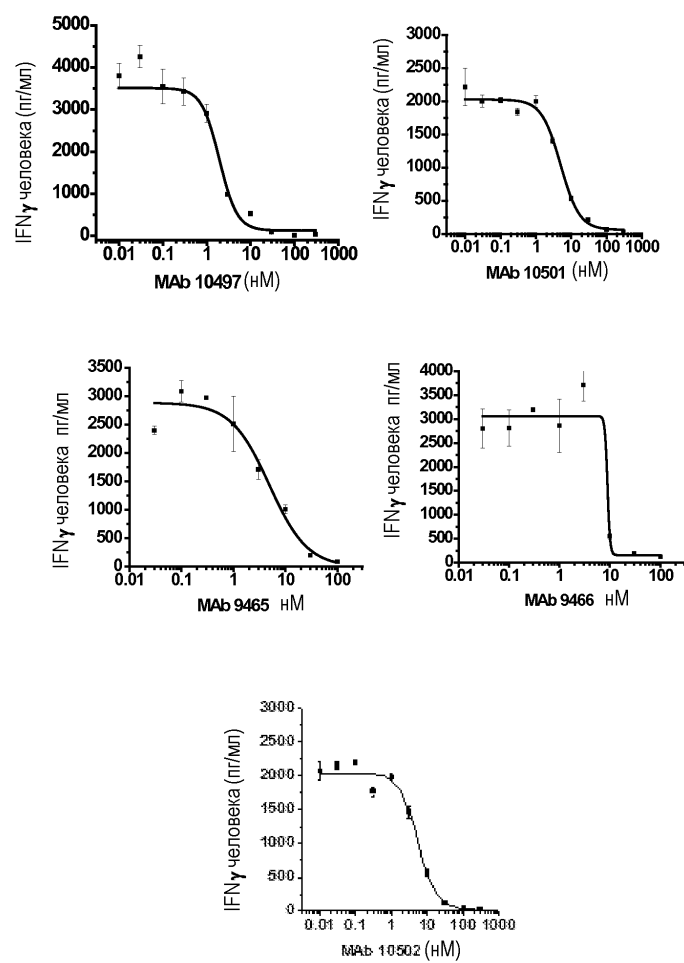
Фиг. 3В



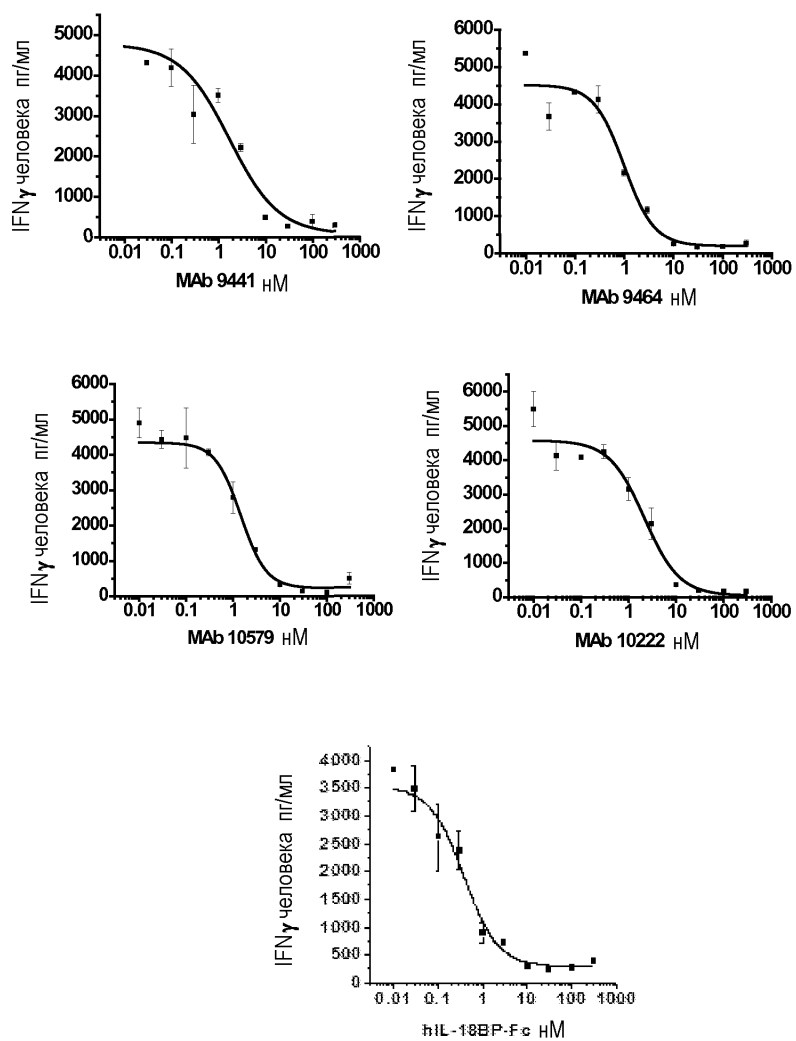
Фиг. 3С



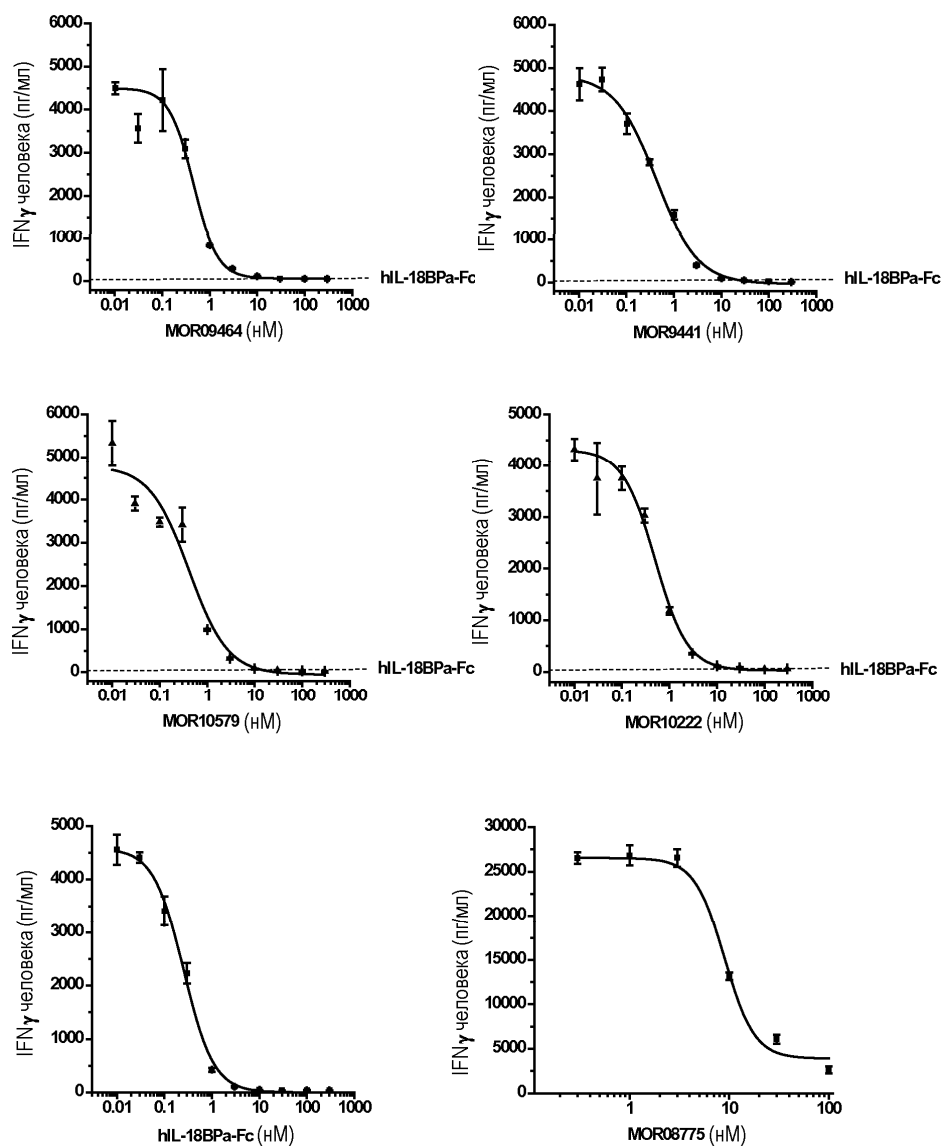
Фиг. 3D



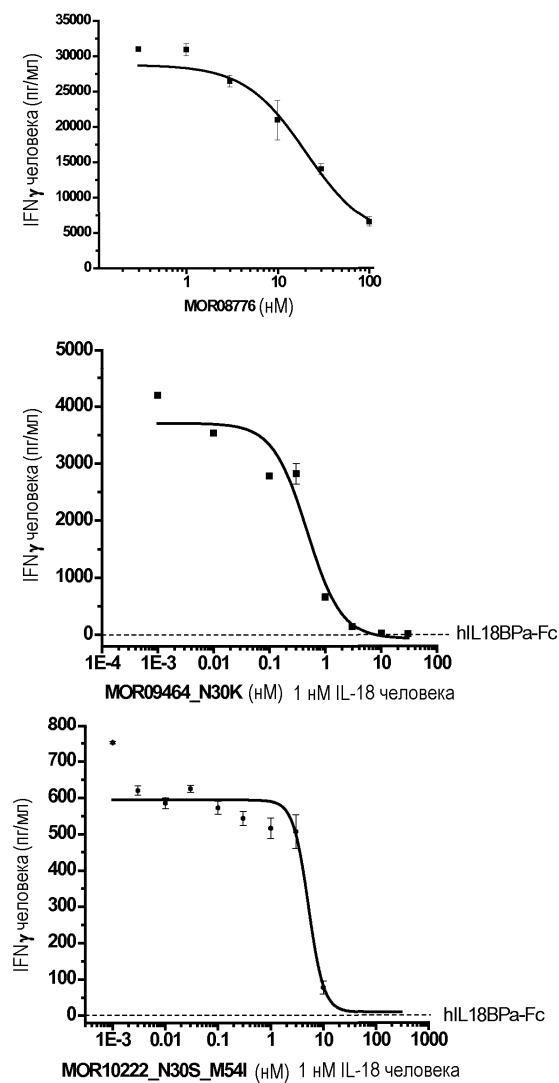
Фиг. 4А



Фиг. 4В

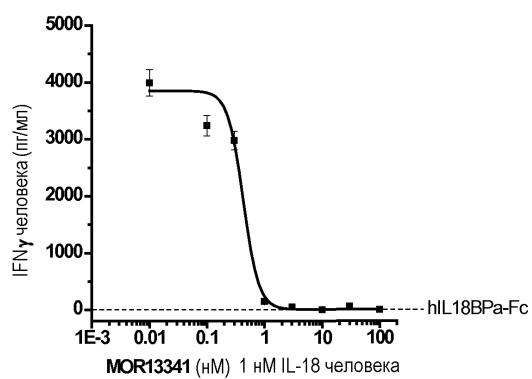
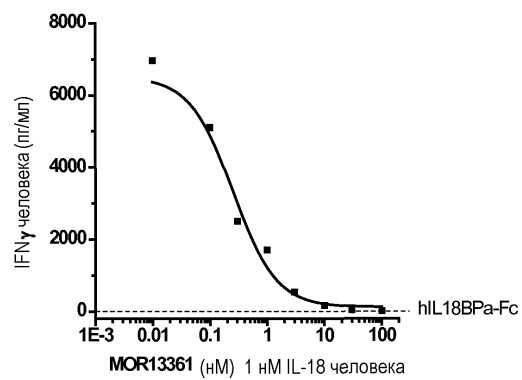


Фиг. 5А

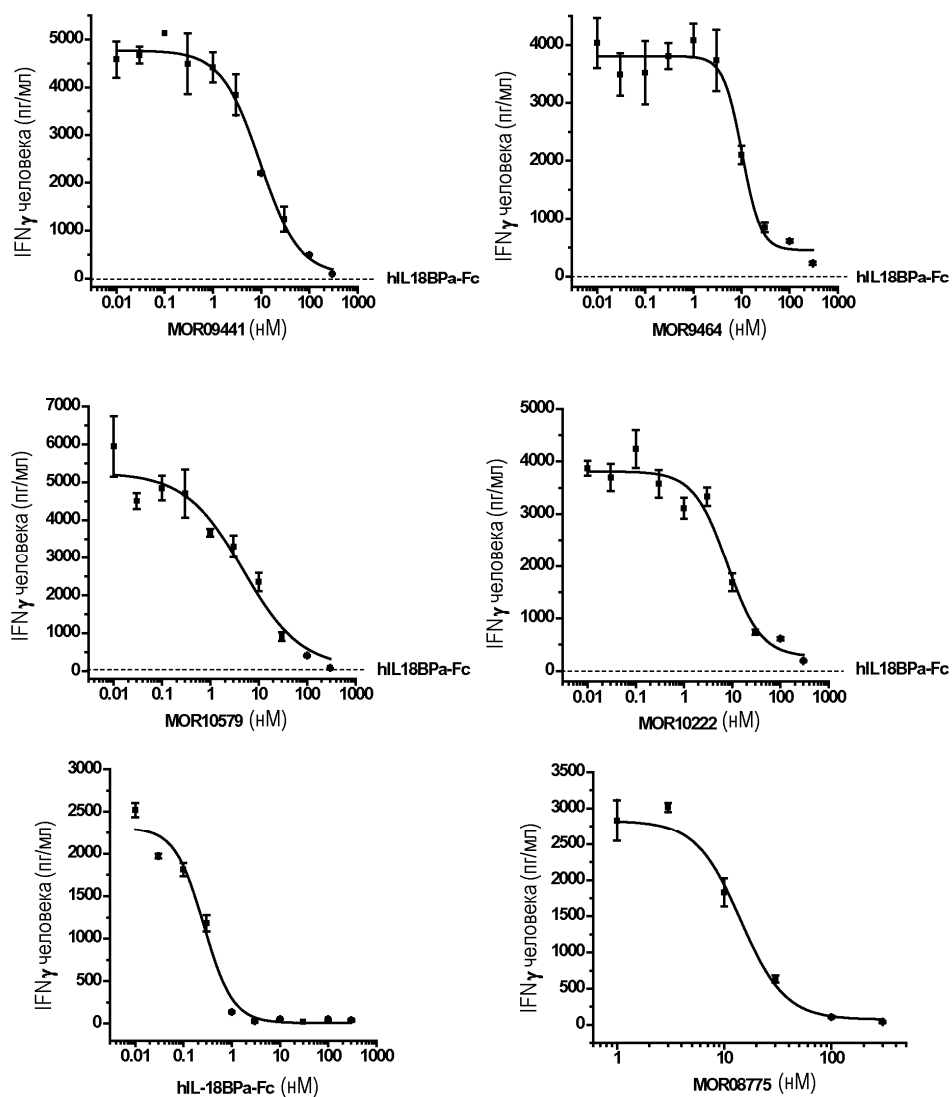


Фиг. 5B

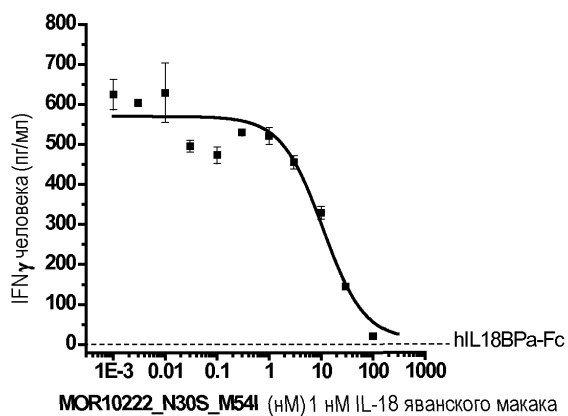
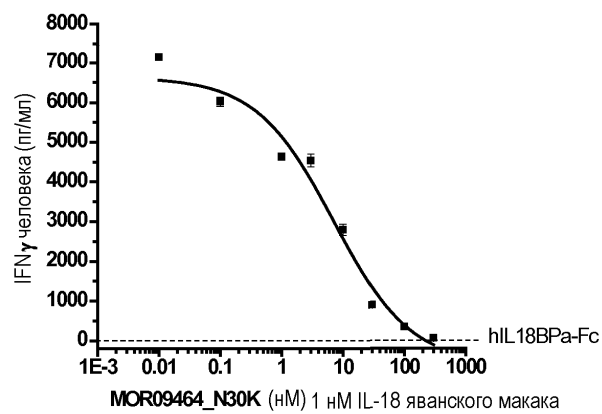
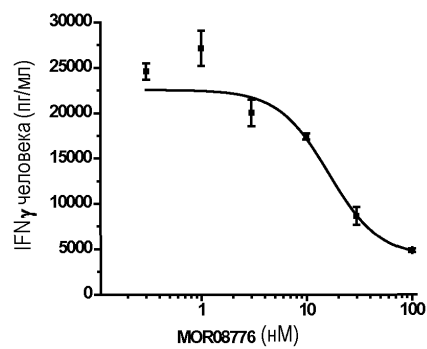
034610



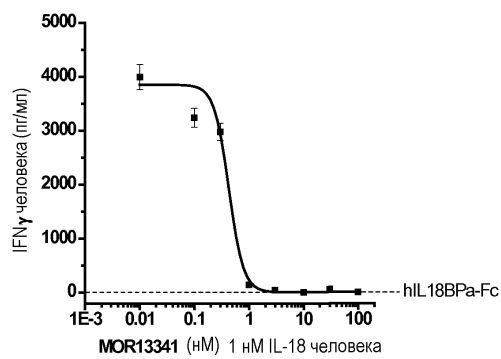
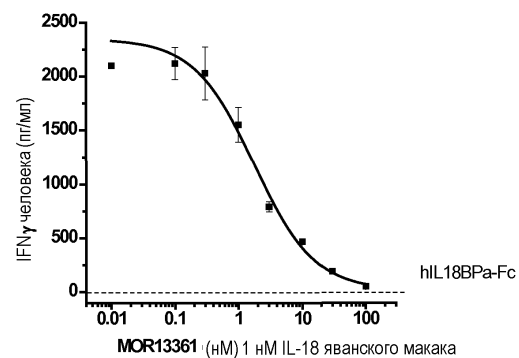
Фиг. 5C



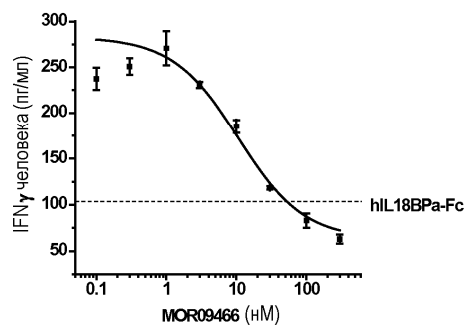
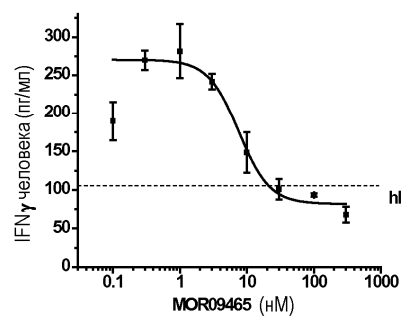
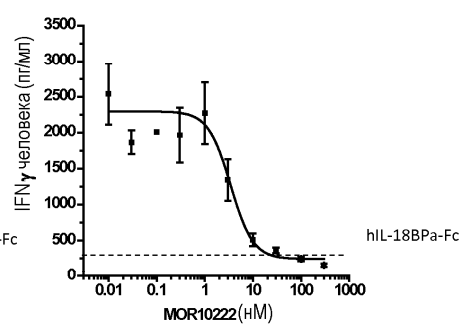
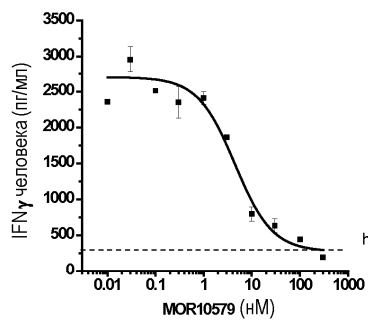
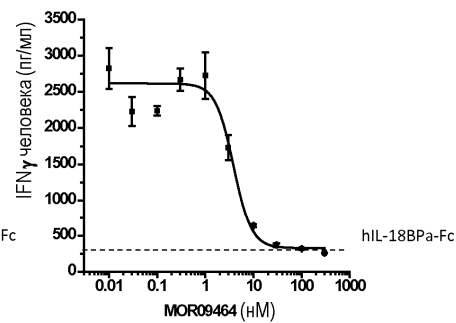
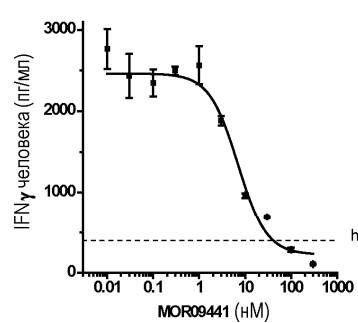
Фиг. 6А



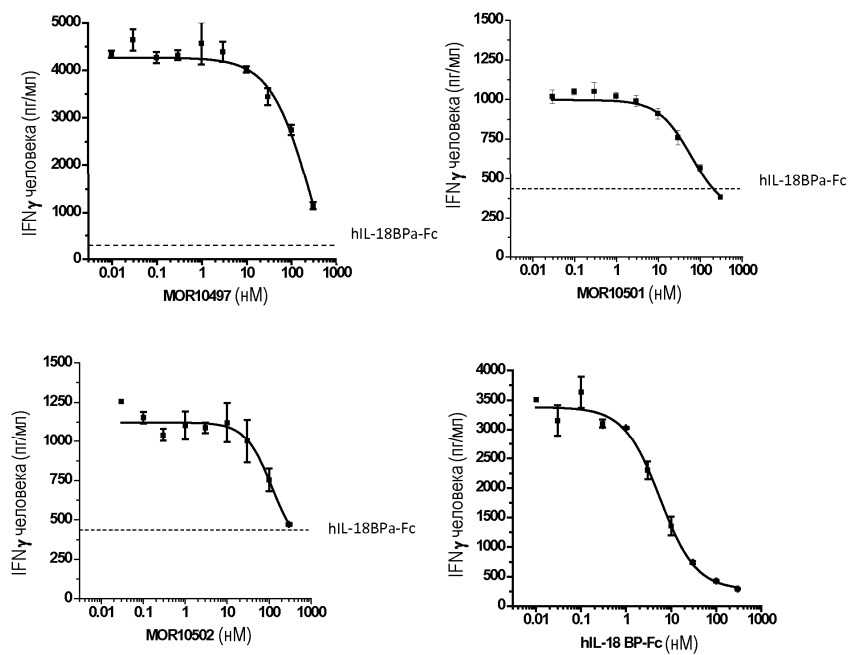
Фиг. 6В



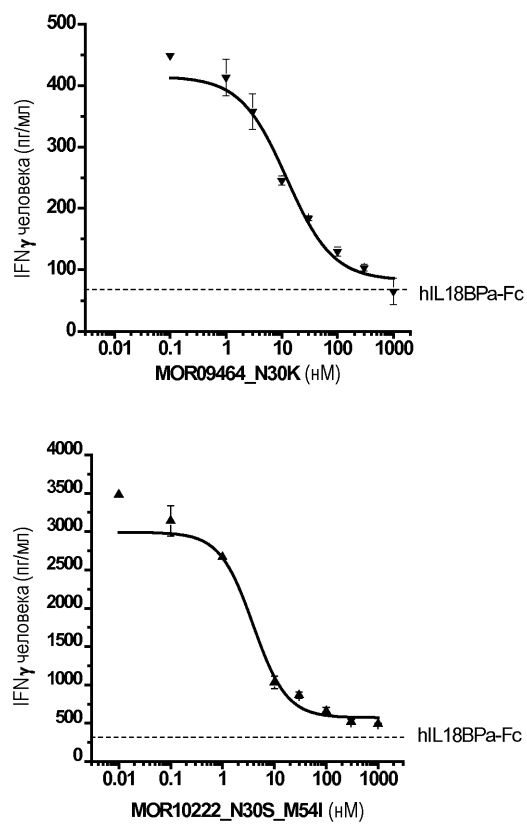
Фиг. 6С



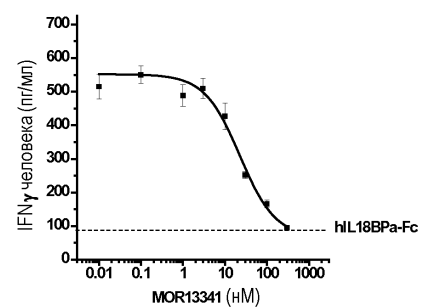
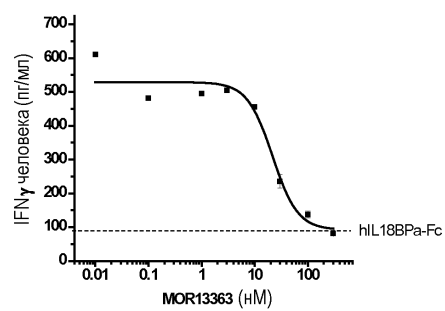
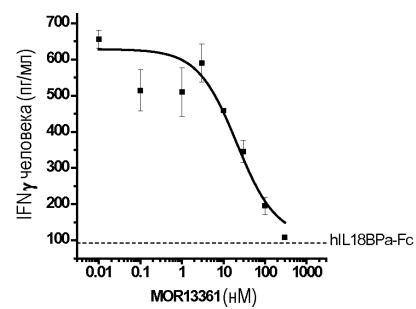
Фиг. 7А



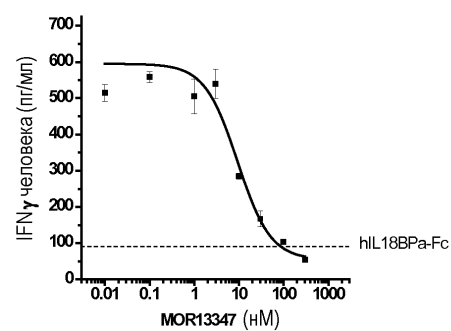
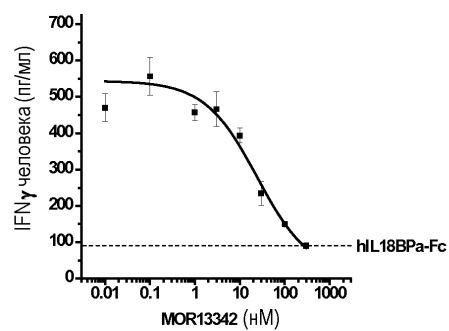
Фиг. 7В



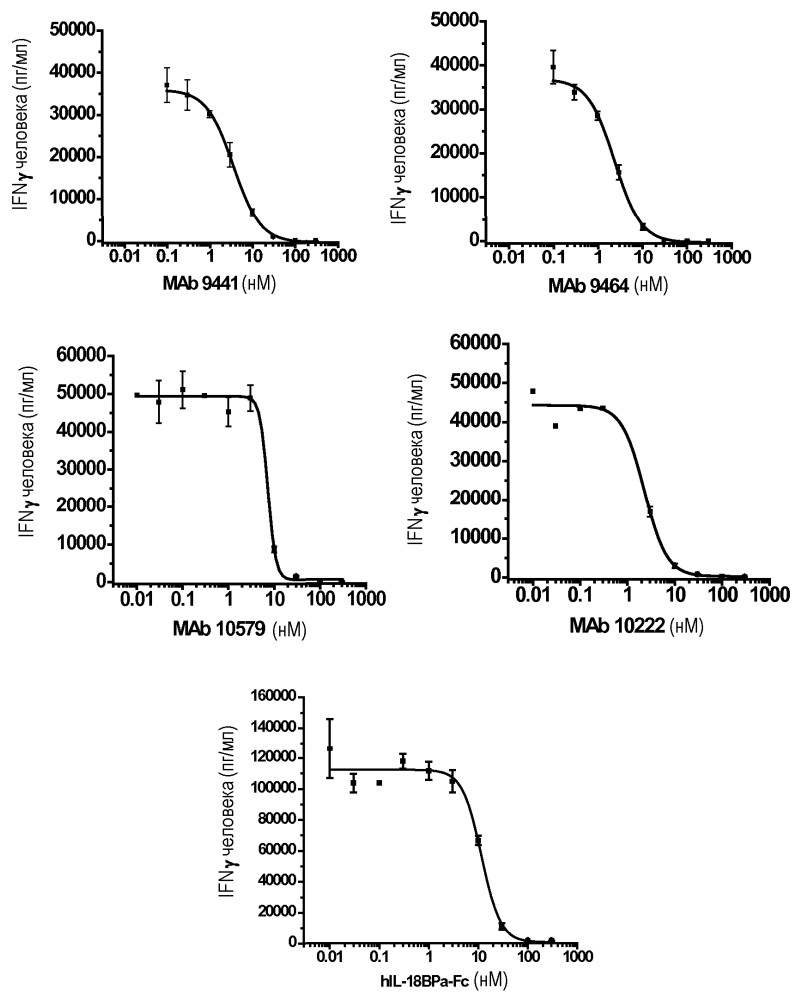
Фиг. 7С



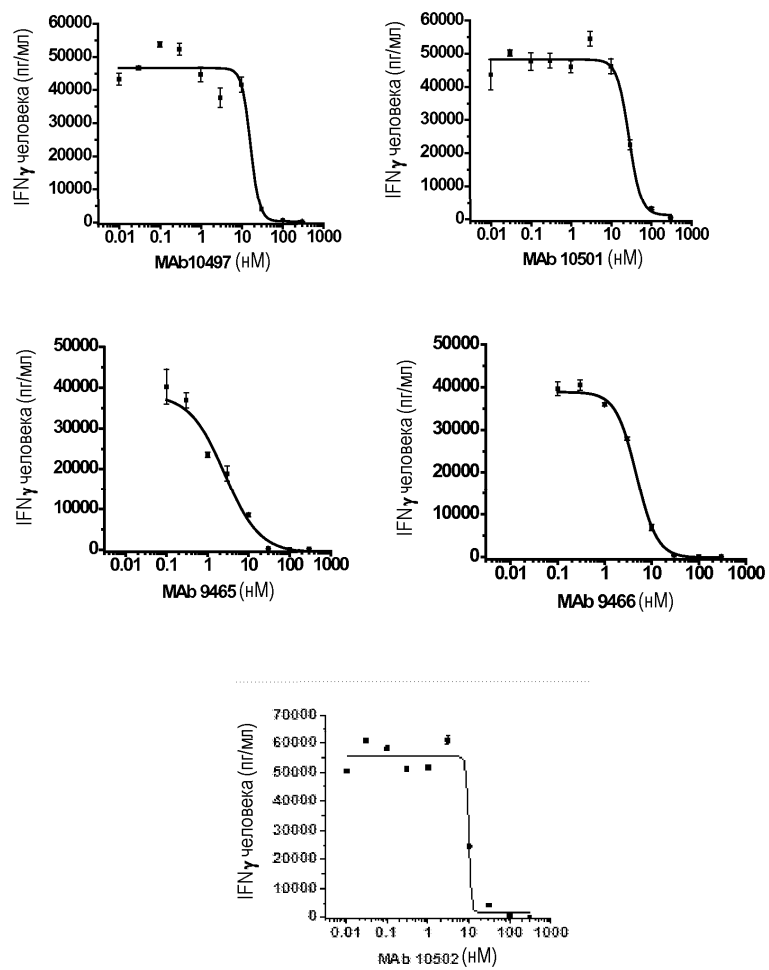
Фиг. 7D



Фиг. 7E

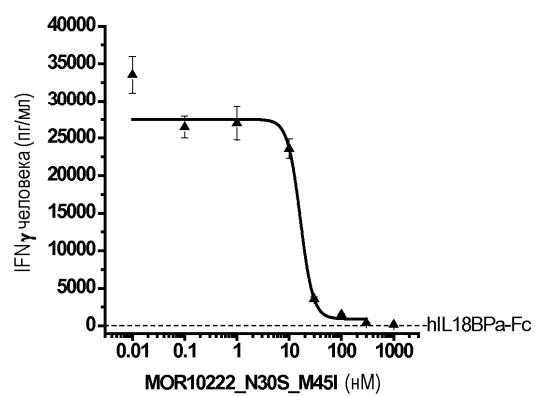
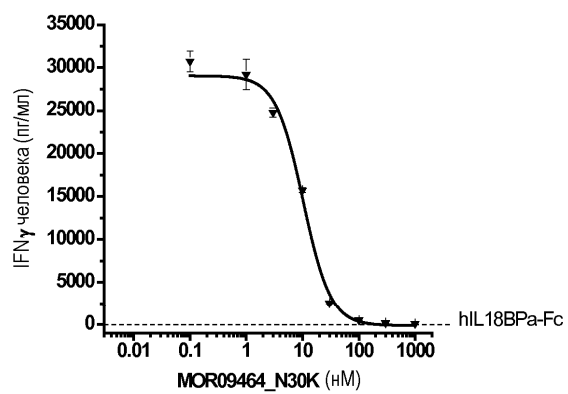


Фиг. 8А

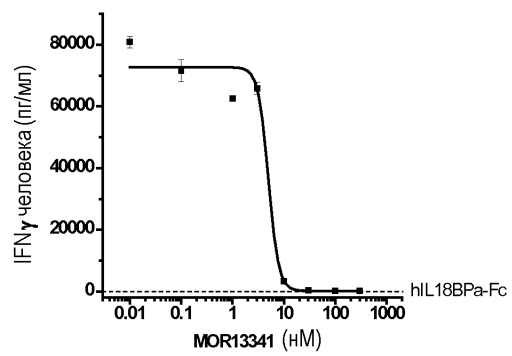
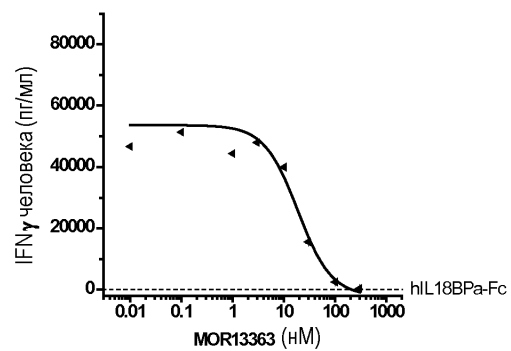
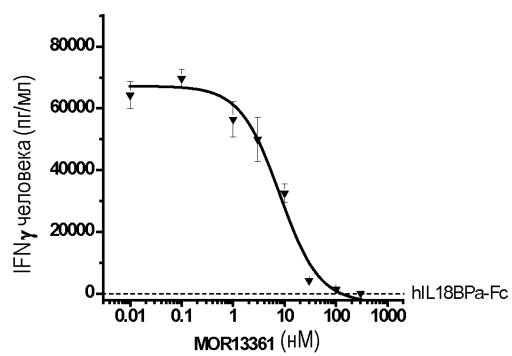


Фиг. 8В

034610

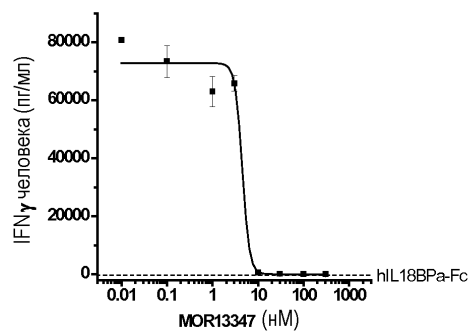
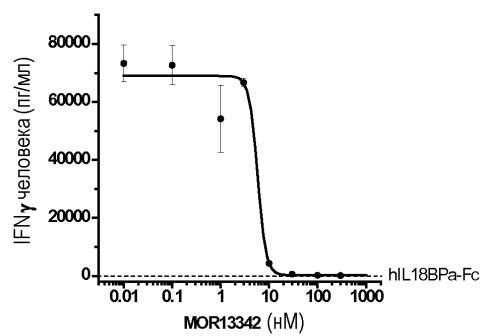


Фиг. 8С

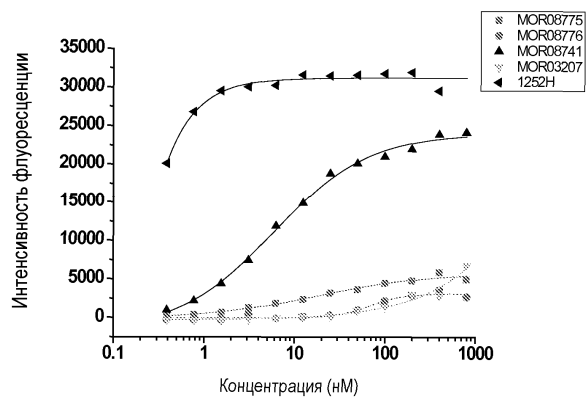


Фиг. 8D

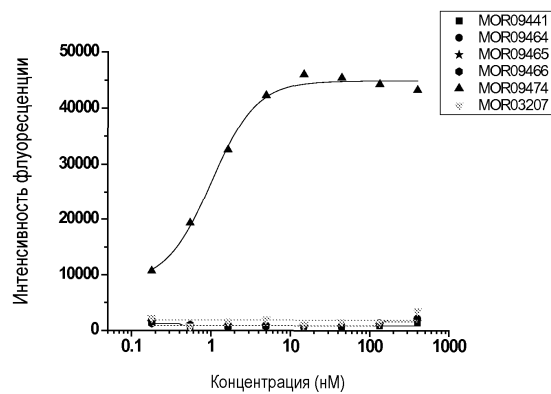
034610



Фиг. 8Е



Фиг. 9А



Фиг. 9В

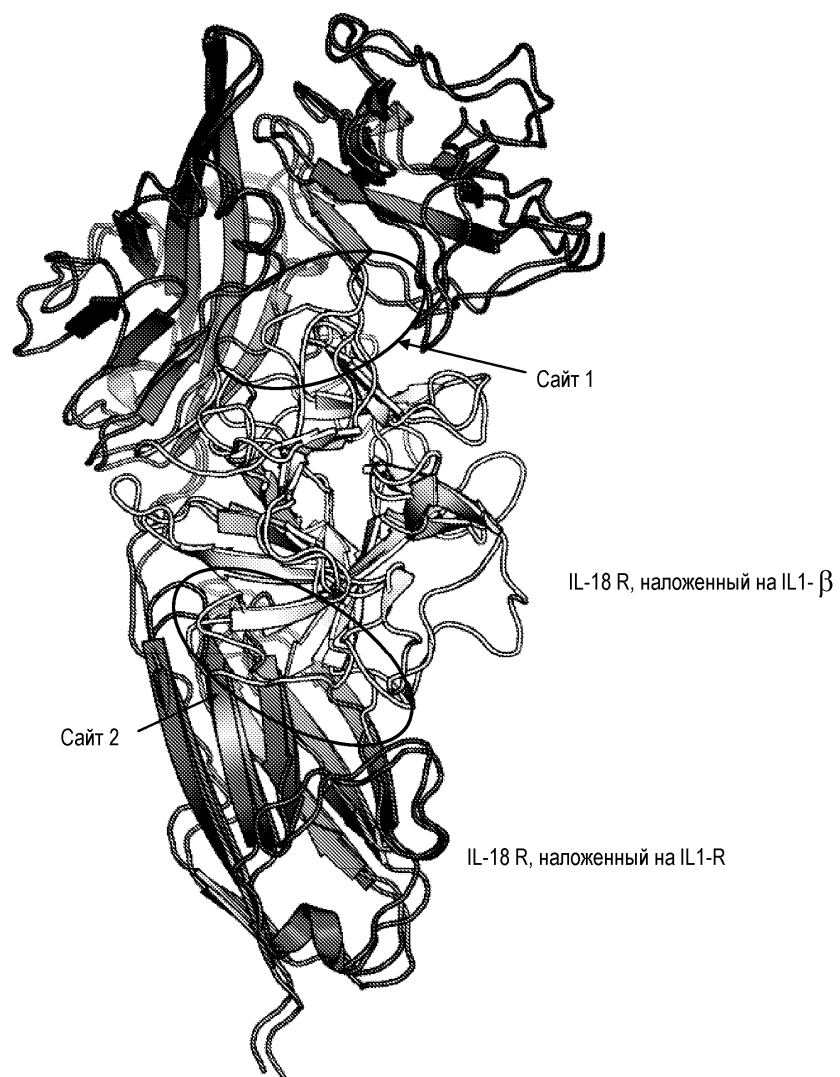
034610

	ABT325	125-2H	IL18-BP	MOR08776	MOR08775
ABT325					
125-2H					
IL18-BP					
MOR08776					
MOR08775					
MOR09066					

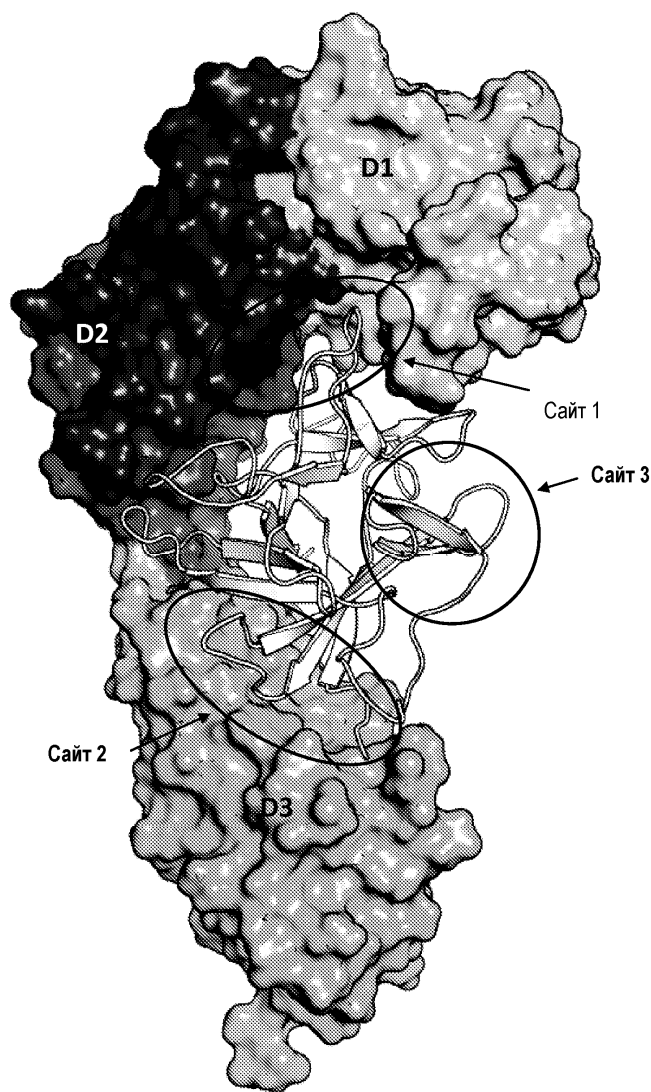
Фиг. 10А

	ABT325	125-2H	IL18-BP	MOR9464_N30K	MOR10222_N30S_M54I	MOR13341	MOR9464
ABT325							
125-2H							
IL18-BP							
MOR9464_N30K							
MOR10222_N30S_M54I							
MOR13341							
MOR9464							

Фиг. 10В



Фиг. 11А



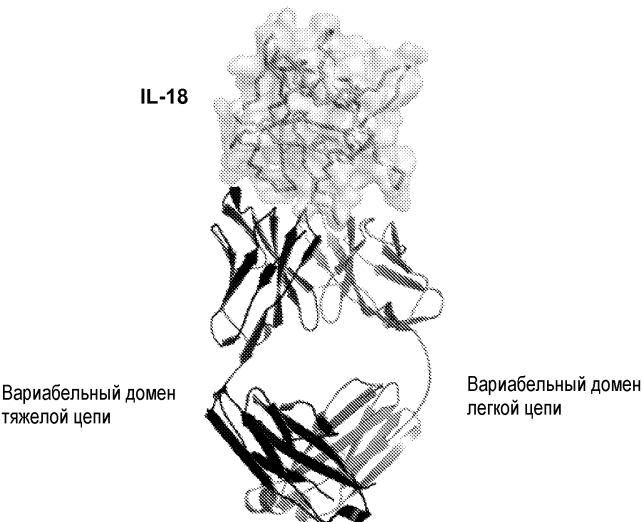
Фиг. 11В

1) Human IL-18	YFGK ⁴⁰ LESKLSVIRN ⁵⁰ LNDQVLFDIQ ⁶⁰ GNRPLFEDMT ⁷⁰ DSDCRDNAPR ⁸⁰ TIFTIISMYKD ⁹⁰ SQPRGMAVTI ¹⁰⁰ SVKCNENKI
2) Kim et all	E I M K M
3) Krumm et all	YFG L K I MYKD ⁹⁰ S PRGMAV
4) IL-18Rα	K ⁴⁰ L K R D M D R M
5) H/DxMS	MYKD ⁹⁰ SQPRGMAVT

1) Human IL-18	STL ¹¹⁰ SCENKIISFK ¹²⁰ EMNPPDNIKD ¹³⁰ TKSDIIFQ ¹⁴⁰ SVPGHDNKM ¹⁵⁰ FESSSYEGYF ¹⁶⁰ LACEKERDLF ¹⁷⁰ KLILK
2) Kim et all	N QR ¹⁴⁰ S DNKM
3) Krumm et all	N QR ¹⁴⁰ S DN M
4) IL-18Rα	R D
5) H/DxMS	FK ¹²⁰ EMNPPDNIKD ¹³⁰ TKSDIIFQ ¹⁴⁰ SVPGHDNKM ¹⁵⁰ FESSSYEGYF

1) Human IL-18	KEDEL ¹⁸⁰ GDRSIMFTVQ ¹⁹⁰ NED
2) Kim et all	V N
3) Krumm et all	V
4) IL-18Rα	
5) H/DxMS	

Фиг. 12

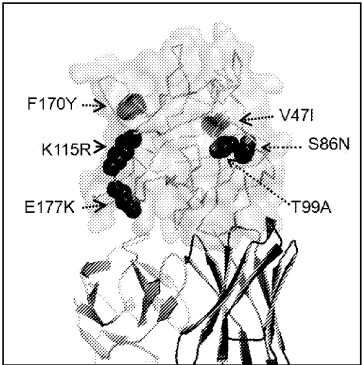


Фиг. 13

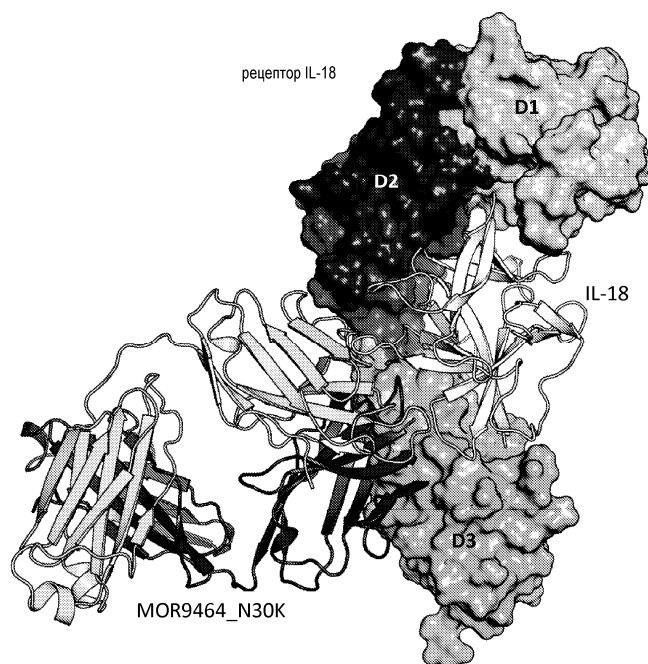
	47	86	99	115
Human IL-18	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCENKISTLSCE			
Cyno. IL-18	YFGKLESKLSLIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIINMYKDSQPRGMAVAISVKCENRISTLSCE			
	*	*	*	*

	170	177
Human IL-18	NKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSYEGYFLACEKERDLFVKLIILKKDELGDRSIMFTVQNED	
Cyno. IL-18	NKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSYEGYFLACEKERDLFVKLIILKKDELGDRSIMFTVQNED	
	*	*

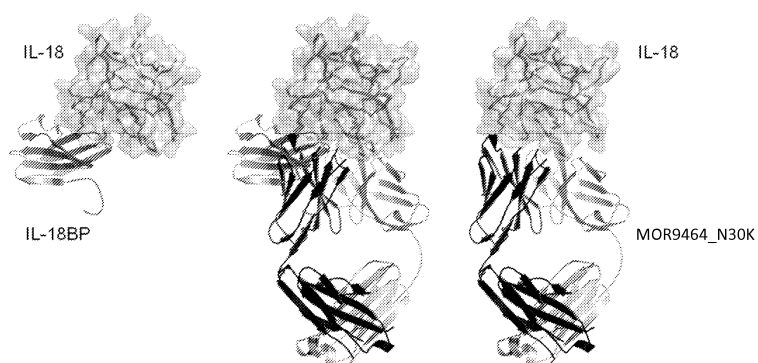
Фиг. 14А



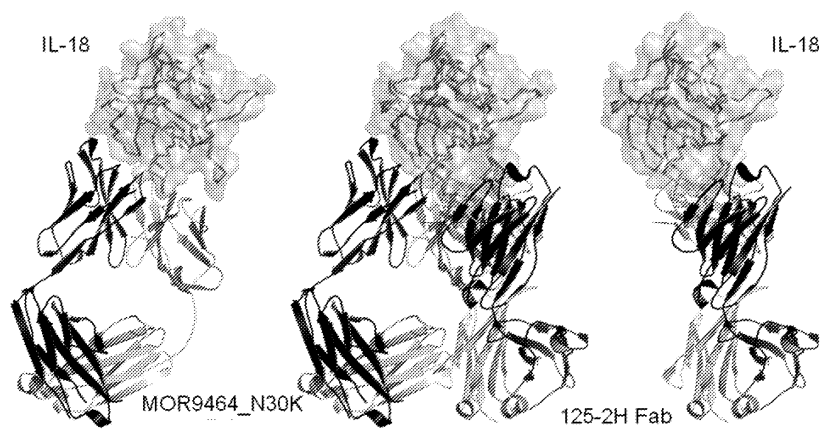
Фиг. 14В



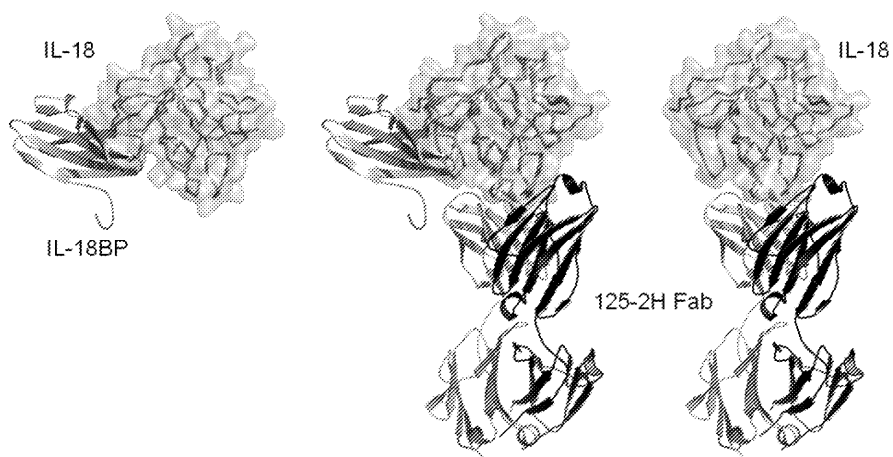
Фиг. 15



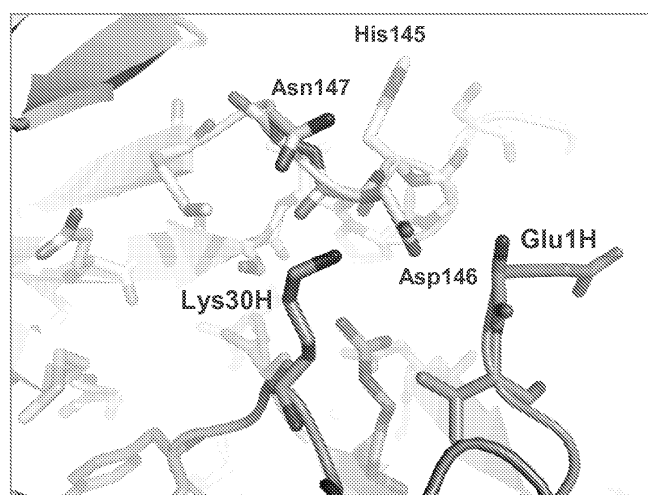
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

