

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037554**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.13

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(21) Номер заявки
201591467

(22) Дата подачи заявки
2014.03.13

(54) АНТИ-LAG-3 СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

(31) 61/789,325

(32) 2013.03.15

(33) US

(43) 2016.04.29

(86) PCT/EP2014/054967

(87) WO 2014/140180 2014.09.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
ИНТЕЛЛЕКТУАЛ ПРОПЕРТИ
ДИВЕЛОПМЕНТ ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:
**Хэмблин Пол Эндрю, Льюис Алан
Питер, Уэбб Томас Мэттью (GB)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (RU)**

(56) WO-A1-2008132601

HAUDEBOURG THOMAS ET AL.:
"Depletion of LAG-3 positive cells in cardiac
allograft reveals their role in rejection and
tolerance", TRANSPLANTATION, WILLIAMS
AND WILKINS, BALTIMORE US, vol. 84, no. 11,
1 December 2007 (2007-12-01), pages 1500-1506,
XP002495209, ISSN: 0041-1337, the whole document

N. POIRIER ET AL.: "Antibody-mediated
depletion of lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3+)-
activated T lymphocytes prevents delayed-type
hypersensitivity in non-human primates", CLINICAL
& EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 164,
no. 2, 1 May 2011 (2011-05-01), pages 265-274,
XP055055512, ISSN: 0009-9104, DOI: 10.1111/
j.1365-2249.2011.04329.x, the whole document

WO-A2-2010019570

CREG&EMSP13; J. WORKMAN ET AL.:
"The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223),
regulates the expansion of activated T cells",
EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol.
33, no. 4, 1 April 2003 (2003-04-01), pages
970-979, XP055121082, ISSN: 0014-2980, DOI:
10.1002/eji.200323382, abstract

WO-A1-2014008218

(57) Изобретение относится к антителам, которые связываются с геном активации лимфоцитов (LAG-3) и вызывают истощение популяции активированных Т-клеток, экспрессирующих LAG-3, к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей такие антитела, и к содержащему ее экспрессионному вектору и клетке-хозяину. Изобретение также относится к способу получения указанных антител, включая гуманизированные антитела, к содержащей такие антитела фармацевтической композиции и к применению указанных антител для лечения заболеваний, связанных с вовлечением патогенных Т-клеток, в частности псориаза.

B1

037554

037554

B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с геном активации лимфоцитов (LAG-3) и вызывают истощение популяции активированных Т-клеток, экспрессирующих LAG-3, к полинуклеотидам, кодирующим такие антитела, к фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела и к применению указанных антител в лечении и/или предупреждении заболеваний, связанных с вовлечением патогенных Т-клеток.

Предшествующий уровень техники

Ген активации лимфоцитов-3 (LAG-3) представляет собой негативный костимулирующий рецептор, который модулирует гомеостаз, пролиферацию и активацию Т-клеток (Sierro S. et al.; Expert. Opin. Ther. Targets (2010), 15:91-101). Представитель суперсемейства иммуноглобулинов, LAG-3, представляет собой CD4-подобный белок, который подобно CD4 связывается с молекулами МНС класса II, но с двукратно более высокой аффинностью и на другом участке, чем CD4 (Huard B. et al., (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:5744-9). Кроме очень разных функций (CD4 представляет собой положительную костимулирующую молекулу), эти два рецептора также по-разному регулируются. CD4 конститутивно экспрессируется на поверхности всех зрелых Т-клеток CD4⁺, и только небольшая фракция располагается внутриклеточно, в то время как большая часть молекул LAG-3 удерживается в клетке близко к центру организации микротрубочек и индуцируется только после антиген-специфической активации Т-клеток (Woo S.R. et al., (2010), Eur. J. Immunol. 40:1768-77). Роль LAG-3 в качестве отрицательного регулятора Т-клеточных ответов основана на исследованиях LAG-3 нокаутных мышей и с использованием блокирующих анти-LAG-3 антител в модельных *in vitro* и *in vivo* системах (Sierro S. et al., Expert. Opin. Ther. Targets (2010), 15:91-101; Hannier S. et al. (1998), J. Immunol. 161:4058-65; Macon-Lemaitre L. et al. (2005), Immunology, 115:170-8; Workman C.J. et al. (2003), Eur. J. Immunol. 33:970-9).

На клеточной поверхности LAG-3 экспрессируется в виде димера, который необходим для образования стабильных сайтов связывания МНС класса II (Huard B. et al. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:5744-9). LAG-3 в растворимой форме также встречается в сыворотке здоровых доноров и пациентов с туберкулезом и раком (Lienhardt C. et al. (2002), Eur. J. Immunol. 32:1605-13; Triebel F. et al. (2006), Cancer Lett. 235:147-53), и эта форма может коррелировать с количеством Т-клеток LAG-3⁺ (Siawaya J. et al. (2008), J. of Infection, 56:340-7). Основным свойством LAG-3 в качестве целевого антигена для улучшенного агента истощения популяции лимфоцитов является его относительно селективный профиль экспрессии по сравнению с другими агентами, используемыми в настоящее время в клинике, т.е. CampathTM (Т/В-клетки), Amevive (в основном CD45RO⁺ Т-клетки) или Rituxan (В-клетки). Несколько молекул было идентифицировано в качестве устойчивых маркеров активации Т-клеток человека *in vivo*. Они включают LAG-3, OX40, МНС класса II, CD69, CD38, ICOS и CD40L. Однако, кроме LAG-3 и OX40, большинство этих молекул также конститутивно экспрессируются на человеческих натуральных регуляторных Т-клетках или на других типах клеток. LAG-3 экспрессируется на небольшой части Т-клеток у здоровых людей (примерно 1-4%) и в такой же части клеток NK (Baixeras E. et al. (1992), J. Exp. Med. 176:327-37; Huard B. et al. (1994), Immunogenetics, 39:213-7). При активации с помощью анти-CD3 антитела примерно 30-80% и CD4⁺, и CD8⁺ Т-клеток экспрессируют LAG-3 в пределах от 24 до 48 ч; этот процент увеличивается в присутствии IL2, IL7 и IL12 (Sierro S. et al., Expert. Opin. Ther. Targets (2010), 15:91-101; Bruniquel D. et al. (1998), Immunogenetics, 48:116-24). После антигенспецифической стимуляции с помощью "воскресшего" антигена (т.е. CMV (цитомегаловируса) или столбнячного токсина) большинство активированных Т-клеток является LAG-3⁺. Кроме того, у людей LAG-3 экспрессируется на субпопуляции (1-10%) CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ регуляторных Т-клеток в крови здорового человека. Эта популяция, по-видимому, является функционально подавленной *in vitro* посредством клеточного контакта и IL10-зависимых механизмов и, следовательно, может представлять собой популяцию недавно активированных естественных или индуцированных регуляторных Т-клеток [Camisaschi C., Casati C., Rini F. et al. (2010). LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. J. Immunol. 184:6545-51). LAG-3 был обнаружен на других типах клеток гемопоэтической линии, таких как плазматоидные дендритные клетки, В-клетки и NKT-клетки, но только у мышей и главным образом после активации (Sierro S., Romero P. & Speiser D.; Expert. Opin. Ther. Targets (2010), 15:91-101).

Истощение популяции LAG-3⁺ Т-клеток можно использовать для лечения или предупреждения вызванных Т-клетками иммуновоспалительных заболеваний. При аутоиммунных заболеваниях, когда большинство аутореактивных клеток длительно активируются аутоантигенами в месте заболевания и/или рециркулируют в периферии, короткий курс истощающего антигенсвязывающего белка может селективно истощить этот аутоиммунный репертуар Т-клеток, обеспечивая долгосрочную ремиссию. Преимущество этого подхода было продемонстрировано с пан-лимфоцитарным истощающим антителом CampathTM, где одна 12 мг инъекция снижала частоту рецидива на 74% по сравнению со стандартным лечением в клиническом исследовании рассеянного склероза (The CAMMS223 Trial Investigators (2008), N Engl. J. Med. 359:1786-801). Благодаря более селективной экспрессии LAG-3 по сравнению с CD52 мишенью для CampathTM воздействие на репертуар наивных и находящихся в стадии покоя Т-клеток па-

мости и натуральных регуляторных Т-клеток должно быть снижено. Ожидается, что это приведет к улучшенному терапевтическому индексу, сохранению эффективности, но со сниженным риском инфекции и злокачественных новообразований, а также к возникновению аутоиммунитета, связанной с Campath™. Кроме того, в модели туберкулиновой пробы на коже павиана нацеленное на LAG-3 химерное антитело IMP731 опосредовало истощение популяции LAG-3⁺ Т-клеток как на периферии, так и в месте кожной пробы, что приводило к снижению ответа на туберкулиновую кожную пробу (Poirier N. et al. (2011), Clin. Exp. Immunol. 164:265-74). В другом исследовании LAG-3 поликлональное антитело истощало LAG-3⁺ инфильтрующие Т-клетки из крысиного сердечного аллотрансплантата и продлевало срок выживаемости этих трансплантатов (Haudebourg T. et al. (2007), Transplantation, 84:1500-1506).

Существует необходимость в данной области в антителах, в частности в гуманизированных антителах, которые связывают LAG-3 и вызывают истощение популяции LAG-3⁺ активированных Т-клеток и которые можно использовать в лечении аутоиммунных заболеваний, таких как псориаз, болезнь Крона, ревматоидный артрит, первичный билиарный цирроз печени, системная красная волчанка (SLE), синдром Шегрена, рассеянный склероз, язвенный колит и аутоиммунный гепатит; инфекционных заболеваний, аллергических заболеваний и рака.

Краткое изложение сущности изобретения

Согласно настоящему изобретению предложено антитело, которое способно связываться с геном активации лимфоцитов 3 (LAG-3) и которое содержит CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO: 5 и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO: 10, как они определены в табл. 1.

Предпочтительным является антитело по изобретению, которое содержит следующие CDR:

CDRL1: SEQ ID NO: 1,
CDRL2: SEQ ID NO: 2,
CDRL3: SEQ ID NO: 3;
CDRH1: SEQ ID NO: 6,
CDRH2: SEQ ID NO: 7,
CDRH3: SEQ ID NO: 8.

Еще более предпочтительным является антитело, которое содержит а) переменный участок легкой цепи (VL) согласно SEQ ID NO: 4 и б) переменный участок тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 9.

Антитело по изобретению, как оно определено выше, способно связываться с LAG-3, экспрессируемым на активированных Т-клетках, предпочтительно способно истощать популяцию LAG-3⁺ активированных человеческих Т-клеток.

Предпочтительно антитело по изобретению представляет собой гуманизированное антитело, более предпочтительно содержащее константную область IgG1 человека.

Еще более предпочтительным является гуманизированное антитело по изобретению, как оно определено выше, которое содержит а) последовательность легкой цепи по меньшей мере с 97%-ной идентичностью SEQ ID NO: 5 и б) последовательность тяжелой цепи по меньшей мере с 97%-ной идентичностью SEQ ID NO: 10.

Наиболее предпочтительным является гуманизированное, которое содержит а) последовательность легкой цепи согласно SEQ ID NO: 5 и б) последовательность тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 10 и которое не фукозилировано.

Также согласно изобретению предложено гуманизированное антитело, содержащее переменный участок легкой цепи (VL) согласно SEQ ID NO: 4 и переменный участок тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 9, где антитело не содержит фукозу на коровой углеводной структуре, присоединенной к Asn297.

Согласно еще одному аспекту изобретения предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело по изобретению, как оно определено выше.

Согласно еще одному аспекту предложен экспрессионный вектор, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты.

Еще один аспект изобретения составляет клетка-хозяин, содержащая указанный экспрессионный вектор, а также клетка-хозяин, содержащая указанный экспрессионный вектор, в которой ген FUT8, кодирующий альфа-1,6-фукозилтрансферазу, инактивирован.

Еще один аспект изобретения составляет антитело, продуцируемое клеткой-хозяином, как она определена выше.

Также согласно изобретению предложен способ получения антитела по изобретению, как оно определено выше, включающий а) культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и б) выделение антитела.

Еще один аспект изобретения составляет способ получения нефукозилированного гуманизированного антитела по изобретению, в частности антитела, которое не содержит фукозу на коровой углеводной структуре, присоединенной к Asn297, включающий а) культивирование рекомбинантной клетки-хозяина, в которой ген FUT8, кодирующий альфа-1,6-фукозилтрансферазу, инактивирован, в условиях, подходящих для экспрессии гуманизированного антитела, и б) выделение гуманизированного антитела.

Также согласно изобретению предложена фармацевтическая композиция, способная истощать популяцию LAG-3⁺ активированных Т-клеток, содержащая а) антитело по изобретению, как оно определено выше, и б) фармацевтически приемлемый носитель.

Еще один аспект изобретения составляет применение антитела по изобретению, как оно определено выше, для лечения заболеваний, связанных с вовлечением патогенных Т-клеток, в частности применение указанного антитела для лечения аутоиммунного заболевания, представляющего собой псориаз.

Описание графических материалов

Фиг. 1: Связывание антитела с LAG-3-экспрессирующими EL4 (А) и активированными человеческими CD3⁺ Т-клетками (В). Синагис, моноклональное антитело против несвязанной мишени, использовали в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 2: Влияние афукозилированного антитела H5L7BW, введенного внутривенно, на одновременно введенные активированные человеческие PBMC (моноклеарные клетки периферической крови), извлеченные из брюшной полости через 24 ч после инъекции. А) Количественное определение человеческих CD4⁺LAG-3⁺ и CD8⁺LAG-3⁺ Т-клеток через 24 ч после совместного введения 1×10⁷ активированных человеческих PBMC и 5 мг/кг контрольного антитела, H5L7BW или Campath™ (Донор А: Контроль n=2; H5L7BW n=2, MabCampath n=1; Донор В: Контроль n=2; H5L7BW n=3, Campath™ n=2). В) Количественное определение суммы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. (*p<0,001).

Фиг. 3: Влияние афукозилированного антитела H5L7BW и его улучшенного, не-ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) варианта H5L7 на активированные человеческие PBMC, совместно введенные внутривенно и извлеченные из брюшной полости через 5 ч после инъекции. А) Количественное определение человеческих CD4⁺LAG-3⁺ и CD8⁺LAG-3⁺ Т-клеток через 5 ч после совместного введения 1×10⁷ активированных человеческих PBMC и 5 мг/кг контрольного антитела, H5L7BW или H5L7 (n=3 на группу). В) Количественное определение совокупности CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. (*p<0,001).

Фиг. 4: Влияние афукозилированного антитела H5L7BW, введенного внутривенно за 18 ч до введения человеческих активированных PBMC в брюшную полость мышей SCID. А) Количественное определение человеческих CD4⁺LAG-3⁺ и CD8⁺LAG-3⁺Т-клеток через 5 ч после внутривенной инъекции 5×10⁶ (n=1 на группу) или 1×10 O/N (n=4 на группу) активированных человеческих PBMC. В) Количественное определение суммы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. 5 мг/кг H5L7BW или контрольного антитела ввели внутривенно за 18 ч до инъекции активированных человеческих PBMC. (*p<0,001, # p=0,0052).

Фиг. 5: Влияние H5L7BW, H5L7 или IMP731 (5 мг/кг), введенных внутривенно за 18 ч до введения активированных человеческих PBMC в брюшную полость мышей SCID. А) Количественное определение человеческих CD4⁺LAG-3⁺ и CD8⁺ LAG-3⁺Т-клеток через 5 ч после внутривенной инъекции 1×10⁷ (n=4 на группу) активированных человеческих PBMC. 5 мг/кг H5L7BW, H5L7, IMP731 или контрольного антитела вводили внутривенно за 18 ч до инъекции человеческих PBMC. В) Количественное определение суммы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. 5 мг/кг LAG-3 истощающих антител или контрольного антитела вводили внутривенно за 18 ч до инъекции активированных человеческих PBMC. (*p<0,001).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение, главным образом, относится к антителам, которые связываются с геном активации лимфоцитов 3 (LAG-3), и, более конкретно, к антителам, которые могут вызывать истощение популяции LAG-3⁺ активированных Т-клеток.

Если не указано иное, термин "LAG-3" при использовании в данном описании изобретения относится к гену активации лимфоцитов 3. Термин "LAG-3" включает, без ограничения ими, LAG-3, экспрессируемый в виде димера на поверхности, например, активированных Т-клеток, NK-клеток и В-клеток (также известных в данной области как, например, CD223), и растворимую форму LAG-3, обнаруженную, например, в сыворотке крови человека, называемую в данном описании изобретения "sLAG-3". Если не указано иное, ссылки в данном описании изобретения на "sLAG-3" и "LAG-3" относятся к полипептидам человека. В конкретном воплощении в настоящем изобретении предложены антитела, способные связывать форму LAG-3, экспрессируемую в виде димера на поверхности, например, активированных Т-клеток, NK-клеток и В-клеток (также известных в данной области как, например, CD223). Более конкретно, настоящее изобретение относится к антителам, которые способны связывать LAG-3, экспрессируемый на активированных Т-клетках и которые способны вызывать истощение популяции указанных активированных Т-клеток.

В одном аспекте изобретения предложено антитело, содержащее CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO: 5 и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO: 10.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложено антитело, содержащее следующие CDR:

CDRL1: SEQ ID NO: 1,
CDRL2: SEQ ID NO: 2,
CDRL3: SEQ ID NO: 3;
CDRH1: SEQ ID NO: 6,

CDRH2: SEQ ID NO: 7,

CDRH3: SEQ ID NO: 8.

В другом аспекте изобретения предложено антитело, содержащее переменный участок легкой цепи, содержащий CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO: 5, и переменный участок тяжелой цепи, содержащий CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO: 10.

В конкретном аспекте антитело представляет собой гуманизованное антитело, возможно IgG.

Термин "CDR" при использовании в данном описании изобретения относится к аминокислотным последовательностям областей, определяющих комплементарность, антитела. Они представляют собой гиперпеременные участки тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов. В переменном участке иммуноглобулина имеются три CDR (или участков CDR) тяжелой цепи и три CDR легкой цепи.

Специалистам в данной области понятно, что существуют различные системы нумерации последовательностей CDR; Chothia (Chothia et al. (1989), Nature, 342:877-883), Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath) и Contact (University College London). Может быть определена минимальная перекрывающаяся область с использованием по меньшей мере двух из Kabat, Chothia, AbM и Contact методов с получением "минимальной единицы связывания". Минимальная единица связывания может быть субфрагментом CDR. Структура и укладка белка антитела могут подразумевать, что другие остатки считаются частью последовательности CDR, и это понятно специалисту.

Если не указано иное и/или в отсутствие конкретно идентифицированной последовательности, ссылки, приведенные в данном описании изобретения, на "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" относятся к аминокислотным последовательностям, пронумерованным в соответствии с любой из известных систем, указанных в табл. 1. В конкретном воплощении используемой системой нумерации является система Kabat. Ссылки в данном описании изобретения на "положение 27E" относятся к аминокислоте, присутствующей в положении 27E в переменном домене легкой цепи, определенной с использованием системы нумерации по Kabat. Специалисту понятно, что это положение имеет эквивалент в соответствии с другими известными системами, такими как, например, Chothia, где положение 27E эквивалентно положению 30B.

В табл. 1 представлено одно определение с использованием каждой системы нумерации для каждого CDR или единицы связывания. Следует отметить, что некоторые определения CDR могут варьироваться в зависимости от конкретной используемой публикации.

Таблица 1

	Kabat CDR	Chothia CDR	AbM CDR	Contact CDR	Минимальная единица связывания
H1	31-35/35A/35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

Термин "вариант CDR" при использовании в данном описании изобретения относится к CDR, который был модифицирован посредством по меньшей мере одной, например 1, 2 или 3 аминокислотных замен, делеций или добавлений, где модифицированное антитело, содержащее вариант CDR, по существу сохраняет биологические характеристики антитела до модификации. Следует иметь в виду, что каждый CDR, который может быть модифицирован, может быть модифицирован сам по себе или в комбинации с другим CDR. В одном аспекте модификация представляет собой замену, в частности консервативную замену, например, как показано в табл. 2.

Таблица 2

Боковая цепь	Элементы
Гидрофобные	Met, Ala, Val, Leu, Ile
Нейтральные гидрофильные	Cys, Ser, Thr
Кислые	Asp, Glu
Основные	Asn, Gln, His, Lys, Arg
Остатки, которые влияют на ориентацию цепи	Gly, Pro
Ароматические	Trp, Tyr, Phe

Например, в одном варианте CDR аминокислотные остатки минимальной единицы связывания могут оставаться такими же, но фланкирующие остатки, которые содержат CDR, как часть определения(ий) по Kabat или Chothia, могут быть замещены консервативным аминокислотным остатком.

Такие антитела, содержащие модифицированные CDR или минимальные единицы связывания, как описано выше, могут упоминаться в данном описании изобретения как "функциональные варианты CDR" или "функциональные варианты единиц связывания".

Антитела по настоящему изобретению могут быть способны к связыванию с sLAG-3. В одном аспекте равновесная константа диссоциации (KD) взаимодействия антитело-sLAG-3 составляет 10 нМ или менее, например 1 нМ или менее, например от 1 до 300, 400, 500 пМ или от 500 пМ до 1 нМ. Специалисту в данной области очевидно, что чем меньше численное значение KD, тем сильнее связывание. Величина, обратная KD (т.е. 1/KD), представляет собой равновесную константу ассоциации (KA) с единицами измерения M^{-1} . Специалисту очевидно, что чем больше численное значение KA, тем сильнее связывание.

В одном аспекте в настоящем изобретении раскрыты антитела, которые способны связывать рекомбинантный LAG-3 с KD менее 1 нМ, например от 1 пМ до 300 пМ, при определении с помощью анализа Biacore™ поверхностного плазмонного резонанса с использованием рекомбинантных внеклеточных доменов (ECD) LAG-3 человека или яванского макака, имеющих SEQ ID NO: 51 и 52, соответственно.

Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут быть также способны связывать LAG-3, экспрессируемый, например, на клетках EL4 или на активированных человеческих $CD3^+$ Т-клетках.

Антитела по настоящему изобретению также могут быть способны обеднять популяцию LAG-3⁺ активированных Т-клеток, в частности $CD4^+LAG-3^+$ и $CD8^+LAG-3^+$ Т-клеток. Обеднение популяции LAG-3⁺ Т-клеток может происходить посредством, например, антителозависимой клеточной цитотоксической активности (ADCC) и/или комплементзависимой цитотоксической активности (CDC).

В одном аспекте в настоящем изобретении раскрыты антитела, которые способны вызывать более чем 40%-ное истощение популяции антиген-специфических $CD4$ и/или $CD8$ LAG-3⁺ человеческих Т-клеток посредством ADCC в анализе *in vitro* с использованием первичных человеческих Т-клеток.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении раскрыты антитела, которые в концентрации 0,1 мкг/мл способны вызывать более чем 50%-ное истощение в ADCC анализе *in vitro* с использованием меченных европием LAG-3-экспрессирующих EL4 клеток в качестве клеток-мишеней и человеческих РВМС в качестве эффекторных клеток, где соотношение эффектор:мишень составляет не более 50:1 и анализ выполняется в течение 2 ч. % лизиса клеток рассчитывают на основе высвобождения европия из LAG-3-экспрессирующих EL4 клеток.

Взаимодействие между константной областью антитела и различными Fc-рецепторами (FcR), включающими FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD 16), как полагают, опосредует эффекторные функции антитела, такие как ADCC и CDC. Значительные биологические эффекты могут быть следствием эффекторной функции. Как правило, способность опосредовать эффекторную функцию требует связывания антитела с антигеном, и не все антигенсвязывающие белки будут опосредовать каждую эффекторную функцию.

Эффекторную функцию можно измерить с помощью ряда способов, включая, например, связывание антитела по настоящему изобретению посредством FcγRIII с естественными клетками-киллерами или посредством FcγRI с моноцитами/макрофагами для измерения ADCC-эффекторной функции. Например, антитело по настоящему изобретению можно оценить в отношении ADCC-эффекторной функции в анализе естественных клеток-киллеров. Примеры таких анализов можно найти в Shields et al., 2001, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, p. 6591-6604; Chappel et al., 1993, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 268, p. 25124-25131; Lazar et al., 2006, PNAS, 103; 4005-4010.

Примеры анализов для определения CDC-функции включают описанные в 1995, J. ImmMeth. 184:29-38.

Термин "антитело" при использовании в данном описании изобретения относится к молекулам с иммуноглобулин-подобным доменом и включает моноклональные (например, IgG, IgM, IgA, IgD или IgE), рекомбинантные, поликлональные, химерные, гуманизированные, биспецифические и гетероконъюгированные антитела; единичный переменный домен (например, VL), доменное антитело (dAb®), фрагменты связывания антигена, иммунологически эффективные фрагменты, Fab, F(ab')₂, Fv, дисульфид-связанный Fv, одноцепочечный Fv, мультиспецифичные антитела с закрытой конформацией, дисульфид-связанный scFv, диатела, TANDABS™ и т.д. и модифицированные варианты любого из вышеперечисленных (краткое изложение альтернативных форматов "антитела" см. в Holliger and Hudson, Nature Biotechnology, 2005, Vol. 23, No. 9, 1126-1136). Альтернативные форматы антител включают альтернативные каркасы, в которых один или более CDR любых молекул в соответствии с описанием могут располагаться на подходящем неиммуноглобулиновом белковом каркасе или остоле, таком как аффитело, SpA остов, домен рецептора LDL класса A, авимер (см., например, публикацию патентной заявки США 2005/0053973, 2005/0089932, 2005/0164301) или домен EGF.

В еще одном аспекте антитело представляет собой гуманизированное антитело.

"Гуманизированное антитело" относится к типу сконструированного антитела, имеющему CDR, происходящие из иммуноглобулина донора, не являющегося человеком, а остальные происходящие из иммуноглобулина части молекулы происходят из одного (или более) человеческого(их) иммуноглобулина(ов). Кроме того, остатки, поддерживающие каркас, могут быть изменены для сохранения аффинности

связывания (см., например, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)). Подходящим человеческим акцепторным антителом может быть антитело, выбранное из обычной базы данных, например базы данных KABAT®, базы данных Los Alamos и базы данных Swiss Protein, по гомологии с нуклеотидными и аминокислотными последовательностями донорного антитела. Человеческое антитело, характеризующееся гомологией с каркасными участками донорного антитела (на аминокислотной основе), может быть пригодно для предоставления константной области тяжелой цепи и/или каркасного участка варибельной области тяжелой цепи для вставки донорных CDR. Подходящее акцепторное антитело, способное предоставить константные или каркасные участки варибельной области легкой цепи, могут быть выбраны аналогичным образом. Следует отметить, что нет необходимости в том, чтобы тяжелые и легкие цепи акцепторного антитела происходили из того же акцепторного антитела. В предшествующем уровне техники описаны несколько способов получения таких гуманизированных антител - см., например, EP-A-0239400 и EP-A-054951.

В еще одном аспекте гуманизированное антитело имеет константную область человеческого антитела, которое представляет собой IgG1, например константную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 46.

Следует понимать, что в настоящем изобретении, кроме того, предложены гуманизированные антитела, которые содержат а) последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 5 или последовательность легкой цепи по меньшей мере с 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%-ной идентичностью любой из SEQ ID NO: 5 и б) последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 10 или последовательность тяжелой цепи по меньшей мере с 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%-ной идентичностью любой из SEQ ID NO: 10.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложено гуманизированное антитело, которое содержит а) последовательность легкой цепи по меньшей мере с 90% идентичностью SEQ ID NO: 5 и б) последовательность тяжелой цепи по меньшей мере с 90% идентичностью SEQ ID NO: 10.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложено гуманизированное антитело, которое содержит а) последовательность легкой цепи по меньшей мере с 95% идентичностью SEQ ID NO: 5 и б) последовательность тяжелой цепи по меньшей мере с 95% идентичностью SEQ ID NO: 10.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложено гуманизированное антитело, которое содержит а) последовательность легкой цепи по меньшей мере с 97% идентичностью SEQ ID NO: 5 и б) последовательность тяжелой цепи по меньшей мере с 97% идентичностью SEQ ID NO: 10.

В еще одном аспекте, в настоящем изобретении предложено гуманизированное антитело, которое содержит а) последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 5 и б) последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 10.

Следует понимать, что в настоящем изобретении кроме того предложены гуманизированные антитела, которые содержат а) последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 35 или последовательность легкой цепи по меньшей мере с 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%-ной идентичностью любой из SEQ ID NO: 35 и б) последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 36 или последовательность тяжелой цепи по меньшей мере с 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%-ной идентичностью любой из SEQ ID NO: 36.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложены антитела, содержащие CDRL1-L3 и CDRH1-H3 с SEQ ID NO: 35 и 36 соответственно.

Для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей термин "идентичный" или "идентичность" указывает на степень идентичности между двумя нуклеиновыми кислотами или двумя аминокислотными последовательностями при оптимальном выравнивании и сравнении с соответствующими вставками или делециями.

Процент идентичности двух последовательностей является функцией от числа идентичных положений, общих для этих последовательностей (т.е. % идентичности = число идентичных положений/общее число положений, умноженное на 100), с учетом количества пропусков и длину каждого пропуска, который необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности двух последовательностей могут быть выполнены с использованием математического алгоритма, как описано ниже.

Процент идентичности запрашиваемой нуклеиновокислотной последовательности и рассматриваемой нуклеиновокислотной последовательности представляет собой значение "идентичности", выраженное в процентах, которое рассчитывается при помощи алгоритма BLASTN, когда рассматриваемая нуклеиновокислотная последовательность имеет 100% охват запроса с запрашиваемой нуклеиновокислотной последовательностью после выполнения попарного выравнивания BLASTN. Такие попарные выравнивания BLASTN запрашиваемой нуклеиновокислотной последовательности и рассматриваемой нуклеиновокислотной последовательности выполняют, используя настройки алгоритма BLASTN по умолчанию, доступные на веб-сайте Национального центра института биотехнологии с выключенным фильтром областей низкой сложности. Важно, что запрашиваемая нуклеиновокислотная последовательность может быть описана с помощью нуклеиновокислотной последовательности, определенной в одном или более пунктах формулы изобретения.

Процент идентичности запрашиваемой аминокислотной последовательности и рассматриваемой аминокислотной последовательности представляет собой значение "идентичности", выраженное в про-

центах, которое рассчитывается при помощи алгоритма BLASTP, когда рассматриваемая аминокислотная последовательность имеет 100% охват запроса с запрашиваемой аминокислотной последовательностью после выполнения попарного выравнивания BLASTP. Такие попарные выравнивания BLASTP запрашиваемой аминокислотной последовательности и рассматриваемой аминокислотной последовательности выполняют, используя настройки алгоритма BLASTP по умолчанию, доступные на веб-сайте Национального Центра Института Биотехнологии с выключенным фильтром областей низкой сложности. Важно, что запрашиваемая аминокислотная последовательность может быть описана с помощью аминокислотной последовательности, определенной в одном или более пунктах формулы изобретения.

Получение.

Антитела, такие как гуманизированные антитела по настоящему изобретению, могут быть получены посредством трансфекции клетки-хозяина экспрессионным вектором, содержащим последовательность(и), кодирующую(ие) антитело по изобретению. Экспрессионный вектор или рекомбинантную плазмиду получают путем помещения этих последовательностей, кодирующих антитело, в функциональную ассоциацию с традиционными регуляторными контролирующими последовательностями, способными контролировать репликацию и экспрессию в клетке-хозяине, и/или секрецию из клетки-хозяина. Регуляторные последовательности включают промоторные последовательности, например CMV-промотор, и сигнальные последовательности, которые могут происходить из других известных антител. Аналогично, может быть получен второй экспрессионный вектор, имеющий последовательность ДНК, которая кодирует комплементарную легкую или тяжелую цепь антитела. В некоторых воплощениях этот второй экспрессионный вектор идентичен первому, кроме случаев, когда имеют дело с кодирующими последовательностями и селективными маркерами, так чтобы обеспечить, насколько это возможно, функциональную экспрессию каждой полипептидной цепи. Альтернативно, кодирующие последовательности тяжелой и легкой цепей антитела могут находиться на одном векторе.

Выбранная клетка-хозяин ко-трансфицирована посредством обычных методов и первым, и вторым векторами (или просто трансфицирована одним вектором) для создания трансфицированной клетки-хозяина по изобретению, содержащей обе рекомбинантные или синтетические легкие и тяжелые цепи. Трансфицированную клетку затем культивируют обычными методами с получением сконструированного антитела по изобретению. Антитело, которое содержит ассоциацию и рекомбинантной тяжелой и/или легкой цепи, отделяют от культуры посредством соответствующего анализа, такого как ELISA или RIA (радиоиммуноанализ). Аналогичные традиционные методы можно использовать для создания других антител.

Подходящие векторы для стадий клонирования и субклонирования, используемые в способах и конструировании композиций по настоящему изобретению, могут быть выбраны специалистом в данной области. Например, можно использовать обычную серию клонирующих векторов pUC. Один вектор, pUC19, имеется в продаже у фирм-поставщиков, таких как Amersham (Buckinghamshire, United Kingdom) или Pharmacia (Uppsala, Sweden). Кроме того, любой вектор, который способен легко реплицироваться, имеет множество сайтов клонирования и селективируемых генов (например, устойчивости к антибиотикам) и является легко управляемым, можно использовать для клонирования. Таким образом, выбор клонирующего вектора не является ограничивающим фактором в данном изобретении.

Экспрессионные векторы также могут охарактеризоваться генами, подходящими для амплифицированной экспрессии гетерологичных последовательностей ДНК, например геном дигидрофолатредуктазы (DHFR) млекопитающих. Другие предпочтительные векторные последовательности включают поли(А)сигнальную последовательность, например, из гормона роста крупного рогатого скота (BGH) и последовательность промотора бета-глобина (betaglopro). Экспрессионные векторы, пригодные в данном изобретении, могут быть синтезированы методами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

Компоненты таких векторов, например репликоны, гены селекции, энхансеры, промоторы, сигнальные последовательности и подобные, могут быть получены из коммерческих или природных источников или синтезированы известными методами для использования в управлении экспрессией и/или секрецией продукта рекомбинантной ДНК в выбранном хозяине. Другие подходящие экспрессионные векторы, множество типов которых известно в данной области техники для экспрессии в млекопитающих, бактериях, насекомых, дрожжах и грибах, также могут быть выбраны для этой цели.

Настоящее изобретение также включает клеточную линию, трансфицированную рекомбинантной плазмидой, содержащей кодирующие последовательности антител по настоящему изобретению. Также обычными являются клетки-хозяева, используемые для клонирования и других манипуляций с этими клонирующими векторами. Однако клетки из различных штаммов E.coli могут быть использованы для репликации клонирующих векторов и других стадий в создании антител по данному изобретению.

Подходящие клетки-хозяева или клеточные линии для экспрессии антител по изобретению включают клетки млекопитающих, такие как NS0, Sp2/0, CHO (яичников китайского хомячка) (например, DG44), COS (фибробласты африканской зеленой марышки), HEK (клетки почки эмбриона человека), клетки фибробластов (например, 3T3) и клетки миеломы, например, они могут экспрессироваться в CHO или в клетке миеломы. Можно использовать человеческие клетки, таким образом обеспечивая возмож-

ность модификации молекулы в соответствии с профилем гликозилирования человека. Альтернативно, можно использовать другие эукариотические клеточные линии. Выбор подходящих клеток млекопитающих и методы трансформации, культивирования, амплификации, скрининга, получения и очистки продукта известны в данной области. См., например, Sambrook et al., упоминавшийся выше.

Бактериальные клетки могут оказаться полезными в качестве клеток-хозяев, подходящих для экспрессии рекомбинантных Fabs или других воплощений настоящего изобретения (см., например, Plückthun, A., Immunol. Rev., 130:151-188 (1992)). Однако из-за тенденции белков, экспрессируемых в бактериальных клетках, находиться в развернутой, или в неправильно сложенной форме, или в негликозилированной форме любой рекомбинантный Fab, полученный в бактериальной клетке, следует подвергнуть скринингу на сохранение способности связывать антиген. Если молекула, экспрессируемая бактериальной клеткой, была получена в правильно свернутой форме, такая бактериальная клетка является желательным хозяином, или в альтернативных воплощениях молекула может экспрессироваться в хозяине-бактерии и затем быть подвергнута рефолдингу. Например, различные штаммы *E. coli*, используемые для экспрессии, хорошо известны как клетки-хозяева в биотехнологической области. Различные штаммы *B. subtilis*, *Streptomyces*, другие бациллы и т.п. также могут быть использованы в этом способе.

Если необходимо, штаммы дрожжевых клеток, известные специалистам в данной области, также доступны в качестве клеток-хозяев, так же как клетки насекомых, например *Drosophila* и *Lepidoptera* и вирусные системы экспрессии. См., например, Miller et al., Genetic Engineering, 8:277-298, Plenum Press (1986) и приведенные в них ссылки.

Общие методы, с помощью которых могут быть сконструированы векторы, методы трансфекции, требующиеся для получения клеток-хозяев по изобретению, и методы культивирования, необходимые для получения антитела по изобретению из такой клетки-хозяина, все могут быть традиционно используемыми методами. Как правило, способ культивирования по настоящему изобретению представляет собой бессывороточный способ культивирования, обычно культивирования клеток без сыворотки в суспензии. Более того, будучи полученными, антитела по изобретению могут быть очищены от содержимого клеточной культуры в соответствии со стандартными процедурами в данной области, включая осаждение сульфатом аммония, аффинные колонки, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и подобное. Такие методы находятся в рамках компетентности в данной области техники и не ограничивают данное изобретение. Например, препараты измененных антител описаны в WO 99/58679 и WO 96/16990.

В еще одном способе экспрессии антител можно использовать экспрессию в трансгенном животном, например, как описано в патенте США 4873316. Это относится к системе экспрессии с использованием казеинового промотора животных, который при трансгенном встраивании в животного позволяет самке продуцировать необходимый рекомбинантный белок в ее молоке.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ получения антитела (например, гуманизированного антитела) по изобретению, который включает стадию культивирования клетки-хозяина, трансформированной или трансфицированной вектором, кодирующим легкую и/или тяжелую цепь антитела по изобретению, и извлечение антитела, полученного таким образом.

В соответствии с настоящим изобретением предложен способ получения анти-LAG-3 антиген-связывающего антитела (например, гуманизированного антитела) по настоящему изобретению, который связывается с человеческим LAG-3, включающий следующие стадии:

- (а) предоставление первого вектора, кодирующего тяжелую цепь антитела;
- (б) создание второго вектора, кодирующего легкую цепь антитела;
- (в) трансформация клетки-хозяина млекопитающего (например, CHO) указанными первым и вторым векторами;
- (г) культивирование клетки-хозяина со стадии (в) в условиях, способствующих секреции антитела из указанной клетки-хозяина в указанную культуральную среду;
- (д) извлечение антитела, секретируемого на стадии (г).

После экспрессии желательным способом антитело затем может быть проверено на активность *in vitro* с использованием соответствующего анализа, такого как анализ Biacore поверхностного плазмонного резонанса, для оценки связывания антитела с LAG-3. Кроме того, другие анализы *in vitro* и *in vivo* также можно использовать для определения способности антитела вызывать истощение популяции клеток, экспрессирующих LAG-3, таких как популяции активированных человеческих Т-клеток.

Специалисту в данной области очевидно, что при продуцировании антитела могут иметь место посттрансляционные модификации, в частности, в зависимости от используемой клеточной линии и конкретной аминокислотной последовательности антитела. Например, они могут включать отщепление некоторых лидерных последовательностей, добавление различных сахарных группировок в различных профилях гликозилирования и фосфорилирования, дезамидирование, окисление, перестройка дисульфидной связи, изомеризация, удаление С-концевого лизина и циклизация N-концевого глутамина. Настоящее изобретение включает применение антител, которые были подвергнуты или претерпели одну или более посттрансляционных модификаций. Таким образом, "антитело" по изобретению включает "антитело", как оно определено выше, которое претерпело пост-трансляционную модификацию, такую как описано в данном изобретении.

Гликозилирование антител по консервативным положениям их константных участков, как известно, оказывает огромное влияние на функции антител, в частности на эффекторные функции, см., например, Boyd et al. (1996), *Mol. Immunol.* 32:1311-1318. Рассматриваются гликозилированные варианты антител по изобретению, где одна или более углеводные группировки добавлены, замещены, удалены или модифицированы. Включение мотива аспарагин-Х-серин или аспарагин-Х-треонин создает потенциальный сайт для ферментативного присоединения углеводных остатков и, следовательно, может быть использован для управления гликозилированием антитела. В Raju et al. (2001), *Biochemistry*, 40:8868-8876 терминальное сиалилирование иммуноадгезина TNFR-IgG увеличивали посредством процесса регалактозилирования и/или ресиалилирования с использованием бета-1,4-галактозилтрансферазы и/или альфа-2,3-сиалилтрансферазы. Считается, что увеличение терминального сиалилирования увеличивает время полужизни иммуноглобулина. Антитела, как и большинство гликопротеинов, обычно получают в виде смеси гликоформ. Эта смесь особенно очевидна, когда антитела продуцируются в эукариотических клетках, особенно в клетках млекопитающих. Для изготовления определённых гликоформ были разработаны разнообразные способы, см. Zhang et al. (2004), *Science*, 303:371; Sears et al. (2001), *Science*, 291:2344; Wacker et al. (2002), *Science*, 298:1790; Davis et al. (2002), *Chem. Rev.* 102:579; Hang et al. (2001), *Acc. Chem. Res.* 34:727. Антитела (например, изотипа IgG, например IgG1), как описано в данном изобретении, могут содержать определенное количество (например, 7 или менее, например 5 или менее, например две или одну) гликоформ.

Дезамидирование представляет собой ферментативную реакцию, главным образом преобразующую аспарагин (N) в изоаспарагиновую кислоту (D) в соотношении примерно 3:1. Аналогично, но в значительно меньшей степени дезамидирование может происходить с остатками глутамина. Дезамидирование в CDR приводит к изменению заряда молекулы, но обычно не приводит к изменению связывания антигена, а также не влияет на PK/PD (фармакокинетику/фармакодинамику).

Окисление может происходить во время изготовления и хранения (т.е. в присутствии окислительных условий) и приводит к ковалентной модификации белка, индуцированной либо непосредственно реакционноспособными формами кислорода, либо косвенно путем реакции с вторичными побочными продуктами окислительного стресса. Окисление происходит главным образом на остатках метионина, но иногда может происходить на триптофанах и свободных остатках цистеина.

Перестройка дисульфидной связи может произойти в процессе изготовления и при стандартных условиях хранения. В некоторых случаях дисульфидные связи могут разрываться или неправильно образовываться, приводя к непарным остаткам цистеина (-SH). Эти свободные (непарные) сульфгидрильные группы (-SH) могут содействовать перестановке.

Изомеризация обычно происходит во время изготовления, очистки и хранения (при кислом pH) и обычно происходит, когда аспарагиновая кислота превращается в изоаспарагиновую кислоту посредством химического процесса.

N-концевой глутамин в тяжелой цепи и/или в легкой цепи, вероятно, образует пироглутамат (pGlu). Большая часть pGlu образуется в производственном биореакторе, но он может образовываться неферментативно, в зависимости от pH и температуры при обработке и условий хранения. Образование pGlu считается одним из главных путей разрушения рекомбинантных mAb (моноклональных антител).

Удаление С-концевого лизина представляет собой ферментативную реакцию, катализируемую карбоксипептидазами, и обычно наблюдается в рекомбинантных mAb. Варианты этого процесса включают удаление лизина из одной или обеих тяжелых цепей. Удаление лизина, по-видимому, не влияет на биологическую активность и не оказывает никакого влияния на эффекторные функции mAb.

Усиление эффекторной функции.

Взаимодействие между константной областью антитела и различными Fc-рецепторами (FcR), включающими FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), как полагают, опосредует эффекторные функции, такие как ADCC и CDC, антитела.

Термин "эффекторная функция" при использовании в данном описании изобретения относится к одной или более из антителозависимой клеточной цитотоксической активности (ADCC), ответов, опосредованных комплементзависимой цитотоксической активности (CDC), Fc-опосредованного фагоцитоза или антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и рециклинга антител посредством FcRn рецептора.

Свойства ADCC или CDC антител по настоящему изобретению могут быть усилены разными способами.

Было показано, что константные области человеческого IgG1, содержащие специфические мутации или измененное гликозилирование на остатке Asn297, усиливают связывание с Fc-рецепторами. В некоторых случаях эти мутации, как было показано, повышают ADCC и CDC (Lazar et al. *PNAS*, 2006, 103; 4005-4010; Shields et al. *J. Biol. Chem.* 2001, 276; 6591-6604; Nechansky et al. *Mol. Immunol.*, 2007, 44; 1815-1817).

В одном воплощении настоящего изобретения такие мутации находятся в одном или более положениях, выбранных из 239, 332 и 330 (IgG1), или в эквивалентных положениях в других изотипах IgG. Примерами подходящих мутаций являются S239D, и I332E, и A330L. В одном воплощении антитело по

изобретению, описанное в данном изобретении, мутировано в положениях 239 и 332, например S239D и I332E, или в другом воплощении оно мутировано в трех или более положениях, выбранных из 239 и 332 и 330, например S239D и I332E и A330L (нумерация согласно EU-индексу).

В одном воплощении настоящего изобретения раскрыто антитело, содержащее химерную константную область тяжелой цепи, например антитело, содержащее химерную константную область тяжелой цепи по меньшей мере с одним доменом CH2 из IgG3, так что это антитело имеет усиленную эффекторную функцию, например усиленную ADCC, или усиленную CDC, или усиленные ADCC и CDC функции. В одном таком воплощении антитело может содержать один домен CH2 из IgG3 или оба домена CH2 могут быть из IgG3.

Также раскрыт способ получения антитела по изобретению, включающий стадии:

а) культивирование рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей экспрессионный вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в данном изобретении, где экспрессионный вектор содержит нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую Fc-область, содержащую домены, происходящие из последовательностей IgG1 и IgG3 зародышевой линии человека; и

б) выделение антитела.

Такие методы получения антител могут быть выполнены, например, с использованием технологической системы COMPLEGENT™ имеющейся в BioWa, Inc. (La Jolla, CA, USA) и Kyowa Hakko Kogyo (сейчас Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) Co., Ltd., где рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор, в котором нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая Fc-область, содержащую домены, происходящие из последовательностей IgG1 и IgG3 человеческой зародышевой линии, экспрессируется с получением антитела, имеющего повышенную комплементзависимую цитотоксическую активность (CDC), которая повышена по сравнению с идентичным в остальном антителом, но лишенным такого химерного Fc-домена. Аспекты технологической системы COMPLEGENT™ описаны в WO 2007/011041 и US 20070148165, каждый из которых включен в данное описание изобретения посредством ссылки. В альтернативном воплощении активность CDC может быть увеличена путем введения специфических мутаций последовательности в Fc-область цепи IgG. Специалистам в данной области техники также понятны другие подходящие системы.

В альтернативном воплощении настоящего изобретения предложено антитело, содержащее константную область тяжелой цепи с измененным профилем гликозилирования, так что антитело имеет повышенную эффекторную функцию, например, когда антитело имеет повышенную ADCC или повышенную CDC, или когда у него повышены обе эффекторные функции ADCC и CDC. Примеры подходящих способов получения антител с измененным профилем гликозилирования описаны в WO 2003/011878, WO 2006/014679 и EP 1229125, все из которых могут быть применены к антителам по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предложен способ получения антитела по изобретению, включающий стадии:

а) культивирование рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей экспрессионный вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в данном описании изобретения, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, где в этой рекомбинантной клетке-хозяине ген FUT8, кодирующий альфа-1,6-фукозилтрансферазу, инактивирован; и

б) выделение антитела, продуцируемого рекомбинантной клеткой-хозяином.

Настоящее изобретение также предложен способ получения антитела по изобретению, включающий стадии:

а) экспрессия антитела по изобретению в рекомбинантной клетке-хозяине, где в этой рекомбинантной клетке-хозяине ген FUT8, кодирующий альфа-1,6-фукозилтрансферазу, инактивирован; и

б) выделение антитела, продуцируемого рекомбинантной клеткой-хозяином.

Такие способы получения антител могут быть выполнены, например, с использованием технологической системы POTELEGENT™, имеющейся в BioWa, Inc. (La Jolla, CA, USA), где клетки CHOK1SV, лишенные функциональной копии гена FUT8, продуцируют моноклональные антитела, имеющие повышенную антителозависимую клеточную цитотоксическую активность (ADCC), которая увеличена по сравнению с идентичными моноклональными антителами, продуцируемыми в клетке с функциональным геном FUT8. Аспекты технологической системы POTELEGENT™ описаны в US 7214775, US 6946292, WO 00/61739 и WO 02/31240, все из которых включены в данное описание посредством ссылки. Специалистам в данной области техники также понятны другие соответствующие системы.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложены нефукозилированные антитела. Ссылки в данном описании изобретения на "нефукозилированные" или "афукозилированные" антитела относятся к антителам, которые содержат триманнозильную коровую структуру N-гликанов комплексного типа в Fc без остатка фукозы. Нефукозилированные или афукозилированные антитела по настоящему изобретению не содержат фукозу на коровой углеводной структуре, присоединенной к Asn297. Эти гликоконструированные антитела, которые не имеют корового остатка фукозы из N-гликанов Fc, могут демонстрировать более сильную ADCC, чем фукозилированные эквиваленты из-за увеличения связывающей спо-

способности FcγRIIIa.

Специалистам в данной области техники понятно, что такие модификации можно использовать не только по отдельности, но и в сочетании друг с другом, чтобы еще больше усилить эффекторную функцию.

В одном таком воплощении настоящего изобретения предложено антитело, содержащее константную область тяжелой цепи, которая содержит мутированную и химерную константную область тяжелой цепи. Например, когда антитело содержит по меньшей мере один домен CH2 из человеческого IgG3 и один домен CH2 из человеческого IgG1, где домен CH2 IgG1 имеет одну или более мутаций в положениях, выбранных из 239, и 332, и 330 (например, мутации могут быть выбраны из S239D и I332E и A330L), так что антитело имеет повышенную эффекторную функцию. В этом контексте повышенная эффекторная функция может соответствовать, например, наличию повышенной ADCC или повышенной CDC, например, когда он имеет повышенную ADCC и повышенную CDC. В одном воплощении домен CH2 IgG1 имеет мутации S239D и I332E.

В альтернативном воплощении настоящего изобретения предложено антитело, содержащее химерную константную область тяжелой цепи и имеющий измененный профиль гликозилирования. В одном таком воплощении константная область тяжелой цепи содержит по меньшей мере один домен CH2 из IgG3 и один домен CH2 из IgG1 и имеет измененный профиль гликозилирования, так что отношение фукозы к маннозе составляет 0,8:3 или менее, например, когда антитело дефукозилировано таким образом, что указанное антитело имеет повышенную эффекторную функцию по сравнению с эквивалентным антителом с константной областью тяжелой цепи иммуноглобулина, не имеющей указанных мутаций и измененного профиля гликозилирования, например, когда оно имеет одну или более из следующих функций, повышенную ADCC или повышенную CDC, например, когда оно имеет повышенную ADCC и повышенную CDC.

В альтернативном воплощении антитело имеет по меньшей мере один домен CH2 человеческого IgG3 и по меньшей мере один константный домен тяжелой цепи из человеческого IgG1, где оба домена CH2 иммуноглобулина IgG мутированы в соответствии с ограничениями, описанными в данном изобретении.

В одном аспекте изобретения раскрыт способ получения антитела по настоящему изобретению, включающий стадии:

а) культивирование рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей экспрессионный вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в данном описании изобретения, где указанный экспрессионный вектор дополнительно содержит нуклеиновокислотную последовательность Fc, кодирующую Fc-область, содержащую домены, происходящие из последовательностей IgG1 и IgG3 зародышевой линии человека, и где в этой рекомбинантной клетке-хозяине ген FUT8, кодирующий альфа-1,6-фукозилтрансферазу, инактивирован; и

б) выделение антитела.

Такие методы получения антител можно выполнить, например используя технологическую систему AccretaMab™, имеющуюся в BioWa, Inc. (La Jolla, CA, USA), которая объединяет технологические системы POTEILLIGENT™ и COMPLEGENT™ для получения антитела, имеющего как повышенную ADCC, так и повышенную CDC активность, которая увеличена по сравнению с идентичным в остальном моноклональным антителом, не имеющим химерного Fc-домена и имеющим фукозу в олигосахаридах.

В еще одном воплощении настоящего изобретения предложено антитело, содержащее мутированную и химерную константную область тяжелой цепи, где указанное антитело имеет измененный профиль гликозилирования, так что антитело обладает усиленной эффекторной функцией, например, где оно имеет одну или более из следующих функций, повышенную ADCC или повышенную CDC. В одном воплощении мутации выбраны из положений 239 и 332 и 330, например мутации выбраны из S239D и I332E и A330L. В другом воплощении константная область тяжелой цепи содержит по меньшей мере один домен CH2 из человеческого IgG3 и один домен CH2 из человеческого IgG1. В одном воплощении константная область тяжелой цепи имеет измененный профиль гликозилирования, так что отношение фукозы к маннозе составляет 0,8:3 или менее, например антитело дефукозилировано, так что указанное антитело имеет повышенную эффекторную функцию по сравнению с эквивалентным нехимерным антителом или с константной областью тяжелой цепи иммуноглобулина, не имеющей указанных мутаций и измененного профиля гликозилирования.

Пролонгирование времени полужизни.

Увеличение времени полужизни или пролонгирование времени полужизни может быть полезным в применениях антител *in vivo*, особенно фрагментов антител небольшого размера. Такие фрагменты (Fv, дисульфид-связанные Fvs, Fab, scFv, dAb) обычно быстро выводятся из организма. Антитела в соответствии с описанием изобретения могут быть адаптированы или модифицированы, чтобы обеспечить увеличенное время полужизни в сыворотке *in vivo* и, следовательно, более длительную устойчивость или время пребывания, время функциональной устойчивости антитела в организме. Соответственно, такие модифицированные молекулы имеют пониженное выведение и повышенное среднее время пребывания

по сравнению с неадаптированной молекулой. Увеличенное время полужизни может улучшить фармако-кинетические и фармакодинамические свойства терапевтической молекулы и также может быть важным для улучшенного соблюдения предписанного режима терапии пациентом.

Термины "время полужизни" (" $t_{1/2}$ ") и "время полужизни в сыворотке" относятся ко времени, необходимому для уменьшения концентрации антитела в соответствии с описанием изобретения в сыворотке (или плазме) *in vivo* на 50%, например, из-за разрушения антитела и/или выведения или удаления антитела посредством природных механизмов.

Антитела по описанию изобретения могут быть стабилизированы *in vivo* и их время полужизни увеличивается посредством связывания с молекулами, которые препятствуют разрушению и/или выведению или удалению ("группировка, пролонгирующая время полужизни" или "молекула, пролонгирующая время полужизни"). Стратегии пролонгирования времени полужизни описаны, например, в "Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives", под ред. Roland Kontermann, Wiley-Blackwell, 2012, ISBN: 978-3-527-32849-9. Подходящие стратегии пролонгирования времени полужизни включают пэгилирование, полисиалилирование, HES-илирование, рекомбинантные PEG-миметики, N-гликозилирование, O-гликозилирование, Fc-слияние, сконструированный Fc, IgG связывание, слияние с альбумином, связывание с альбумином, сочетание с альбумином и наночастицы.

В одном воплощении группировка или молекула, пролонгирующая время полужизни, представляет собой полиэтиленгликолевую группировку или PEG-миметик. В одном воплощении антитело содержит (возможно состоит из) одного варибельного домена по описанию изобретения, связанного с полиэтиленгликолевой группировкой (возможно, когда указанная группировка имеет размер от примерно 20 до примерно 50 кДа, возможно линейный или разветвленный PEG массой примерно 40 кДа). Более подробное описание пэгилирования доменных антител и связывающих группировок дается в WO 04/081026. В одном воплощении антагонист состоит из мономера доменного антитела, связанного с PEG, где мономер доменного антитела представляет собой один варибельный домен согласно описанию изобретения. Подходящие PEG-миметики описаны, например, в главе 4, с. 63-80, "Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives" под ред. Roland Kontermann, Wiley-Blackwell, 2012, ISBN: 978-3-527-32849-9.

Считается, что взаимодействие между Fc-областью антитела и различными Fc-рецепторами (FcγR) опосредуют фагоцитоз и время полужизни/выведение антитела или фрагмента антитела. Неонатальный рецептор FcRn, как полагают, участвует как в выведении антитела, так и в транцитозе в тканях (см. Junghans (1997), Immunol. Res. 16:29-57; и Ghetie et al. (2000), Annu. Rev. Immunol. 18:739-766). В одном воплощении группировкой, пролонгирующей время полужизни, может быть Fc-область антитела. Такая Fc-область может включать различные модификации в зависимости от необходимого свойства. Например, эпитоп связывания рецептора реутилизации может быть включен в антитело для увеличения времени полужизни в сыворотке, см. US 5739277.

Остатки человеческого IgG1, которые, как определено, непосредственно взаимодействуют с человеческими FcRn, включают Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 и His435. Соответственно, замещения любого из положений, описанных в данном разделе, могут обеспечить увеличение времени полужизни в сыворотке и/или измененные эффекторные свойства антител.

Пролонгирование времени полужизни посредством слияния с областью Fc описано, например, в главе 9, с. 157-188, "Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives" под ред. Roland Kontermann, Wiley-Blackwell, 2012, ISBN: 978-3-527-32849-9.

Как правило, полипептид, который увеличивает время полужизни в сыворотке *in vivo*, т.е. молекула, пролонгирующая время полужизни, представляет собой полипептид, который встречается в природе *in vivo* и который препятствует разрушению или удалению посредством эндогенных механизмов, удаляющих нежелательное вещество из организма (например, человека). Как правило, такие молекулы представляют собой встречающиеся в природе белки, которые сами по себе имеют пролонгированное время полужизни *in vivo*.

Например, полипептид, который увеличивает время полужизни в сыворотке *in vivo*, может быть выбран из белков внеклеточного матрикса, белков, обнаруженных в крови, белков, обнаруженных в гематоэнцефалитическом барьере или в нервной ткани, белков, локализованных в почках, печени, мышцах, легких, сердце, коже или костях, белков стресса, специфических для заболевания белков или белков, вовлеченных в Fc-транспорт. Подходящие полипептиды описаны, например, в WO 2008/096158.

Такой подход также может быть использован для направленной доставки антитела, например единичного варибельного домена, в соответствии с описанием изобретения, в интересующую ткань. В одном воплощении предложена направленная доставка высокоаффинного единичного варибельного домена в соответствии с описанием изобретения.

В одном воплощении антитело, например единичный варибельный домен, в соответствии с описанием изобретения может быть связан, т.е. конъюгирован или находиться в ассоциации с сывороточным альбумином, его фрагментами и аналогами. Пролонгирование времени полужизни посредством слияния с альбумином описано, например, в главе 12, с. 223-247, "Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives" под ред. Roland Kontermann, Wiley-Blackwell, 2012, ISBN: 978-3-527-32849-9.

Примеры подходящего альбумина, фрагментов альбумина или вариантов альбумина описаны, например, в WO 2005/077042 и WO 2003/076567.

В другом воплощении единичный вариабельный домен, полипептид или лиганд в соответствии с описанием изобретения может быть связан, т.е. конъюгирован или находиться в ассоциации, с трансферрином, его фрагментами и аналогами.

В одном воплощении пролонгирование времени полужизни может быть достигнуто посредством целевого выбора антигена или эпитопа, увеличивающего время полужизни *in vivo*. Гидродинамический размер антитела и его время полужизни в сыворотке могут быть увеличены посредством конъюгирования или ассоциирования антитела по описанию изобретения с доменом связывания, который связывается с природной молекулой и увеличивает время полужизни *in vivo*.

Например, антитело по изобретению может быть конъюгировано или соединено с антителом или фрагментом антитела против сывороточного альбумина или против неонатального Fc-рецептора, например с dAb (доменным антителом), Fab, Fab' или scFv против SA или против неонатального Fc-рецептора, или с анти-SA аффителом или с аффителом против неонатального Fc-рецептора или с анти-SA авимером или с анти-SA доменом связывания, который содержит каркас, выбранный из группы, состоящей из CTLA-4, липокалина, SpA, аффитела, авимера, GroEl и фибронектина (см. описание этих доменов связывания в WO 2008/096158), но не ограниченный этой группой.

Конъюгирование относится к композиции, содержащей полипептид, dAb или антагонист по описанию изобретения, который соединен (ковалентно или нековалентно) с доменом связывания, таким как домен связывания, связывающий сывороточный альбумин.

В другом воплощении домен связывания может быть полипептидным доменом, таким как домен связывания альбумина (ABD) или малой молекулой, которая связывается с альбумином (описанной, например, в главе 14, с. 269-283 и в главе 15, с. 285-296, "Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives" под ред. Roland Kontermann, Wiley-Blackwell, 2012, ISBN: 978-3-527-32849-9).

В одном воплощении предложен слитый белок, содержащий антитело по изобретению и антитело или фрагмент антитела против сывороточного альбумина или неонатального Fc-рецептора.

Длительное время полужизни антитела IgG, как сообщается, зависит от его связывания с FcRn. Таким образом, замещения, которые увеличивают аффинность связывания IgG с FcRn при pH 6,0 при сохранении зависимости взаимодействия от pH, путем конструирования константной области, были всесторонне изучены (Ghetie et al., Nature Biotech. 15:637-640, 1997; Hinton et al., JBC 279:6213-6216, 2004; Dall'Acqua et al., 10 J. Immunol. 117:1129-1138, 2006). Другие способы модификации антител по настоящему изобретению включают увеличение времени полужизни *in vivo* таких белков посредством модификации константного домена иммуноглобулина или домена связывания FcRn (неонатального Fc-рецептора).

У взрослых млекопитающих FcRn, также известный как неонатальный Fc-рецептор, играет ключевую роль в поддержании уровней антител в сыворотке, действуя как защитный рецептор, который связывается и спасает антитела IgG изотипа от разрушения. Молекулы IgG подвергаются эндоцитозу эндотелиальными клетками и, будучи связаны с FcRn, возвращаются в кровоток. В отличие от этого, молекулы IgG, которые не связываются с FcRn, попадают в клетки и направляются по лизосомальному пути, где они разрушаются.

Неонатальный FcRn-рецептор, как полагают, участвует, как в выведении антител, так и в трансцитозе антител в ткани (см. Junghans R.P. (1997), Immunol. Res. 16. 29-57 and Ghetie et al. (2000), Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766). Остатки человеческого IgG1, которые, как установлено, взаимодействуют непосредственно с человеческим FcRn, включают Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 и His435. Изменения в любом из этих положений, описанное в данном разделе, может обеспечить увеличение сывороточного времени полужизни и/или измененные эффекторные свойства антител по изобретению.

Антитела по настоящему изобретению могут иметь аминокислотные модификации, которые увеличивают аффинность константного домена или его фрагмента в отношении FcRn. Увеличение времени полужизни терапевтических и диагностических IgG и других биологически активных молекул имеет много преимуществ, включая уменьшение количества и/или частоты дозирования этих молекул. В одном воплощении, таким образом, предложено антитело по изобретению, представленное в данном описании изобретения, или слитый белок, содержащий весь или часть (область связывания FcRn) константного домена IgG, имеющего одну или более этих аминокислотных модификаций, и белка, не являющегося IgG или небелковой молекулы, конъюгированной с таким модифицированным константным доменом IgG, где присутствие модифицированного константного домена IgG увеличивает время полужизни антитела *in vivo*.

В РСТ публикации WO 00/42072 раскрыт полипептид, содержащий вариант Fc-области с измененной аффинностью связывания с FcRn, этот полипептид содержит аминокислотную модификацию в любом одном или более аминокислотных положениях 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 и 447 Fc-области, где нумерация остатков в Fc-области соответствует индексу EU (Kabat et al.).

В РСТ публикации WO 02/060919 A2 описан модифицированный IgG, содержащий константный

домен IgG, содержащий одну или более аминокислотных модификаций по сравнению с константным доменом IgG дикого типа, где модифицированный IgG имеет увеличенное время полужизни по сравнению со временем полужизни IgG, имеющего константный домен IgG дикого типа, и где одна или более аминокислотных модификаций находятся в одном или более положениях 251, 253, 255, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-435.

Shields et al. (2001, *J. Biol. Chem.*; 276:6591-604) использовали аланин-сканирующий мутагенез для изменения остатков в области Fc антитела IgG1 человека и затем оценивали связывание с человеческим FcRn. Положения, в которых эффективно подавлялось связывание с FcRn при изменении на аланин, включали I253, S254, H435 и Y436. Другие положения, показавшие менее выраженное снижение связывания, являются следующими: E233-G236, R255, K288, L309, S415 и H433. Несколько аминокислотных положений демонстрировали улучшение связывания FcRn при изменении на аланин; в частности, среди них P238, T256, E272, V305, T307, Q311, D312, K317, D376, E380, E382, S424 и N434. Многие другие положения аминокислот демонстрировали небольшое улучшение (D265, N286, V303, K360, Q362 и A378) или отсутствие изменения (S239, K246, K248, D249, M252, E258, T260, S267, H268, S269, D270, K274, N276, Y278, D280, V282, E283, H285, T289, K290, R292, E293, E294, Q295, Y296, N297, S298, R301, N315, E318, K320, K322, S324, K326, A327, P329, P331, E333, K334, T335, S337, K338, K340, Q342, R344, E345, Q345, Q347, R356, M358, T359, K360, N361, Y373, S375, S383, N384, Q386, E388, N389, N390, K392, L398, S400, D401, K414, R416, Q418, Q419, N421, V422, E430, T437, K439, S440, S442, S444 и K447) в связывании FcRn.

Наиболее выраженный эффект был обнаружен для комбинированных вариантов с улучшенным связыванием с FcRn. При pH 6,0 вариант E380A/N434A показал больше чем 8-кратное улучшение связывания с FcRn, по отношению к нативному IgG1, по сравнению с 2-кратным для E380A и 3,5-кратным для N434A. Добавление T307A к нему приводит к 12-кратному улучшению связывания по сравнению с нативным IgG1. В одном воплощении антигенсвязывающий белок по изобретению содержит мутации E380A/N434A и обладает повышенным связыванием с FcRn.

В Dall'Acqua et al. (2002, *J. Immunol.*; 169:5171-80) описан неспецифический мутагенез и скрининг библиотек фагового дисплея шарнир-Fc фрагмента IgG1 человека против мышинового FcRn. Они описали неспецифический мутагенез положений 251, 252, 254-256, 308, 309, 311, 312, 314, 385-387, 389, 428, 433, 434 и 436. Значительные улучшения стабильности комплекса IgG1-человеческий FcRn наблюдаются с замещающими остатками, расположенными в полосе поперек поверхности раздела Fc-FcRn (M252, S254, T256, H433, N434 и Y436) и в меньшей степени с замещениями остатков на периферии, таких как V308, L309, Q311, G385, Q386, P387 и N389. Вариант с наибольшей аффинностью к человеческому FcRn был получен путем комбинирования мутаций M252Y/S254T/T256E и H433K/N434F/Y436H и демонстрировал 57-кратное увеличение аффинности по сравнению с IgG1 дикого типа. Поведение такого мутантного человеческого IgG1 *in vivo* демонстрировало почти 4-кратное увеличение времени полужизни в сыворотке у яванского макака по сравнению с IgG1 дикого типа.

В настоящем изобретении, следовательно, предложен вариант антитела с оптимизированным связыванием с FcRn. В предпочтительном воплощении указанный вариант антитела содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в области Fc указанного антитела, где указанная модификация выбрана из группы, состоящей из 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 и 447 области Fc по сравнению с указанным исходным полипептидом, где нумерация аминокислот в области Fc соответствует индексу EU по Kabat.

В еще одном аспекте изобретения модификации представляют собой M252Y/S254T/T256E.

Кроме того, в различных публикациях описаны способы получения физиологически активных молекул, время полужизни которых модифицировано либо посредством введения FcRn-связывающего полипептида в молекулы (WO 97/43316; патенты США 5869046; 5747035; WO 96/32478; WO 91/14438), либо посредством слияния молекул с антителами, аффинности связывания с FcRn которых сохраняются, но аффинности с другими Fc-рецепторами значительно снижены (WO 99/43713), или слияния с доменами связывания FcRn антител (WO 00/09560; патент США 4703039).

Хотя замещения в константной области способны значительно улучшить функции терапевтических IgG антител, замещения в высококонсервативной константной области имеют риск иммуногенности у человека (Presta, выше, 2008; De Groot and Martin, *Clin. Immunol.* 131:189-201, 2009) и замещение в последовательности высокоразнородной варибельной области может быть менее иммуногенным.

Сообщения, касающиеся варибельной области, включают конструирование CDR остатков для улучшения аффинности связывания с антигеном (Rothe et al., *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6:177-187, 2006; Bostrom et al., *Methods Mol. Biol.* 525:353-376, 2009; Thie et al., *Methods Mol. Biol.* 525:309-322, 2009) и конструирование CDR и каркасных остатков для улучшения стабильности (Worn and Pluckthun, *J. Mol. Biol.* 305:989-1010, 2001; Ewert et al., *Methods*, 34:184-199, 2004) и уменьшение риска иммуногенности

(De Groot and Martin, выше, 2009; Jones et al., *Methods Mol. Biol.* 525:405-423, xiv, 2009). Как сообщалось, улучшенная аффинность к антигену может быть достигнута посредством созревания аффинности с использованием фагового или рибосомного дисплея рандомизированной библиотеки.

Улучшенная стабильность может быть рационально получена на основе рационального дизайна последовательности и структуры. Снижение риска иммуногенности (деиммунизация) может быть достигнуто с помощью различных методов гуманизации и удаления Т-клеточных эпитопов, которые могут быть спрогнозированы с использованием технологий компьютерного моделирования или определены посредством анализов *in vitro*. Кроме того, вариабельные области могут быть сконструированы, чтобы снизить pI (изоэлектрическая точка). Более длительное время полужизни наблюдалось для этих антител по сравнению с антителами дикого типа, несмотря на сравнимое связывание с FcRn. Конструирование или выбор антител с pH-зависимым связыванием антигена для модификации времени полужизни антитела и/или антигена, например времени полужизни антитела IgG2, может быть сокращено, если механизмы антиген-опосредованного выведения обычно разрушают антитело при связывании его с антигеном. Аналогично, комплекс антиген:антитело может влиять на время полужизни антигена, либо удлиняя время полужизни путем защиты антигена от типичных процессов разрушения, либо укорачивая время полужизни посредством антитело-опосредованного разрушения. Одно воплощение относится к антителам с более высокой аффинностью к антигену при pH 7,4 по сравнению с эндосомальным pH (т.е. pH 5,5-6,0), так что соотношение KD (константа диссоциации) при pH 5,5/pH 7,4 или при pH 6,0/pH 7,4 составляет 2 или более. Например, для улучшения фармакокинетических (PK) и фармакодинамических (PD) свойств антитела, можно сконструировать pH-чувствительное связывание с антителом путем введения гистидинов в CDR остатки.

Фармацевтические композиции.

Антитела по настоящему изобретению обычно, но необязательно, приготавливают в виде фармацевтических композиций перед введением пациенту. Соответственно, в другом аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело по изобретению и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов и/или носителей.

Способы получения таких фармацевтических композиций хорошо известны специалистам в данной области техники (например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (1980), Mack Publishing Co и Pharmaceutical Biotechnology; Plenum publishing corporation; Volumes 2, 5 и 9).

Антитела по настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде препарата для введения любым удобным способом. Фармацевтические композиции могут, например, быть введены путем инъекции или непрерывной инфузии (примеры включают, без ограничения ими, внутривенное, внутривенное, внутримышечное, подкожное, внутримышечное и интрапортальное). В одном воплощении композиция пригодна для подкожной инъекции.

Фармацевтические композиции могут быть пригодными для местного введения (которое включает, без ограничения ими, кожное, ингаляционное, интраназальное или внутриглазное введение) или энтерального введения (которое включает, без ограничения ими, пероральное или ректальное введение).

Фармацевтические композиции могут содержать от 0,0001 до 10 мг/кг антитела, например от 0,1 до 5 мг/кг антитела. Альтернативно, композиция может содержать от 1,0 до 3,0 мг/кг.

Фармацевтические композиции могут содержать, в дополнение к антителу по настоящему изобретению, один или более других терапевтических агентов. Дополнительные терапевтические агенты, которые можно комбинировать с антителом по настоящему изобретению, включают, без ограничения ими, антитело против CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4) (например, ипилимумаб и тремелиумаб), анти-TIM-3, анти-OX40, анти-OX40L, анти-PD1 (например, ниволумаб, ламбролизумаб), анти-PD1L, анти-GITR, анти-IL-5 (например, меполизумаб), антифактор активации В-лимфоцитов (BLyS) (например, белиумаб), анти-GITRL, анти-IL-7, анти-IL-7R, анти-CD20, анти-CCL20, анти-TNF α , анти-OSM и анти-IL-6 антитела, а также ингибиторы JAK (янус-киназы), CCR9 (хемокиновый рецептор 9), RIP (рибосом-инактивирующие белки)-киназы, белки BET, ROR γ 1 и тиопурины.

Антитела по настоящему изобретению и один или более других терапевтических агентов для комбинированной терапии могут быть приготовлены вместе в одной композиции или представлены в отдельных композициях. Отдельно представленные композиции можно вводить одновременно или последовательно.

Способы применения.

Антитела, описанные в данном документе, можно использовать в терапии. Антитела по настоящему изобретению, которые связывают ген активации лимфоцитов 3 (LAG-3) и вызывают истощение популяции LAG-3⁺ активированных Т-клеток, можно использовать в лечении или предупреждении заболеваний, связанных с вовлечением патогенных Т-клеток, таких как аутоиммунные заболевания, инфекционные заболевания, аллергические заболевания и рак.

Примеры болезненных состояний, на которые антитела имеют потенциально благоприятное влияние, включают аутоиммунные заболевания, включая, но не ограничиваясь ими, псориаз, воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона и/или язвенный колит), ревматоидный артрит, пер-

вичный билиарный цирроз печени, системную красную волчанку (SLE), синдром Шегрена, рассеянный склероз, аутоиммунный гепатит, увеит, диабет I типа, анкилозирующий спондилоартрит, псориаз, псориатический артрит, тиреотоксикоз, реакция "трансплантат против хозяина", лечение и/или предупреждение отторжения трансплантата органа, например отторжение трансплантата почек или печени, первичный склерозирующий холангит, саркоидоз, васкулит, нефрит, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура, системный склероз, глютеновая болезнь, антифосфолипидный синдром, очаговая алопеция и тяжелая миастения; инфекционные заболевания, включающие, без ограничения ими, гепатит С, гепатит В, ВИЧ, туберкулез и малярию; и аллергические заболевания, включающие, без ограничения ими, астму, atopический дерматит и COPD (хроническая обструктивная болезнь легких).

Антитела по настоящему изобретению также можно использовать в лечении рака, включая, без ограничения ими, рак яичника, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), рак предстательной железы, рак кишечника (например, рак толстой кишки и рак тонкой кишки), рак желудка, рак пищевода, рак груди, рак легкого, рак почек (например, светлоклеточный рак), рак поджелудочной железы, рак матки, рак печени, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак полости рта, рак мозга, рак яичка, рак кожи, рак щитовидной железы и гематологические злокачественные заболевания, включающие миеломы и хронические и острые лейкозы.

Специалистам в данной области техники понятно, что ссылки в данном описании изобретения на "лечение" или "терапию" могут, в зависимости от состояния, распространяться на профилактику, в дополнение к лечению установленного состояния.

Таким образом, в качестве дополнительного аспекта изобретения раскрыто антитело по настоящему изобретению для применения в терапии.

Таким образом, также раскрыто антитело по настоящему изобретению для применения в лечении псориаза, болезни Крона, ревматоидного артрита, первичного билиарного цирроза печени, SLE (системной красной волчанки), синдрома Шегрена, рассеянного склероза, язвенного колита или аутоиммунного гепатита.

В другом воплощении предложено антитело по настоящему изобретению для применения в лечении псориаза.

В другом воплощении раскрыто антитело по настоящему изобретению для применения в лечении болезни Крона.

В другом воплощении раскрыто антитело по настоящему изобретению для применения в лечении язвенного колита.

Кроме того, предложено применение антитела по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения псориаза, болезни Крона, ревматоидного артрита, первичного билиарного цирроза печени, системной красной волчанки (SLE), синдрома Шегрена, рассеянного склероза, язвенного колита или аутоиммунного гепатита.

В другом воплощении предложено применение антитела по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения псориаза.

В другом воплощении раскрыто применение антитела по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения болезни Крона.

В другом воплощении раскрыто применение антитела по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения язвенного колита.

Дополнительно раскрыт способ лечения человека или животного, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела по настоящему изобретению.

Дополнительно раскрыт способ лечения заболевания, связанного с вовлечением патогенных Т-клеток у человека или животного, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела по настоящему изобретению.

Дополнительно раскрыт способ лечения псориаза, болезни Крона, ревматоидного артрита, первичного билиарного цирроза печени, системной красной волчанки (SLE), синдрома Шегрена, рассеянного склероза, язвенного колита или аутоиммунного гепатита, включающий введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела по настоящему изобретению.

В другом воплощении раскрыт способ лечения псориаза, включающий введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела по настоящему изобретению.

В другом воплощении раскрыт способ лечения болезни Крона, включающий введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела по настоящему изобретению.

В другом воплощении раскрыт способ лечения язвенного колита, включающий введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела по настоящему изобретению.

Термин "терапевтически эффективное количество", при использовании в данном описании изобретения, представляет собой количество антитела по настоящему изобретению, необходимое для облегчения или уменьшения одного или более симптомов заболевания или предупреждения или лечения заболевания.

Примеры

Следующие примеры иллюстрируют, но не ограничивают изобретение.

Пример 1. Biacore™ SPR анализ очищенных анти-LAG-3 гуманизированных антител.

A9H12 (TMP731), как описано в WO 2008/132601, был гуманизирован путем прививки мышинных CDR на человеческие акцепторные каркасные области двух тяжелых и двух легких цепей. Был получен ряд вариантов анти-LAG-3 с гуманизированной тяжелой и легкой цепью, содержащих обратные мутации от человека к мыши и модификации CDR. Варианты тяжелой цепи нумеровали от H0 до H8, и J0, и от J7 до J13 и варианты легкой цепи пронумеровывали от L0 до L10 и от M0 до M1. Супернатанты культуры ткани, содержащие все комбинации анти-LAG-3 вариантов с гуманизированными тяжелой и легкой цепями, анализировали в отношении связывания с Fc-меченым рекомбинантным растворимым LAG-3 (IMP321). Данные анализировали с использованием модели 1:1, соответствующей программному обеспечению Biacore™ 4000. Антитела выбирали на основании рассчитанной аффинности и также путем визуального сравнения сенсограмм связывания с химерным антителом IMP731. Было идентифицировано в общей сложности 54 конструкции, которые демонстрировали эквивалентное или улучшенное связывание с IMP321, для повторного анализа с использованием Biacore™ 3000. Данные были интерполированы как к модели 1:1, так и к бивалентной модели, соответствующей программному обеспечению анализа Biacore™ 3000 и данные по связыванию сравнивали путем нормализации кривых связывания при максимальной ассоциации и путем сравнения скоростей диссоциации против IMP731 визуально. Это позволяет обнаружить антитела, которые демонстрируют улучшенные скорости диссоциации по сравнению с IMP731. В общей сложности 18 гуманизированных анти-LAG-3 антител были выбраны для дальнейшего анализа на основании либо аналогичной, либо улучшенной кинетики связывания с рекомбинантным sLAG-3 по сравнению с IMP731. Эти 18 гуманизированных антител были повторно экспрессированы и проанализированы следующим образом.

Анти-LAG-3 гуманизированные антитела экспрессировали в клетках HEK 293 6Е и очищали при помощи аффинной хроматографии следующим образом.

Экспрессия HEK 293 6Е в масштабе 100 мл.

Экспрессирующие плазмиды, кодирующие тяжелые и легкие цепи гуманизированных антител, указанных в табл. 3, были временно котрансфицированы в клетки HEK 293 6Е и экспрессировались в масштабе 100 мл для получения антитела.

Очистка гуманизированных антител.

Экспрессированные молекулы антител очищали посредством аффинной хроматографии. Гранулы протеин А-сефарозы (каталожный номер GE Healthcare 17-5280-04) добавляли к супернатантам клеточных культур и смешивали при комнатной температуре в течение 30-60 мин. Гранулы протеин-сефарозы затем центрифугировали и промывали PBS. Затем смесь добавляли в 10 мл одноразовую колонку (каталожный номер Pierce: 29924) и давали стечь PBS. Колонку промывали 3 раза 10 мл PBS, затем элюировали антитело с помощью IgG элюирующего буфера (каталожный номер Pierce: 21009). Элюированное антитело сразу же нейтрализовали, используя 1 М Trizma® гидрохлоридный буфер (T2819) и затем буфер заменяли на PBS с Vivaspin 6 mwco 5000 колонкой (каталожный номер: FDP-875-105D). Выход определяли путем измерения поглощения при 280 нм. Уровень агрегированного белка в очищенном образце определяли с помощью гель-фильтрации.

Кинетика связывания.

Кинетику связывания очищенных антител с молекулой sLAG-3 оценивали с помощью SPR (поверхностный плазмонный резонанс), используя Biacore 3000. Антитела козы против каппа-цепей иммуноглобулинов человека (Southern Biotech, каталожный номер 2060-01) были иммобилизованы на чипе CM5 посредством сочетания первичных аминов. Гуманизированные анти-LAG3 антитела были захвачены на этой поверхности и LAG3-Ig молекулу IMP321 (Chrystelle Brignone, Caroline Grygar, Manon Marcu, Knut Schakel, Frederic Triebel, The Journal of Immunology, 2007, 179:4202-4211) использовали в качестве анализируемого вещества при 64 нМ с инъекцией буфера (т.е. 0 нМ), используемой для двойной привязки кривых связывания. Регенерацию выполняли с помощью 10 мМ глицина, pH 1,5. Анализ выполняли на Biacore™ 3000 с использованием HBS-EP в качестве подвижного буфера и при 25°C. Сенсограммы нормализовали в отношении связывания при максимальных скоростях ассоциации и диссоциации по сравнению с IMP731 путем визуального осмотра профилей сенсограмм.

Результаты показывают, что очищенные гуманизированные анти-LAG-3 антитела могут быть разделены на три группы; группу 1 с гуманизированными вариантами, которые, по-видимому, лучше связываются с IMP321 чем химерные IMP731; группу 2 с вариантами, которые, по-видимому, связываются аналогично IMP731; и группу 3 с вариантами, которые демонстрируют более слабое связывание по сравнению с IMP731.

10 гуманизированных вариантов попадают в группу 1 и демонстрируют улучшенные (т.е. пониженные) скорости диссоциации по сравнению с IMP731 при визуальном осмотре сенсограмм Biacore™. Все эти молекулы содержали легкую цепь L7, содержащую замену глицина на пролин в положении 27е в CDR1 легкой цепи. Эти данные показывают, что пролин в положении 27е улучшает скорость диссоциа-

ции гуманизированных анти-LAG-3 антител относительно IMP321, при спаривании с многочисленными гуманизированными тяжелыми цепями.

Из остальных протестированных антител четыре молекулы попали в группу 2 и имели скорости диссоциации, аналогичные химерному антителу IMP731, в то время как четыре другие молекулы попали в группу 3 и демонстрировали скорости диссоциации хуже, чем IMP731. В табл. 3 представлен примерный рейтинг этих молекул в сравнении с IMP731. H5L7 демонстрирует наилучшую скорость диссоциации (т.е. самую низкую) в этом эксперименте при визуальном осмотре сенсограмм Biacore.

Таблица 3

Сравнение скоростей диссоциации с IMP731

Гуманизированный вариант	Сравнение скорости диссоциации с IMP731	Ранжирование скоростей диссоциации
H5L7	лучше	1
H1L7	лучше	2
J7L7	лучше	3
H4L7	лучше	4
J11L7	лучше	5
H2L7	лучше	6
J13L7	лучше	7
H7L7	лучше	8
J0L7	лучше	9
H0L7	лучше	10
H1L1	такая же	
H5L1	такая же	
J7L1	такая же	
J11L1	такая же	
J13L1	хуже	
H7L1	хуже	
J0L1	хуже	
H0L1	хуже	

Пример 2. Анализ связывания фукозилированных и афукозилированных гуманизированных анти-LAG-3 антител дикого типа с рекомбинантным человеческим LAG-3-His с использованием Biacore™ T100.

Афукозилированное антитело H5L7BW получали путем экспрессии плазмид, кодирующих H5L7, в BioWa POTELLIGENT® (FUT8 нокаут CHO) клеточной линии. Было показано, что афукозилированные антитела, полученные с использованием технологической системы POTELLIGENT®, демонстрировали повышенную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) по сравнению с эквивалентными высокофукозилированными обычными антителами в результате повышенной аффинности с FcγRIIIa (CD16).

Фукозилированные и афукозилированные антитела дикого типа сравнивали в отношении их способности связываться с рекомбинантным человеческим LAG-3 ECD с C-концевым His6 (SEQ ID NO: 51), используя Biacore™ T100 (GE Healthcare™). Протеин А был иммобилизован на чипе CM5 посредством сочетания первичных аминов. Эту поверхность затем использовали для захвата гуманизированных антител. Рекомбинантный человеческий LAG-3 ECD-His6 затем пропускали над захваченными антителами в количестве 32, 8, 2, 0,5 и 0,125 нМ и выполняли регенерацию, используя 50 мМ NaOH. Кривые связывания дважды привязывали инъекцией буфера (т.е. 0 нМ) и данные интерполировали к программному обеспечению анализа T100, используя модель 1:1. Прогон выполняли при 25°C, используя HBS-EP в качестве подвижного буфера.

Чтобы исследовать статистическую значимость этих кинетических данных, этот эксперимент повторяли 3 раза с одной и той же партией из четырех антител и химерного контроля. Каждый из параметров KD, ka и kd преобразовывали в log (с основанием 10) перед отдельными статистическими анализами. Для каждого параметра на преобразованных данных была выполнена смешанная модель дисперсионного анализа ("Anova"), включая продолжительности пробега (случайный блокирующий эффект) и антитело.

С помощью Анова для каждого антитела были спрогнозированы средние геометрические значения, вместе со статистически приемлемыми диапазонами (95% доверительные интервалы (CI)) для каждого среднего. Запланированные сравнения антител проводили с помощью ANOVA. Сравнения представлены как отношения двух сравниваемых антител, опять с 95%-ными доверительными интервалами и значениями p . Соотношения также могут быть интерпретированы как кратные изменения, например соотношение 0,1 соответствует 90%-ному снижению.

Средние геометрические значения аффинности связывания (KD) были получены для каждого из гуманизированных антител и химерного контроля IMP731, как показано в табл. 4. Среднее KD для H5L7 составляло 0,2075 нМ, значительное уменьшение на 92% (т.е. 10-кратное уменьшение) с $p < 0,0001$ по сравнению с IMP731. IMP731 демонстрировало среднее KD, равное 2,76 нМ. Афукозилированный H5L7BW демонстрирует связывание, эквивалентное связыванию фукозилированного H5L7, со средним геометрическим KD, равным 0,2179 нМ, без значимого различия ($p = 0,1790$).

Улучшение аффинности, наблюдаемое для H5L7 по сравнению с IMP731, главным образом вызвано различиями в скоростях диссоциации антител в отношении LAG-3-ECD-His6, как показано в табл. 5. Имеет место приблизительно 85% снижение (т.е. почти 10-кратное снижение) k_d для H5L7 по сравнению с IMP731, которое является очень статистически значимым. Не имеется значительного различия между афукозилированным H5L7BW и H5L7 ($p = 0,4408$).

Таблица 4
Статистическая оценка KD фукозилированного и афукозилированного анти-LAG-3 вариантов, связывающихся с рекомбинантным человеческим LAG-3-His

Средние геометрические значения KD (нМ)				
Антитело	№ партии	Среднее геометрическое	Ниже 95% CI	Выше 95% CI
H5L7	GRITS42382	2,08E-10	1,89E-10	2,28E-10
H5L7BW	GRITS42760	2,18E-10	1,98E-10	2,40E-10
IMP731	020909	2,76E-09	2,51E-09	3,04E-09

Сравнение KD				
Сравнение KD	Отношение	Ниже 95% CI	Выше 95% CI	Значение P
H5L7BW-H5L7	1,0502	0,97268	1,13389	0,179
H5L7-IMP731	0,07736	0,0715	0,0837	<,0001

Таблица 5
Статистическая оценка k_d фукозилированных и афукозилированных анти-LAG-3 вариантов, связывающихся с рекомбинантным человеческим LAG-3-His

Средние геометрические значения k_d (1/s)				
Антитело	Серия No	Среднее геометрическое	Ниже 95% CI	Выше 95% CI
H5L7	GRITS42382	3,95E-03	3,16E-03	4,94E-03
H5L7BW	GRITS42760	4,41E-03	3,53E-03	5,51E-03
IMP731	020909	2,75E-02	2,20E-02	3,44E-02

Сравнения k_d				
сравнение KD	отношение	ниже 95% CI	выше 95% CI	значение P
H5L7BW-H5L7	1,11715	0,81531	1,53073	0,4408
H5L7-IMP731	0,15478	0,11157	0,21471	<,0001

Пример 3. Оценка эпитопа связывания LAG-3-His анти-LAG-3 гуманизированных вариантов по сравнению с химерным антителом IMP731 с использованием ProteOn™.

Эксперимент по эпитоп-специфической сортировке (биннингу эпитопов) проводили с H5L7 для того, чтобы определить, сохраняется ли при гуманизации эпитоп LAG-3, с которым связывается IMP731. Кроме того, также сравнивали эпитоп связывания фукозилированного и афукозилированного гуманизированных вариантов.

Связывание эпитопа оценивали, используя биосенсорное устройство ProteOn™ XPR36 (BioRad™), путем оценки способности анти-LAG-3 антител одновременно связываться с LAG-3-His в комплексе с

антителом, захваченным поверхностью чипа ProteOn. IMP731 и неконкурентное мышиное антитело 17B4 использовали в качестве контролей в этом анализе.

Антитела, подлежащие тестированию, биотинилировали, используя набор для биотинилирования Ez-Link-sulfo-NHS. Каждое биотинилированное антитело было захвачено отдельной проточной ячейкой на нейтравидиновом NLC-чипе с использованием вертикальной инъекции. После захвата антитела поверхность блокировали биоцитином в количестве 2,5 мг/мл. При использовании средств для совместной инъекции в соответствии с программным обеспечением ProteOn run, LAG-3 ECD-His6 инжестировали над связанными антителами в количестве 100 нМ, а затем небитинилированные антитела в количестве 100 нМ, где обе инъекции были горизонтальными, так что LAG-3-His и антитела пересекали все шесть захваченных нейтравидином антител. Анализ выполняли при 25°C и в HBS-EP на видеосистеме с матричным экраном для изучения взаимодействия белка ProteOn XPR36 Protein Interaction Array System.

Анализ данных выполняли, используя зарегистрированные точки, полученные после инъекции LAG-3-His и зарегистрированные точки, полученных после инъекции анализируемого небитинилированного антитела. Общую реакцию оценивали путем вычитания реакции, наблюдаемой при связывании антитела, из реакции, наблюдаемой при связывании LAG-3 ECD-His6. Значение положительной резонансной единицы (RU) означает, что инжестированное анализируемое антитело связалось с LAG-3 ECD-His6, находящемся в комплексе с биотинилированным антителом на поверхности захвата, покрытой нейтравидином, что свидетельствует о связывании с неконкурентными эпитопами. Отсутствие реакции или отрицательная реакция означали, что инжестированное анализируемое антитело не связалось с LAG-3 ECD-His6, находящемся в комплексе с биотинилированным антителом на поверхности, покрытой нейтравидином, что свидетельствует о связывании антител с конкурентными эпитопами.

Анти-LAG-3 гуманизированные варианты (фукозилированные и афукозилированные) не способны связываться с человеческим LAG-3 ECD-His6 в комплексе с IMP731, указывая на то, что эпитоп для LAG-3 ECD-His6 является общим и, таким образом, консервативным. Мышиное антитело 17B4 способно связываться с человеческим LAG-3 ECD-His6 в комплексе с IMP731, подтверждая, что это антитело не является конкурентным в отношении связывания LAG-3 ECD-His6 с IMP731. Напротив, гуманизированные антитела способны связываться с человеческим LAG-3 ECD-His6 в комплексе с 17B4.

Эти результаты подтверждают, что не происходило никакого изменения эпитопа между химерным IMP731 и гуманизированным вариантом IMP731, протестированным в данном эксперименте. Эксперимент также показывает, что нет разницы в связывании фукозилированных и афукозилированных антител.

Пример 4. Анализ связывания анти-LAG-3 гуманизированных антител с рекомбинантным LAG-3 ECD-His6 яванского макака и павиана с использованием Biacore™ T100.

Перекрестную реактивность связывания анти-LAG-3 гуманизированных антител для рекомбинантного LAG-3 ECD-His6 яванского макака (супо) и павиана (SEQ ID NO: 52 и 53 соответственно) оценивали, используя Biacore™ T100 (GE Healthcare™).

Протеин А был иммобилизован на чипе CM5 посредством сочетания первичных аминов. Эту поверхность затем использовали для захвата гуманизированных антител. Полученный своими силами рекомбинантный LAG-3 ECD-His6 яванского макака и павиана затем пропускали над захваченными антителами и проводили регенерацию, используя 50 mM NaOH. LAG-3 ECD-His6 пропускали в количестве 16, 4, 1, 0,25 и 0,0625 нМ. Кривые связывания дважды привязывали введением буфера (т.е. 0 нМ) и данные интерполировали в соответствии с программным обеспечением анализа T100 с использованием модели 1:1. Пробег выполняли при 37°C, используя HBS-EP в качестве подвижного буфера.

H5L7, H5L7BW и IMP731 связывались с сопоставимой аффинностью с рекомбинантным LAG-3 ECD-His6 яванского макака и павиана. Данные получали из отдельных экспериментов, однако в качестве контроля в экспериментах использовали химерное антитело IMP731.

Эти данные показывают, что оба рекомбинантных ортолога LAG-3 приматов, не являющихся человеком, связываются с происходящими от H5L7 антителами с 10-кратным улучшением аффинности по сравнению с человеческим рекомбинантным LAG-3 ECD-His6 (SEQ ID NO: 51) (H5L7: человеческий LAG-3 0,208 нМ, LAG-3 яванского макака 0,017 нМ и LAG-3 павиана 0,022 нМ; H5L7BW человеческий LAG-3 0,218 нМ, LAG-3 яванского макака 0,021 нМ и LAG-3 павиана 0,024 нМ). К тому же оба рекомбинантных ортолога LAG-3 приматов, не являющихся человеком, связываются с происходящими от IMP731 антителами с улучшением аффинности приблизительно в 100 раз по сравнению с человеческим рекомбинантным LAG-3 ECD-His6 (SEQ ID NO: 51) (IMP731: человеческий LAG-3 2,76 нМ, LAG-3 яванского макака 0,021 нМ и LAG-3 павиана 0,019 нМ).

Пример 5. Профили связывания H5L7BW, H5L7 и IMP731 с клетками EL4, экспрессирующими человеческий LAG-3, и человеческими первичными активированными CD3⁺ Т-клетками.

Клетки EL4, экспрессирующие человеческий LAG-3, инкубировали с IMP731, H5L7 или H5L7BW Alexa647-конъюгированными антителами в различных концентрациях вплоть до 50 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре. Клетки промывали буфером FACS (PBS + 0,5% BSA) для удаления несвязанного антитела.

CD3 T-клетки получали из PBMC посредством негативной селекции с использованием гранул Untouched Human T cell Dynal. CD3 T-клетки активировали посредством инкубации с иммобилизованными анти-CD3 и анти-CD28 и растворимым человеческим IL-12 в течение 3 суток при 37°C. Активированные клетки инкубировали с Alexa 647-конъюгированными антителами в различных концентрациях вплоть до 3 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре. Клетки промывали буфером FACS (PBS + 0,5% BSA).

Клетки EL4 и CD3⁺ T-клетки анализировали с помощью FACS с использованием проточного цитометра Beckman Coulter FC 500. Необработанные данные FACS анализировали, используя программу CXP Analysis (Beckman Coulter). Данные сначала наносили на график зависимости прямого рассеяния против бокового рассеяния и выбирали интересующую популяцию клеток. Эту выбранную популяцию затем представляли в виде гистограммы, демонстрирующей интенсивность флуоресценции, и рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI). Затем значения MFI наносили на график в программе GraphPad Prism 5 для получения кривых доза-ответ.

Профили связывания H5L7BW, H5L7 и IMP731 с клетками EL4, экспрессирующими человеческий LAG-3, и человеческими первичными активированными CD3⁺ T-клетками, показаны на фиг. 1. Эти три антитела демонстрируют похожие характеристики связывания с клетками EL4, экспрессирующими человеческий LAG-3 (фиг. 1 A), и активированными человеческими CD3⁺ T-клетками (фиг. 1B).

Пример 6. Оценка истощающей активности H5L7BW и H5L7 посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) в первичных человеческих T-клетках.

Доноров, используемых в этих экспериментах, подвергали проверке на вторичный ответ на CD4 антигены, присутствующие в Revaxis (дифтерия, столбняк и полиомиелит) и либо на пептидный пул CMVpp65, либо на пептидный пул CD8, содержащий пептидные эпитопы к CMV, EBV (вирус Эпштейна-Барр) и гриппу. Антигеном, используемым для выполнения первичных исследований, был пептидный пул CMVpp65. Однако, из-за ограниченного числа доноров, которые демонстрировали вторичный ответ на этот антиген, Revaxis и пептидный пул CD8 были антигенами, используемыми для получения большинства данных по эффективности для анти-LAG-3 антител.

Периферическую кровь собирали от здоровых добровольцев в 0 сутки (25 мл) и 5 сутки (75 мл) эксперимента и использовали для получения мононуклеарных клеток с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколл-пака. PBMC, полученные на 0 сутки, метили с использованием набора Cell-Trace™ Violet Cell Proliferation, в соответствии с инструкциями изготовителя, после чего их промывали, помещали в 24-луночные плоскодонные планшеты для культуры тканей с плотностью 2×10^6 /мл в среде и стимулировали антигеном (Revaxis и пептидный пул CD8 использовали в разведении 1 в 1000; пептид CMVpp65 использовали в разведении 1 в 100). PBMC инкубировали в течение 5 суток при 37°C в влажном инкубаторе с 5% CO₂.

Аутологичные NK-клетки донора очищали от PBMC, полученных на 5 сутки эксперимента, посредством негативной селекции с использованием наборов от Invitrogen или Miltenyi Biotec в соответствии с конкретными инструкциями каждого производителя. Очищенные клетки NK подсчитывали и разбавляли средой до плотности $1,3 \times 10^6$ /мл.

Клетки, которые стимулировали антигеном в течение 5 суток, промывали, подсчитывали и разбавляли средой до плотности 2×10^6 /жизнеспособных клеток/мл.

Аутологичные NK-клетки донора (80 мкл) и антиген-активированные клетки (100 мкл) вносили пипеткой в круглодонные 5 мл полистироловые пробирки FACS с исследуемым антителом или средой (20 мкл). Конечная концентрация тестируемых анти LAG-3 антител варьировалась от 1000 до 0,015 нг/мл. Образцы инкубировали в течение 18 ч при 37°C во влажном инкубаторе с 5% CO₂. Через 18 ч образцы для ADCC анализа анализировали на присутствие антигенспецифических LAG-3 положительных T-клеток, используя проточную цитометрию. В кратком изложении, образцы промывали в буфере FACS, блокировали человеческим IgG (3 мкг/пробирка) и инкубировали с флуорохром-конъюгированными антителами мыши против CD4, CD8, CD337, CD25 и LAG-3 человека в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. После дополнительной стадии промывки в PBS клетки инкубировали в присутствии фиксированной зеленой мертвой клетки в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. Наконец образцы промывали PBS, фиксировали и анализировали с помощью проточной цитометрии, используя время захвата 60 с при скорости потока 1 мкл/с.

Все данные по образцам были получены с использованием проточного цитометра BD FACSCanto II с программой FACS Diva версия 6.1.3 (BD BioSciences). Окрашивание при помощи живых/мертвых фиксированных зеленых мертвых клеток использовали в качестве маркера исключения мертвых клеток и подходящие контроли изотипа и FMO-1 (флавино-содержащая монооксигеназа 1) использовали для определения негативных популяций. В кратком изложении, мертвые клетки были исключены из анализа с использованием графика прямого рассеяния (FSC-A) против флуоресценции в FL1 (окрашивание зеленых мертвых клеток). Затем были исключены из анализа дубликаты путем использования графика FSC-W против FSC-H. Живые одиночные лимфоциты затем идентифицировали и выделяли с использованием графика прямого рассеяния (FSC-A) против бокового рассеяния (SSC-A). CD4 антигенспецифические

Т-клетки были идентифицированы из этой выделенной популяции клеток с использованием графиков CD4-флуоресценции против SSC-A и флуоресценции фиолетового красителя против CD4-флуоресценции соответственно. Антигенспецифические CD4 Т-клетки были идентифицированы по снижению флуоресценции фиолетового красителя. Дополнительный график флуоресценции CD25 против флуоресценции LAG-3 был построен для подтверждения состояния активации этой популяции клеток и того, что они экспрессируют LAG-3. Похожие графики были построены для идентификации антиген-специфических CD8 Т-клеток.

Были зарегистрированы процентные содержания антигенспецифических CD4 и CD8 Т-клеток, присутствующих в каждом образце (как процент популяции жизнеспособных лимфоцитов). Были построены нелинейные с варьирующимся углом наклона кривые-интерполяции этих данных и получены значения EC50 путем использования программы GraphPad Prism (v5.03).

Для расчета максимального уровня истощения, наблюдаемого в анализе при самой высокой концентрации тестируемого антитела, использовали следующую формулу:

$$(1-(\% \text{ Антигенспецифических Т-клеток, оставшихся после обработки антителом})/(\% \text{ Антигенспецифических Т-клеток, оставшихся в отсутствие антител})) \times 100.$$

Данные по эффективности истощения популяции LAG3 положительных антиген-специфических CD8 и CD4 Т-клеток с помощью H5L7BW и H5L7 получали, используя систему анализа *in vitro*, подробно описанную выше. H5L7BW-индуцированное истощение популяции LAG3 положительных антиген-специфических CD4 и CD8 Т-клеток посредством ADCC у шести из семи доноров исследовали в отношении исчезновения соответствующих типов клеток. Эффективность H5L7BW в антиген-специфических CD4 Т-клетках, количественно определяемая по значениям EC50, варьировалась от 14 пг/мл до 3,4 нг/мл с максимальными уровнями истощения в диапазоне от 44 до 78%. Эффективность этого антитела в антиген-специфических LAG-3 позитивных CD8 Т-клетках варьировалась от 122 пг/мл до 17,5 нг/мл, с максимальными уровнями истощения в диапазоне от 39 до 87%. H5L7 опосредовал низкие уровни истощения или был неактивным у исследуемых доноров.

Пример 7. Оценка истощающей активности H5L7BW и H5L7 в *in vivo* модели человеческих PBMC/мышинного SCID ксенотрансплантата.

Этот анализ описывает использование модели человеческих PBMC/мышинного SCID ксенотрансплантата для оценки *in vivo* истощающей эффективности моноклонального, полностью гуманизированного, афукозилированного LAG-3 истощающего антитела H5L7BW на активированных человеческих Т-клетках. У здорового добровольца выделяли мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и стимулировали их в течение ночи (анти-CD3, IL-12) для индукции экспрессии LAG-3 перед инъекцией в брюшную полость мышей SCID с ослабленным иммунитетом. LAG-3 истощающие или контрольные антитела либо совместно вводили в брюшную полость, либо инъецировали внутривенно.

Истощение популяции LAG-3 положительных клеток оценивали с помощью проточной цитометрии в образцах перитонеального лаважа через 5 или 24 ч после клеточной инъекции.

Мышам внутрибрюшинно инъецировали активированные huPBMC (4×10^6 - 2×10^7 клеток в 0,4 мл PBS). В зависимости от конкретного способа исследования, LAG-3 антитела или контроля huIgG1 BioWa либо совместно вводили внутрибрюшинно с huPBMC, либо мышей предварительно обрабатывали внутривенно за 18 ч до инъекции huPBMC. Через 5 или 24 ч после клеточной инъекции мышей умерщвляли, проводили перитонеальный лаваж и анализировали клеточное содержание буфера для лаважа посредством проточной цитометрии. В кратком изложении, перитонеальный лаваж включал 3×5 мл промывок интактной брюшной полости с использованием холодного PBS, содержащего 3 mM EDTA.

Все данные по образцам были получены с использованием проточного цитометра BD FACSCanto II с помощью программы FACS Diva версия 6.1.3 (BD BioSciences). На пробирку FACS добавляли приблизительно 1×10^6 клеток (когда это возможно), клеточные суспензии центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин и затем осадок ресуспендировали в 3 мл PBS. Затем супернатанты осторожно декантировали и клеточные осадки ресуспендировали в 100 мкл холодного буфера FACS для промывания. Затем 15 мкл FcR-блокирующего реагента добавляли в пробирку и клетки инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли по 5 мкл каждого окрашивающего антитела (10 мкл 1:100 предварительно разбавленного анти-LAG-3 блокирующего/обнаруживающего антитела 17B4-PE) или контрольного изотипа соответственно и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре, защищая от света. Клетки затем промывали путем добавления 4 мл буфера FACS на пробирку и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин, после чего супернатант осторожно декантировали. Эту стадию промывки повторяли. Наконец, клетки ресуспендировали в 300 мкл буфера FACS и анализировали с помощью проточной цитометрии. В дополнение к определению LAG-3 посредством использования флуоресцентно меченого LAG-3 блокирующего антитела 17B4-PE, использовали следующие Т-клеточные маркеры и маркеры активации для фенотипирования Т-клеток: CD45, CD4, CD8 и CD25. Проценты CD4 и CD8 Т-клеток выражали, как процент от CD45-положительных клеток. LAG-3 положительные Т-клеточные популяции выражали, как процент от их исходных CD4 и CD8 популяций.

Программу FACS Diva версию 6.1.3 использовали для проведения серийных анализов числа от-

дельных клеток/событий и процентов клеточных популяций. Данные анализировали с помощью программы SAS версия 9.2.2 с использованием обобщенной линейной модели для биномиальных данных. Этот анализ непосредственно моделировал число клеток, как долю от исходной популяции. Таким образом, во время анализа размер исходной популяции учитывается. Средние значения, наряду с 95% доверительными интервалами, были рассчитаны для долей целевого клеточного типа для каждой обработки. Они были выражены в процентах.

Запланированные сравнения обработок относительно контроля выполняли, используя отношения шансов. Оно выражает шансы наличия целевого клеточного типа при одной обработке как отношение к шансам наличия целевого клеточного типа при контрольной обработке. Отношение шансов менее 1 означает пониженные шансы наличия данного клеточного типа при интересующей обработке по сравнению с контролем, пониженные шансы наличия данного клеточного типа при интересующей обработке по сравнению с контролем.

Все эксперименты проводили, используя PBMC из крови здоровых отдельных доноров и, из-за больших объемов крови, требующихся для эксперимента, ни одного донора не использовали более одного раза. Уровни экспрессии LAG-3 после стимуляции в течение ночи значительно варьировались между донорами (в диапазон 2-73% экспрессии на клеточной поверхности), но эта разница в уровне экспрессии не влияла на очень значительную истощающую эффективность тестируемых антител.

Модель *in vivo* человеческие PBMC/мышинные SCID успешно использовали, чтобы показать истощение популяции активированных человеческих LAG-3-экспрессирующих Т-клеток в брюшной полости SCID мышей с ослабленным иммунитетом. В зависимости от донора, пути введения и момента времени анализа происходила истощение 84,22-99,71% LAG-3 положительных человеческих CD4 Т-клеток и 84,64-99,62% LAG-3 положительных человеческих CD8 Т-клеток. Как показано на фиг. 2, совместное введение 5 мг/кг H5L7BW к активированным человеческим PBMC в брюшной полости SCID-мышей приводит к существенному истощению популяции LAG-3 положительных CD4- и CD8-положительных Т-клеток через 24 ч после инъекции по сравнению с животными, которым вводили контрольный IgG.

На фиг. 3 представлено сравнение между 5 мг/кг H5L7BW и H5L7 через 5 ч после внутрибрюшинного совместного введения к активированным человеческим PBMC, как описано выше. Оба антитела индуцировали очень значительное истощение LAG-3 положительных CD4 и CD8 Т-клеток (фиг. 3А).

Как показано на фиг. 4, введение 5 мг/кг H5L7BW внутривенным путем привело к статистически очень значимому истощению популяции LAG-3 положительных Т-клеток через 5 ч (фиг. 4А), аналогично наблюдаемому в экспериментах с внутрибрюшинным совместным введением LAG-3 истощающих антител. Сравнение между внутривенно введенными H5L7BW, H5L7 и IMP731 (все в количестве 5 мг/кг) через 5 ч после внутрибрюшинного введения активированных человеческих PBMC выявило очень похожие эффективности истощения 3 молекул по сравнению с животными, обработанными контролем (фиг. 5). Каждый из трех тестируемых LAG-3-истощающих антител вызывал значительное уменьшение числа LAG-3 положительных CD4 и CD8 Т-клеток (фиг. 5А), при этом H5L7BW демонстрировал большую истощающую способность по сравнению с H5L7 или IMP731.

Пример 8. Анализ связывания анти-LAG-3 гуманизированных антител с рекомбинантными растворимыми человеческими Fc-гамма рецепторами с использованием ProteOn™.

Связывание человеческого FcγRIIIa исследовали с целью оценки способности H5L7 и H5L7BW индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). H5L7 и H5L7BW анти-LAG-3 антитела оценивали в отношении связывания с рекомбинантным растворимым человеческим FcγRIIIa в дополнение к рецепторам FcγRI и FcγRII, используя биосенсор ProteOn™ XPR36 (BioRad™), и сравнивали с химерным антителом IMP731.

Антиполигистидин-IgG козы был иммобилизован на чипе биосенсора GLM путем сочетания первичных аминов. Эту поверхность использовали в качестве поверхности захвата для меченых полигистидином человеческих Fc-гамма рецепторов. Тестируемые антитела использовали в качестве анализируемого вещества и пропускали в количестве 2048, 512, 128, 32 и 8 нМ, при этом инъекцию 0 нМ (т.е. одного буфером) использовали для двойной привязки кривых связывания. Поверхность с анти-полигистидин-IgG козы регенерировали, используя 100 мМ фосфорной кислоты между взаимодействиями. Прогон осуществляли на системе изучения взаимодействия белков ProteOn XPR36 Protein Array Interaction System при 25°C и в качестве подвижного буфера использовали HBS-EP. Данные анализировали для каждого рецептора отдельно, устанавливая значение полного R-max и используя равновесную модель в соответствии в программой анализа ProteOn's analysis.

Контрольные молекулы анализировали в начале и конце группы тестируемых образцов, чтобы обеспечить сопоставимость результатов. Сравнивали данные двух экспериментов и гибридных контрольных антител, используемых в качестве контролей между экспериментами.

Результаты показывают, что H5L7BW связывался с обеими полиморфными формами FcγRIIIa (валин V158 и фенилаланин F158) с аффинностью, улучшенной приблизительно в 10 раз по сравнению с H5L7 (см. табл. 6). Фукозилированное антитело H5L7 связывается с FcγRIIIa с аффинностью, аналогичной химерному антителу IMP731.

Никаких существенных изменений не наблюдалось между связыванием гуманизированных фукозилированных и афукозилированных анти-LAG-S антител с рецепторами FcγRI или FcγRIIa.

Таблица 6

Связывание H5L7 и H5L7BW с человеческими
Fc-гамма рецепторами

Антитело	FcγRI (нМ)	FcγRIIa R131 (нМ)	FcγRIIa H131 (нМ)	FcγRIIa V158 (нМ)	FcγRIIa F158 (нМ)
IMP731	39,0	2620,0	1280,0	406,0	1750,0
H5L7	26,3	792,0	638,0	236,0	752,0
H5L7BW	26,4	1490,0	1430,0	21,8	81,1

Последовательности

Таблица 7

Краткий обзор последовательностей

Последовательность	Идентификатор последовательности (SEQ ID NO)	
	Аминокислотная последовательность	Полинуклеотидная последовательность
<u>H5L7, CDRL1 (определен по Kabat)</u>	<u>1</u>	<u>57</u>

<u>H5L7, CDRL2 (определен по Kabat)</u>	<u>2</u>	<u>58</u>
<u>H5L7, CDRL3 (определен по Kabat)</u>	<u>3</u>	<u>59</u>
<u>H5L7, VL</u>	<u>4</u>	<u>60</u>
<u>H5L7, гуманизированная конструкция легкой цепи</u>	<u>5</u>	<u>61</u>
<u>H5L7, CDRH1 (определен по Kabat)</u>	<u>6</u>	<u>62</u>
<u>H5L7, CDRH2 (определен по Kabat)</u>	<u>7</u>	<u>63</u>
<u>H5L7, CDRH3 (определен по Kabat)</u>	<u>8</u>	<u>64</u>
<u>H5L7, VH</u>	<u>9</u>	<u>65</u>
<u>H5L7, гуманизированная конструкция тяжелой цепи</u>	<u>10</u>	<u>66</u>
<u>H1L7, гуманизированная конструкция легкой цепи</u>	<u>11</u>	<u>67</u>
<u>H1L7, гуманизированная конструкция тяжелой цепи</u>	<u>12</u>	<u>68</u>
<u>J7L7, гуманизированная конструкция легкой цепи</u>	<u>13</u>	<u>69</u>
<u>J7L7, гуманизированная конструкция тяжелой цепи</u>	<u>14</u>	<u>70</u>
<u>H4L7, гуманизированная конструкция легкой цепи</u>	<u>15</u>	<u>71</u>
<u>H4L7, гуманизированная конструкция тяжелой цепи</u>	<u>16</u>	<u>72</u>
<u>J11L7, гуманизированная конструкция легкой цепи</u>	<u>17</u>	<u>73</u>
<u>J11L7, гуманизированная конструкция тяжелой цепи</u>	<u>18</u>	<u>74</u>
<u>H2L7, гуманизированная конструкция легкой цепи</u>	<u>19</u>	<u>75</u>

<u>H2L7, гуманизированная</u> <u>конструкция тяжелой цепи</u>	<u>20</u>	<u>76</u>
<u>J13L7, гуманизированная</u> <u>конструкция легкой цепи</u>	<u>21</u>	<u>77</u>
<u>J13L7, гуманизированная</u> <u>конструкция тяжелой цепи</u>	<u>22</u>	<u>78</u>
<u>H7L7, гуманизированная</u> <u>конструкция легкой цепи</u>	<u>23</u>	<u>79</u>
<u>H7L7, гуманизированная</u> <u>конструкция тяжелой цепи</u>	<u>24</u>	<u>80</u>
<u>J0L7, гуманизированная</u> <u>конструкция легкой цепи</u>	<u>25</u>	<u>81</u>
<u>J0L7, гуманизированная</u> <u>конструкция тяжелой цепи</u>	<u>26</u>	<u>82</u>
<u>H0L7, гуманизированная</u> <u>конструкция легкой цепи</u>	<u>27</u>	<u>83</u>
<u>H0L7, гуманизированная</u> <u>конструкция тяжелой цепи</u>	<u>28</u>	<u>84</u>
<u>H1L1, гуманизированная</u> <u>конструкция легкой цепи</u>	<u>29</u>	<u>85</u>
<u>H1L1, гуманизированная</u> <u>конструкция тяжелой цепи</u>	<u>30</u>	<u>86</u>
<u>H5L1, гуманизированная</u> <u>конструкция легкой цепи</u>	<u>31</u>	<u>87</u>
<u>H5L1, гуманизированная</u> <u>конструкция тяжелой цепи</u>	<u>32</u>	<u>88</u>
<u>J7L1, гуманизированная</u> <u>конструкция легкой цепи</u>	<u>33</u>	<u>89</u>
<u>J7L1, гуманизированная</u> <u>конструкция тяжелой цепи</u>	<u>34</u>	<u>90</u>

<u>J11L1, гуманизированная конструкция легкой цепи</u>	<u>35</u>	<u>91</u>
<u>J11L1, гуманизированная конструкция тяжелой цепи</u>	<u>36</u>	<u>92</u>
<u>J13L1, гуманизированная конструкция легкой цепи</u>	<u>37</u>	<u>93</u>
<u>J13L1, гуманизированная конструкция тяжелой цепи</u>	<u>38</u>	<u>94</u>
<u>H7L1, гуманизированная конструкция легкой цепи</u>	<u>39</u>	<u>95</u>
<u>H7L1, гуманизированная конструкция тяжелой цепи</u>	<u>40</u>	<u>96</u>
<u>J0L1, гуманизированная конструкция легкой цепи</u>	<u>41</u>	<u>97</u>
<u>J0L1, гуманизированная конструкция тяжелой цепи</u>	<u>42</u>	<u>98</u>
<u>H0L1, гуманизированная конструкция легкой цепи</u>	<u>43</u>	<u>99</u>
<u>H0L1, гуманизированная конструкция тяжелой цепи</u>	<u>44</u>	<u>100</u>
<u>Константная область каппа-цепи человека</u>	<u>45</u>	<u>101</u>
<u>Константная область человеческого IgG1</u>	<u>46</u>	<u>102</u>
<u>IMP731, VH</u>	<u>47</u>	<u>103</u>
<u>IMP731, VL</u>	<u>48</u>	<u>104</u>
<u>IMP731, последовательность тяжелой цепи</u>	<u>49</u>	<u>105</u>
<u>IMP731, последовательность легкой цепи</u>	<u>50</u>	<u>106</u>

Рекомбинантный LAG-3-ECD-His6 человека	<u>51</u>	<u>107</u>
Рекомбинантный LAG-3 ECD-His6 яванского макака	<u>52</u>	<u>108</u>
Рекомбинантные LAG-3 ECD-His6 павиана	<u>53</u>	<u>109</u>
Лидерная последовательность, используемая для гуманизированного варианта конструкций тяжелой и легкой цепи	<u>54</u>	<u>110</u>
Лидерная последовательность IMP731	<u>55</u>	<u>111</u>
Лидерная последовательность, используемая для растворимых конструкций LAG-3	<u>56</u>	<u>112</u>

SEQ ID NO: 1

KSSQSLNPSNQKNYLA

SEQ ID NO.2

FASTRDS

SEQ ID NO.3

LQHFGTPPT

SEQ ID NO.4

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNPSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLPEDFATYYCLQHFGTPPTFGQGTKLEIKR

SEQ ID NO.5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNPSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLPEDFATYYCLQHFGTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL

NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

SEQ ID NO: 6

AYGVN

SEQ ID NO: 7

MIWDDGSTDYDSALKS

SEQ ID NO: 8

EGDVAFDY

SEQ ID NO: 9

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTAYGVNWIRQPPGKGLEWIGMIWDDGSTDYDSALKSRVTISV
DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 10

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTAYGVNWIRQPPGKGLEWIGMIWDDGSTDYDSALKSRVTISV
DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.11

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNPSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHFPTPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

SEQ ID NO.12

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTAYGVNWIRQPPGKGLEWIGMIWDDGSTDYNSALKSRVTISV
DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK

VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.13

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNPSNQKNYLAWYQQKPKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHFGTPTTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

SEQ ID NO.14

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGFSLTAYGVNWVRQAPGQGLEWMGMWDDGSTDYNALKSRVTITA
DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.15

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNPSNQKNYLAWYQQKPKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHFGTPTTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

SEQ ID NO.16

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTAYGVNWIRQPPGKLEWLGMIWDDGSTDYNALKSRITISK
DNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.17

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLNPSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHFGTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
 SFNRGEC

SEQ ID NO.18

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFSLTAYGVNWVRQAPGQGLEWMGMIWDDGSTDYDSALKSRVTITA
 DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGDVAFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
 VEPKSCDKHTCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.19

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLNPSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHFGTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
 SFNRGEC

SEQ ID NO.20

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTAYGVNWIRQPPGKGLEWIGMIWDDGSTDYNSALKSRVTISK
 DNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAREGDVAFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
 VEPKSCDKHTCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.21

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLNPSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHFGTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
 SFNRGEC

SEQ ID NO.22

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSAYGVNWVRQAPGQGLEWMGMIWDDGSTDYDSALKSRVTITA
 DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.23

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNPSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCLQHFGTPTTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFPYPRFAKQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
 SFNRGEC

SEQ ID NO.24

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISAYGVNWIRQPPGKGLEWIGMIWDDGSTDYDSALKSRVTISV
 DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.25

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNPSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCLQHFGTPTTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFPYPRFAKQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
 SFNRGEC

SEQ ID NO.26

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSAYGVNWVRQAPGQGLEWMGMIWDDGSTDYNSALKSRVTITA
 DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD

ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.27

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNPSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCLQHFGTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

SEQ ID NO.28

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISAYGVNWIRQPPGKGLEWIGMIWDDGSTDYNALKSRVTISV
DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.29

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNGSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCLQHFGTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

SEQ ID NO.30

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTAYGVNWIRQPPGKGLEWIGMIWDDGSTDYNALKSRVTISV
DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.31

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNGSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCLQHFGTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL

NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

SEQ ID NO.32

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTAYGVNWIRQPPGKLEWIGMIWDDGSTDYDSALKSRVTISV
DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.33

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNLSNQNQLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFGSGS
GSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCLQHFQGTPTTFGQGTLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

SEQ ID NO.34

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFSLTAYGVNWVRQAPGQGLEWMGMWDDGSTDYNSALKSRVTITA
DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.35

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNLSNQNQLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFGSGS
GSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCLQHFQGTPTTFGQGTLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

SEQ ID NO.36

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFSLTAYGVNWVRQAPGQGLEWMGMWDDGSTDYDSALKSRVTITA
DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG

CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK
 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.37

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNGSNQKNYLAWYQQKPKGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHFGTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
 SFNRGEC

SEQ ID NO.38

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSAYGVNWVRQAPGGLEWMGMIWDDGSTDYDSALKSRVTITA
 DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK
 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.39

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNGSNQKNYLAWYQQKPKGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHFGTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
 SFNRGEC

SEQ ID NO.40

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISAYGVNWRQPPGKGLEWIGMIWDDGSTDYDSALKSRVTISV
 DTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK
 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.41

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLNGSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHFGTPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
 SFNRGEC

SEQ ID NO.42

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGCTFSAYGVNWVRQAPGQGLEWMGMIWDDGSTDYNALKSRVTITA
 DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.43

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLNGSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLVYFASTRDSGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHFGTPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
 SFNRGEC

SEQ ID NO.44

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISAYGVNWIRQPPGKLEWIGMIWDDGSTDYNALKSRVTISV
 DTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCAREGDVAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.45

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTL
 TLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.46

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVT
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEV
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.47

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTAYGVNWVRQPPGKLEWLGMIWDDGSTDYNSALKSRLSISK
 DNSKSQVFLKMNSLQTD TARYYCAREGDVAFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO.48

DIVMTQSPSSLAVSVGQKVTMSCKSSQSLNLSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRDSGVPDRFIGS
 GSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCLQHFQTPPTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO.49 (Примечание - другая лидерная последовательность, используемая для химерных антител)

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTAYGVNWVRQPPGKLEWLGMIWDDGSTDYNSALKSRLSISK
 DNSKSQVFLKMNSLQTD TARYYCAREGDVAFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV
 MHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.50

DIVMTQSPSSLAVSVGQKVTMSCKSSQSLNLSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRDSGVPDRFIGS
 GSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCLQHFQTPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
 SFNRGEC

SEQ ID NO.51

LQPGAEPVAVVWAEQEGAPQLPCSPPTIPLQDLISLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWG
 PRPRRYTVLSVGPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRL
 RLGGQASMTASPPGSLRASDWILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHLAESFLFLPQVSPMD
 SGPWGICILTYRDFNVSIMYNLTVLGLPEPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLLTAKWTTPGGGPD

LLVTGDNDFTLRLEDVVSQAQAGTYTCHIHLEQQQLNATVTLAIITVTPKSFSGSPGSLGKLLCEVTPVSGQ
ERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPHHHHHH

SEQ ID NO.52

PQPGAIEISVVWAQEGAPALPCSPITPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAPAGHPPAPGHRPAAPYSWG
PRPRRYTVLSVGPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRATVHLRDRALSCRLRL
RVGQASMTASPPGSLRTSDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRSRGQGRVPVQGSPPHHHLAESFLFLPHVGPMD
SGLWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGTQSFLTAKWAPPGGGPD
LLVAGDNGDFTLRLEDVVSQAQAGTYICHIRLQGGQLNATVTLAIITVTPKSFSGSPGSLGKLLCEVTPASGQ
EHFVWSPINTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLHQGERLLGAAVYFTELSSPHHHHHH

SEQ ID NO.53

PQPGAIEISVVWAQEGAPALPCSPITPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAPAGHPPAPGHRPAAPYSWG
PRPRRYTVLSVGPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRATVHLRDRALSCRLRL
RVGQASMTASPPGSLRTSDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRSRGQGVVQESPPHHHLAESFLFLPHVGPMD
SGLWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPTTPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGTQSFLTAKWAPPGGGPD
LLVVGDNNGNFTLRLEDVVSQAQAGTYICHIRLQGGQLNATVTLAIITVTPKSFSGSPGSLGKLLCEVTPASGQ
ERFVWSPINTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLHQGERLLGAAVYFTELSSPHHHHHH

SEQ ID NO.54

MGWSCIILFLVATATGVHS

SEQ ID NO.55

MESQTQVLMFLLLWVSGACA

SEQ ID NO.56

MPLLLLLPLL WAGALA

SEQ ID NO: 57

AAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACCCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCC

SEQ ID NO: 58

TTGCCTCTACCAGGGATTCC

SEQ ID NO: 59

CTGCAGCACTTCGGCACCCCTCCCACT

SEQ ID NO: 60

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACCCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
AGGCCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCCAGCAGGTTAGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGCACTTCGGCACCCCTCCCACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGT

SEQ ID NO: 61

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACCCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
AGGCCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCCAGCAGGTTAGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGCACTTCGGCACCCCTCCCACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCC
CCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTG
AACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 62

GCCTACGGCGTCAAC

SEQ ID NO: 63

ATGATCTGGGACGACGGCAGCACCGACTACGACAGCGCCCTGAAGAGC

SEQ ID NO: 64

GAGGGCGACGTGGCCTTCGATTAC

SEQ ID NO: 65

CAGGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCTAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGT
GAGCGGCTTCTCCCTGACCGCCTACGGCGTCAACTGGATCAGGCAGCCCCCGGCAAGGCCTGGAGTGGA
TTGGGATGATCTGGGACGACGGCAGCACCGACTACGACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCGTG

GACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGAAGTCCCGCCGACACCGCCGTCTATTACTG
CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

SEQ ID NO: 66

CAGGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCTAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGT
GAGCGGCTTCTCCCTGACCGCCTACGGCGTCAACTGGATCAGGCAGCCCCCGGCAAAGGCCTGGAGTGGA
TTGGGATGATCTGGGACGACGGCAGCACCAGTACTAGCAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCGTG
GACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGAAGTCCCGCCGACACCGCCGTCTATTACTG
CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
CCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCGGCACAGCCGCCCTGGGC
TGCTTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAAGCGCGT
GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGTCCAGCA
GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCC
CAGCGTGTTCCTGTTCCTTCCCCCAAGCCTAAGGACACCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGTG
TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC
AATGCCAAGACCAAGCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTCT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCG
AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAATAAGACACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 67

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACCCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
AGGCCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCCAGCAGGTTACGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGCACTTCGGCACCCCTCCCACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCCC
CCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTG
AACAACCTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 68

CAGGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCTAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGT
GAGCGGCTTCTCCCTGACCGCCTACGGCGTCAACTGGATCAGGCAGCCCCCGGCCAAAGGCCTGGAGTGGA
TTGGGATGATCTGGGACGACGGCAGCACCGACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCGTG
GACACCAGCAAGAACCAGTTGAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACTGCCGCCGACACCGCCGTCTATTACTG
CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGCGGCACAGCCGCCCTGGGC
TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGCGT
GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCA
GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCC
CAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTG
TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC
AATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCG
AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
TCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 69

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACCCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
AGGCCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCAGCAGGTTACAGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGCACTTCGGCACCCCTCCCACCTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCC
CCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTG
AACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 70

CAGGTGCAGCTCGTGAGAGCGGGGCCGAAGTCAAGAAAACCCGGCAGCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGC
CAGCGGCTTCTCTCTCACTGCCTACGGCGTGAAGTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGA

TGGGCATGATCTGGGACGACGGCAGCACCAGCTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCACCGCC
 GACAAGAGCACCAGCACCCTTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTATTG
 CGCCAGGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
 CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCGCACAGCCGCCCTGGGC
 TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGT
 GCACACCTTCCCCGCGTGTGTCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCA
 GCAGCCTGGCACCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
 GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCACACCTGCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCC
 CAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTG
 TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC
 AATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGT
 GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCCTGCCCTATCG
 AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
 GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
 TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTG
 ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 71

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
 GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACCCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
 AGGCCCCCAAGCTGTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCCAGCAGGTTACAGGGCAGC
 GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
 GCAGCACTTCGGCAGCCCCCTCCCACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCC
 CCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGTG
 AACAACTTCTACCCCCGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
 GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGG
 CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
 AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 72

CAGGTGCAGCTCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCTAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGT
 GAGCGGCTTCTCCCTGACCGCCTACGGCGTCAACTGGATCAGGCAGCCCCCGGCAAAGGCCTGGAGTGGC
 TGGGGATGATCTGGGACGACGGCAGCACCAGCTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGCTGACCATCAGCAAG
 GACAACAGCAAGAACCAGGTGAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGAAGTGCAGCGGACACCGCGCTATTACTG
 CGCCAGGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
 CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCGCACAGCCGCCCTGGGC

TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCACAGCA
GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACTGAACCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCGAGCTGCTGGGAGGCC
CAGCGTGTTCCTGTTCCTCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGTG
TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC
AATGCCAAGACCAAGCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCCTGCCCTATCG
AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 73

GACATCCAGATGACCAGAGCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACCCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
AGGCCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCAGCAGGTTACGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGCACTTCGGCACCCCTCCCACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAAGCGTACGGTGGCGGCC
CCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTG
AACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 74

CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGGGCCGAAGTCAAGAAACCCGGCAGCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGC
CAGCGGCTTCTCTCTACTGCCTACGGCGTGAAGTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGA
TGGGCATGATCTGGGACGACGGCAGCACCGACTACGACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCACCGCC
GACAAGAGCACCAGCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTATTG
CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGCGGCACAGCCGCCCTGGGC
TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCACAGCA
GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACTGAACCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCGAGCTGCTGGGAGGCC

CAGCGTGTTCTGTTCCTCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGTG
 TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC
 AATGCCAAGACCAAGCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
 GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCG
 AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
 GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
 TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTGAGCTGCTCCGTG
 ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 75

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
 GAGCAGCCAGAGCCTGTGAACCCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
 AGGCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCAGCAGGTTACAGCGGCAGC
 GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
 GCAGCACTTCGGCACCCCTCCCACTTTTGGCCAGGGCACCAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCC
 CCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGTG
 AACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCACTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
 GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGG
 CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
 AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 76

CAGGTGCAGCTCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCTAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGT
 GAGCGGCTTCTCCCTGACCGCCTACGGCGTCAACTGGATCAGGCAGCCCCCGGCAAGGCCTGGAGTGGA
 TTGGGATGATCTGGGACGACGGCAGCACCGACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCAAG
 GACAACAGCAAGAACCAGGTGAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACTGCCGCCGACACCGCCGTCTATTACTG
 CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
 CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGC
 TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGT
 GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCA
 GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
 GTGGAGCCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCC
 CAGCGTGTTCTGTTCCTCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGTG
 TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC
 AATGCCAAGACCAAGCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
 GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCG

AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAGAACAATAACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTACGCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGGCCCTGCACAATCACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 77

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACCCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
AGGCCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCAGCAGGTTACAGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGCACTTCGGCACCCTCCCACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCC
CCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTG
AACAACCTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 78

CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGGGCCGAAGTCAAGAAACCCGGCAGCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGC
CAGCGGCGGCACCTTCAGCGCCTACGGCGTGAAGTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGA
TGGGCATGATCTGGGACGACGGCAGCACCGACTACGACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCACCGCC
GACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTATTG
CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCGCACAGCCGCCCTGGGC
TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCA
GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACTGAACACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCC
CAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTG
TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC
AATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCG
AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAGAACAATAACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT

TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 79

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCCTTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACCCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
AGGCCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCCAGCAGGTTAGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGCACTTCGGCACCCTCCCACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGTTGCCCGCCC
CCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTG
AACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 80

CAGGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCTAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGT
GAGCGGGCGCTCCATCAGCGCCTACGGCGTCAACTGGATCAGGCAGCCCCCGGCAAGGCCTGGAGTGGA
TTGGGATGATCTGGGACGACGGCAGCACCGACTACGACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCGTG
GACACCAGCAAGAACCAGTTGAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACTGCCGCCGACACCGCCGTCTATTACTG
CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACAAGTGAAGCCTGTCCAGCGCCAGCA
CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCGCACAGCCGCCCTGGGC
TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCACAGCA
GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAGCCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCC
CAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTG
TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCAC
AATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCG
AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 81

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACCCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
AGGCCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCCAGCAGGTTACGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGACTTCGGCACCCCTCCCACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCC
CCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTCTGTCTGCTG
AACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 82

CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGGGCCGAAGTCAAGAAACCCGGCAGCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGC
CAGCGGCGGCACCTTCAGCGCCTACGGCGTGAAGTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGA
TGGGCATGATCTGGGACGACGCGCAGCACCGACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCACCGCC
GACAAGAGCACAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTATTG
CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGC
TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGCGCT
GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCA
GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACTGAACCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCGAGCTGCTGGGAGGCC
CAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCTAAGGACACCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTG
TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC
AATGCCAAGACCAAGCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCG
AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCTAGCAGAGAT
GAGGTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 83

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACCCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA

AGGCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCCAGCAGGTTACGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGCACTTCGGCACCCCTCCCACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCC
CCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTG
AACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 84

CAGGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGCCCGGCCTGGTGAAGCCTAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGT
GAGCGCGCGCTCCATCAGCGCCTACGGCGTCAACTGGATCAGGCAGCCCCCGGCAAGGCCTGGAGTGGA
TTGGGATGATCTGGGACGACGCGAGCACCAGCTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCGTG
GACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACTGCCGCCGACACCGCCGTCTATTACTG
CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGCGGCACAGCCGCCCTGGGC
TGCTGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGCGCT
GCACACCTTCCCCGCCGTGTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCA
GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCC
CAGCGTGTTCTGTTCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTG
TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC
AATGCCAAGACCAAGCCCAGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCG
AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGTGCTCCGTG
ATGCACGAGGGCCTGCACAATCACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 85

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACGGCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
AGGCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCCAGCAGGTTACGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGCACTTCGGCACCCCTCCCACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCC
CCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTG

AACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 86

CAGGTGCAGTCCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCTAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGT
GAGCGGCTTCTCCCTGACCGCTACGGCGTCAACTGGATCAGGCAGCCCCCGGCAAAGGCCTGGAGTGGA
TTGGGATGATCTGGGACGACGGCAGCACCGACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCGTG
GACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACTGCCCGCGACACCGCCGTCTATTACTG
CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCGGCACAGCGGCCCTGGGC
TGCCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGCGT
GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCA
GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCC
CAGCGTGTTCTGTGTCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTG
TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC
AATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCG
AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
TCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 87

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACGGCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
AGGCCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCCAGCAGGTTTCAGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGCACTTCGGCACCCCTCCCACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCCC
CCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTG
AACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 88

CAGGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCTAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGT
GAGCGGCTTCTCCCTGACCGCTACGGCGTCAACTGGATCAGGCAGCCCCCGGCAAGGCCTGGAGTGGA
TTGGGATGATCTGGGACGACGGCAGCACCAGTACGACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCGTG
GACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACTGCCGCCGACACCGCCGTCTATTACTG
CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCGGCACAGCGCCCTGGGC
TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGCGT
GCACACCTTCCCCCGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCA
GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCC
CAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCTAAGCCTAAGGACACCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTG
TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC
AATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCG
AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTGAGTGTCTCCGTG
ATGCACGAGGGCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 89

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACGGCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
AGGCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCAGCAGGTTGAGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGCACTTCGGCACCCCTCCCCTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCCC
CCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTCTGCTG
AACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGGCAACAGCCA
GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 90

CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGGGCCGAAGTCAAGAAACCCGGCAGCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGC
 CAGCGGCTTCTCTCTCACTGCCTACGGCGTGAAGTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGCCAGGGCTGGAGTGGA
 TGGGCATGATCTGGGACGACGGCAGCACCAGTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCACCGCC
 GACAAGAGCACCAGCACCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTATTG
 CGCCAGGGAGGGCGAGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
 CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGCGGCACAGCCGCCCTGGGC
 TGCTTGGTGAAGACTACTTCCCGAACCAGTGAACCGTGTCTGGAACAGCGAGCCCTGACCAGCGGCCT
 GCACACCTTCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGCCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCA
 GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACTGAACCAAGCCAGCAACACCAAGTGAGCAAGAAG
 GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCC
 CAGCGTGTCTCTTCCCCCAGCCTAAGGACACCTGATGATCAGCAGAACCCCCAGGTGACCTGTG
 TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGAGTGAC
 AATGCCAAGACCAAGCCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGT
 GCACAGGATTGGGTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCG
 AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCCGAGGTGTACACCTGCCCCCTAGCAGAGAT
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
 GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
 TCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCTCCGTG
 ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 91

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
 GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACGGCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
 AGGCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCCAGCAGGTTACGCGGCAGC
 GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
 GCAGCACTTCGGCACCCCTCCCACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCC
 CCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTG
 AACAACTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
 GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCTGAGCAAGG
 CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
 AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 92

CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGGGCCGAAGTCAAGAAACCCGGCAGCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGC
 CAGCGGCTTCTCTCTCACTGCCTACGGCGTGAAGTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGCCAGGGCTGGAGTGGA
 TGGGCATGATCTGGGACGACGGCAGCACCAGTACGACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCACCGCC
 GACAAGAGCACCAGCACCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTATTG

CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCGGCACAGCCGCCCTGGGC
TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCA
GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCC
CAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCGTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGTG
TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCGTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC
AATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCG
AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCTGCCCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
TCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGTGTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 93

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
CAGCACCCACACCTCCTCAACCCACCAACCACAAGAACTACCTGCCCTCCTACCAGCAGAAACCCGCCA
AGGCCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGATTCCGGCGTCCCCAGCAGGTTACGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGCACTTCGGCACCCCTCCCACTTTTGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCC
CCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTG
AACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 94

CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGGGCCGAAGTCAAGAAACCCGGCAGCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGC
CAGCGGCGGCACCTTCAGCGCCTACGGCGTGAAGTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGA
TGGGCATGATCTGGGACGACGGCAGCACCGACTACGACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCACCGCC
GACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTATTG
CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCGGCACAGCCGCCCTGGGC
TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCA

GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCC
CAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTG
TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC
AATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCG
AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAGAACAATAACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGGCCTGACAATCACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 95

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
GAGCAGCCAGACCTGCTGAACGGCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
AGGCCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCAGCAGGTTACAGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGCACTTCGGCACCCTCCCACTTTTGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCC
CCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTG
AACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
GGAGAGCTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCTTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 96

CAGGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCTAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGT
GAGCGGCGGCTCCATCAGCGCCTACGGCGTCAACTGGATCAGGCAGCCCCCGGCAAGGCCTGGAGTGGA
TTGGGATGATCTGGGACGACGGCAGCACCAGCTACGACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCGTG
GACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACTGCCGCGACACCGCGTCTATTACTG
CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGC
TGCTTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCA
GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCC
CAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTG
TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC

AATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
 GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCG
 AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCTGCCCCCTAGCAGAGAT
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
 GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAATAACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
 TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTACGTGTCCGTG
 ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 97

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
 GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACGGCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
 AGGCCCCCAAGCTGTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCAGCAGGTTACGCGGCAGC
 GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
 GCAGCACTTCGGCACCCCTCCCACTTTTGGCCAGGGCACCAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCC
 CCAGCGGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTG
 AACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
 GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCTGAGCAAGG
 CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
 AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 98

CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGGGCCGAAGTCAAGAAACCCGGCAGCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGC
 CAGCGGCGGCACCTTCAGCGCCTACGGCGTGAAGTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGA
 TGGGCATGATCTGGGACGACGGCAGCACCAGTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCACCGCC
 GACAAGAGCACCAGCACCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTATTG
 CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
 CCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGC
 TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGT
 GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGGCCAGCA
 GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
 GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCC
 CAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAGCCTAAGGACACCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGTG
 TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC
 AATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
 GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCG
 AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCTGCCCCCTAGCAGAGAT
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA

GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAGCAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 99

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCCTCTAGCCTCAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA
GAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACGGCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCA
AGGCCCCCAAGCTGCTGGTCTACTTCGCCTCTACCAGGGATTCCGGCGTCCCCAGCAGGTTACAGCGGCAGC
GGCAGCGGCACCGACTTCACACTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCT
GCAGCACTTCGGCACCCCTCCACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCC
CCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTG
AACAACTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 100

CAGGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCTAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGT
GAGCGGGCGCTCCATCAGCGCCTACGGCGTCAACTGGATCAGGCAGCCCCCGGCAAGGCCTGGAGTGGA
TTGGGATGATCTGGGACGACGGCAGCACCGACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCGTG
GACACCAGCAAGAACCAGTTGAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACTGCCGCCGACACCGCCGTCTATTACTG
CGCCAGGGAGGGCGACGTGGCCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCA
CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCGCCCTGGGC
TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGCGCT
GCACACCTTCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCA
GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCGGAGCTGCTGGGAGGCC
CAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCAGGTTGACCTGTG
TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCAC
AATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCG
AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCT
TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 101

ACGGTGGCCGCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGT
GGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGA
GCGGCAACAGCCAGGAGAGCGGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTG
ACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG
CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 102

GCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGCGGGCACAGCCGC
CCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCA
GCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGAAGGTGGAGCCCAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGG
GAGGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCTTCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTG
ACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGA
CCGTGCTGCACAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCC
CCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAG
CAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGAT
GGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTG
CTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 103

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGTCCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACCGT
CTCAGGGTTCTCATTAACCGCCTATGGTGTAACCTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGC
TGGGAATGATATGGGATGATGGAAGCACAGACTATAATTTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGTAAG
GACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCAGGTACTACTG
TGCCAGAGAAGGGGACGTAGCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 104

GACATTGTGATGACACAGTCTCCCTCCTCCCTGGCTGTGTCTAGTAGGACAGAAGGTCACTATGAGCTGCAA
GTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATGGTAGCAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGAC
AGTCTCCTAAACTTCTGGTATACTTTGCATCCACTAGGGATTCTGGGGTCCCTGATCGCTTCATAGGCAGT

GGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTTCTGTCT
GCAACATTTTGGCACTCCTCCGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAACTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO: 105

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGTCCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACCGT
CTCAGGGTTCTCATTAACCGCTATGGTGTAACCTGGGTTCCGCCAGCCTCCAGGAAAAGGGTCTGGAGTGGC
TGGGAATGATATGGGATGATGGAAGCACAGACTATAATTCACTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGTAAG
GACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCAGGTACTACTG
TGCCAGAGAAGGGGACGTAGCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCTAGCA
CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC
TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGCGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA
GTTGAGCCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC
GTCAGTCTTCTCTTCCCCCAGAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG
TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGA
GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG
ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 106

GACATTGTGATGACACAGTCTCCCTCCTCCCTGGCTGTGTCACTAGGACAGAAGGTCACTATGAGCTGCAA
GTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATGGTAGCAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGAC
AGTCTCCTAAACTTCTGGTATACTTTGCATCCACTAGGGATTCTGGGGTCCCTGATCGCTTCATAGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTTCTGTCT
GCAACATTTTGGCACTCCTCCGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAACTGGAAATCAAACGGACCGTGGCTGCAC
CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCA
GGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAG
CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCCTCACAAAG
AGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 107

CTCCAGCCAGGGGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGGGCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCC
 CACAATCCCCCTCCAGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATCAGCCAGACAGTG
 GCGCGCCCGCTGCCGCCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTACCCGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGG
 CCCAGGCCCCGCGCTACACGGTGCTGAGCGTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCA
 GCCCCGCTCCAGCTGGATGAGCGCGGCCGGCAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGCCCAGCCCGC
 GCGCGGACGCCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGGGACCGCGCCCTCTCCTGCCGCTCCGTCTG
 CGCCTGGGCCAGGCCTCGATGACTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCAATTTTGAA
 CTGCTCCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTCCGGAACCGGGGCCAGGGCCGAGTCC
 CTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCCTTAGCGGAAAGCTTCCTCTTCTGCCCAAGTCAGCCCCATGGAC
 TCTGGGCCCTGGGGTGCATCCTCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGT
 TCTGGGTCTGGAGCCCCAACTCCCTTGACAGTGTACGCTGGAGCAGGTTCCAGGGTGGGGTGCCTGCC
 GCCTGCCTGCTGGTGTGGGGACCGGTCTTTCCTCACTGCCAAGTGGACTCCTCCTGGGGGAGGCCCTGAC
 CTCCTGGTGACTGGAGACAATGGCGACTTTACCCTTCGACTAGAGGATGTGAGCCAGGCCAGGCTGGGAC
 CTACACCTGCCATATCCATCTGCAGGAACAGCAGCTCAATGCCACTGTCACATTGGCAATCATCACAGTGA
 CTCCCAAATCCTTTGGGTACCTGGATCCCTGGGGAAGCTGCTTTGTGAGGTGACTCCAGTATCTGGACAA
 GAACGCTTTGTGTGGAGCTCTCTGGACACCCATCCCAGAGGAGTTTCTCAGGACCTTGGCTGGAGGCACA
 GGAGGCCCAGCTCCTTTCCAGCCTTGGCAATGCCAGCTGTACCAGGGGAGAGGCTTCTTGGAGCAGCAG
 GTACTTTCACAGAGCTGTCTAGCCCCACACCACCATCATCACCAT

SEQ ID NO: 108

CCCCAGCCAGGGGCTGAGATCTCGGTGGTGTGGGCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCC
 CACAATCCCCCTCCAGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATCAACCAGACAGTG
 GCGCGCCCGCTCCCGCCCCGGCCACCCCCGGCCCCGGCCATCGCCGGCGGCGCCCTACTCTTGGGGG
 CCCAGGCCCCGCGCTACACAGTGCTGAGCGTGGGTCTTGAGGCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCA
 GCCCCGCTCCAGCTGGATGAGCGCGGCCGGCAGCGCGGGGACTTCTCGCTGTGGCTGCGCCAGCCCGGC
 GCGCGGACGCCGGCGAGTACCGCGCCACGGTGCACCTCAGGGACCGCGCCCTCTCCTGCCGCTTCGTCTG
 CGCGTGGGCCAGGCCTCGATGACTGCCAGCCCCCAGGGTCTCTCAGGACCTCTGACTGGGTCAATTTTGAA
 CTGCTCCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTCCGAGCCGTGGCCAGGGCCGAGTCC
 CTGTCCAGGGGTCCCCCATCACCCTTAGCGGAAAGCTTCCTCTTCTGCCCATGTGGCCCCATGGAC
 TCTGGGCTCTGGGGTGCATCCTCACCTACAGAGATGGCTTCAATGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGT
 TCTGGGTCTGGAGCCCGCAACTCCCTTGACAGTGTACGCTGGAGCAGGTTCCAGGGTGGAGTGCCTGCC
 GCCTGCCTCCTGCTGTGGGGACCCAGTCTTTCCTTACTGCCAAGTGGGCTCCTCCTGGGGGAGGCCCTGAC
 CTCCTGGTGGCTGGAGACAATGGCGACTTTACCCTTCGACTAGAGGATGTAAGCCAGGCCCAGGCTGGGAC
 CTACATCTGCCATATCCGTCTACAGGGACAGCAGCTCAATGCCACTGTCACATTGGCAATCATCACAGTGA
 CTCCCAAATCCTTTGGGTACCTGGTCCCTGGGGAAGCTGCTTTGTGAGGTGACTCCAGCATCTGGACAA
 GAACACTTTGTGTGGAGCCCCCTGAACACCCCATCCCAGAGGAGTTTCTCAGGACCATGGCTGGAGGCCA

GGAAGCCCAGCTCCTTTCCAGCCTTGGCAATGCCAGCTGCACCAGGGGAGAGGCTTCTTGGAGCAGCAG
TATACTTCACAGAACTGTCTAGCCACACCACCATCATCACCAT

SEQ ID NO: 109

CCCCAGCCAGGGGCTGAGATCTCGGTGGTGTGGGCCAGGAGGGGGCTCCTGCCCAGCTCCCCTGCAGCCC
CACAATCCCCCTCCAGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACCTGGCAGCATCAACCAGACAGTG
GCCCCGCCGCTCCCGCCCCCGCCACCCCCCGGCCATCGCCCGCGCGCCCTACTCTTGGGGG
CCCAGGCCCCCGCTACACAGTGCTGAGCGTGGGTCTTGGAGGCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCA
GCCCCGCGTCCAGCTGGATGAGCGCGGCCGCGCAGCGGGGACTTCTCGCTGTGGCTGCGCCAGCCCGG
GCGCGGAGCGCCGCGAGTACCGCGCCACGGTGACCTCAGGGACCGCGCCCTCTCCTGCCGCTTCTGCTG
CGCGTGGGCCAGGCTCGATGACTGCCAGCCCCAGGGTCTCTCAGGACCTGACTGGGTCAATTTGAA
CTGCTCCTTCAGCCGCCCTGACCGCCAGCCTCTGTGCATTGGTTCCGGAGCCGTGGCCAGGGCCAAGTCC
CTGTCCAGGAGTCCCCCATCACCCTTAGCGGAAAGCTTCTCTTCTGCCCCATGTGGCCCCATGGAC
TCTGGGCTCTGGGCTGCATCCTCACCTACAGAGATGGGTTCAATGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGT
TCTGGGTCTGGAGCCCAACTCCCTTGACAGTGTACGCTGGAGCAGGTTCCAGGTTGGAGTGCCTGCC
GCCTGCCTCCTGCTGTGGGACCCAGTCTTCTTACTGCCAAGTGGGCTCCTCCTGGGGAGGCCCTGAC
CTCCTGGTGGTTGGAGACAATGGCACTTTACCTTCGACTAGAGGATGTAAGCCAGGCCAGGCTGGGAC
CTACATCTGCCATATCCGCTCTACAGGACAGCAGCTCAATGCCACTGTCACATTGGCAATCATCACAGTGA
CTCCCAAATCCTTTGGGTACCTGGCTCCCTGGGGAAGCTGCTTGTGAGGTGACTCCAGCATCTGGACAA
GAACGCTTTGTGTGGAGCCCCCTGAACACCCCATCCAGAGGAGTTTCTCAGGACCGTGGCTGGAGGCCA
GGAAGCCCAGCTCCTTTCCAGCCTTGGCAATGCCAGCTGCACCAGGGGAGAGGCTTCTTGGAGCAGCAG
TATACTTCACAGAACTGTCTAGCCACACCACCATCATCACCAT

SEQ ID NO: 110

ATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCTTGGTGGCCACCGCTACCGGAGTGCACAGC

SEQ ID NO: 111

ATGGAATCACAGACCCAGGTCTCATGTTTCTTCTGCTCTGGGTATCTGGTGCCTGTGCA

SEQ ID NO: 112

ATGCCGCTGC TGCTACTGCT GCCCTGCTG TGGCAGGGG CGCTAGCT

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое способно связываться с геном активации лимфоцитов 3 (LAG-3) и которое содержит CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из SEQ ID NO: 5 и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из SEQ ID NO: 10, как они определены в табл. 1.

2. Антитело по п.1, которое содержит следующие CDR:

CDRL1: SEQ ID NO: 1,

CDRL2: SEQ ID NO: 2,

CDRL3: SEQ ID NO: 3;

CDRH1: SEQ ID NO: 6,

CDRH2: SEQ ID NO: 7,

CDRH3: SEQ ID NO: 8.

3. Антитело по п.1 или 2, которое содержит а) переменный участок легкой цепи (VL) согласно SEQ ID NO: 4 и б) переменный участок тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 9.

4. Антитело по любому из пп.1-3, которое способно связываться с LAG-3, экспрессируемым на активированных Т-клетках.

5. Антитело по любому из пп.1-4, которое способно истощать популяцию LAG-3⁺ активированных человеческих Т-клеток.

6. Антитело по любому из пп.1-5, которое представляет собой гуманизированное антитело.

7. Гуманизированное антитело по п.6, содержащее константную область IgG1 человека.

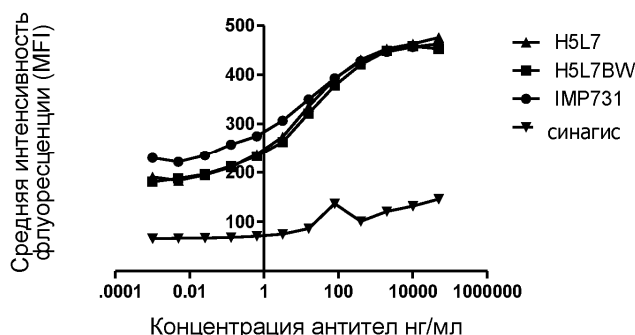
8. Гуманизированное антитело по п.7, которое содержит а) последовательность легкой цепи по меньшей мере с 97%-ной идентичностью SEQ ID NO: 5 и б) последовательность тяжелой цепи по меньшей мере с 97%-ной идентичностью SEQ ID NO: 10.

9. Гуманизированное антитело по п.8, которое содержит а) последовательность легкой цепи согласно SEQ ID NO: 5 и б) последовательность тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 10.

10. Гуманизированное антитело по любому из пп.7-9, которое не фукозилировано.
11. Гуманизированное антитело, содержащее вариабельный участок легкой цепи (VL) согласно SEQ ID NO: 4 и вариабельный участок тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 9, где антитело не содержит фукозу на коровой углеводной структуре, присоединенной к Asn297.
12. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело по любому из пп.1-11.
13. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.12.
14. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по п.13.
15. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по п.13, где в указанной клетке-хозяине ген FUT8, кодирующий альфа-1,6-фукозилтрансферазу, инактивирован.
16. Антитело, продуцируемое клеткой-хозяином по п.14 или 15.
17. Способ получения антитела по любому из пп.1-11, включающий а) культивирование клетки-хозяина по п.14 в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и б) выделение антитела.
18. Способ получения гуманизированного антитела по п.10 или 11, включающий а) культивирование клетки-хозяина по п.15 в условиях, подходящих для экспрессии гуманизированного антитела, где в рекомбинантной клетке-хозяине ген FUT8, кодирующий альфа-1,6-фукозилтрансферазу, инактивирован, и б) выделение гуманизированного антитела.
19. Фармацевтическая композиция, способная истощать популяцию LAG-3⁺ активированных Т-клеток, содержащая а) антитело по любому из пп.1-11 и б) фармацевтически приемлемый носитель.
20. Применение антитела по любому из пп.1-11 для лечения заболеваний, связанных с вовлечением патогенных Т-клеток.
21. Применение антитела по любому из пп.1-11 для лечения аутоиммунного заболевания, представляющего собой псориаз.

A

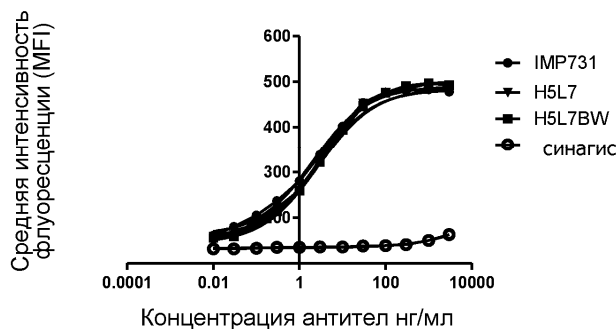
Связывание анти-LAG-3 антител с клетками EL4, экспрессирующими LAG-3



	IMP731	H5L7BW	H5L7
IC50	13.04	16.88	14.22

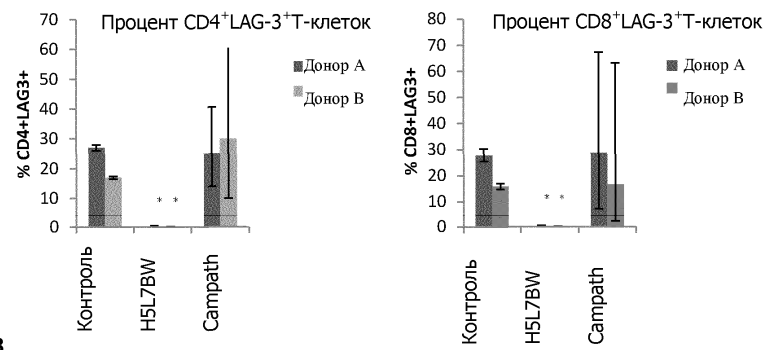
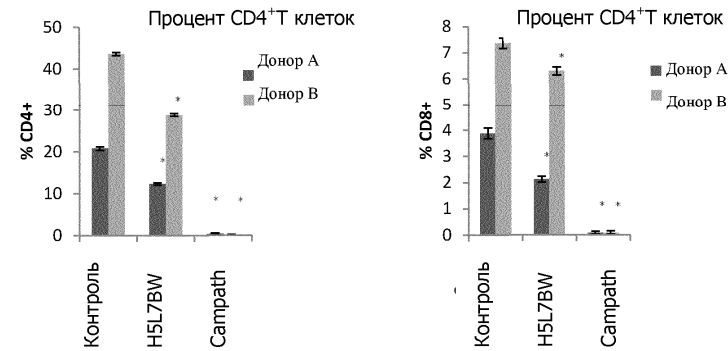
B

Связывание анти-LAG-3 антител с активированными человеческими CD3 T-клетками

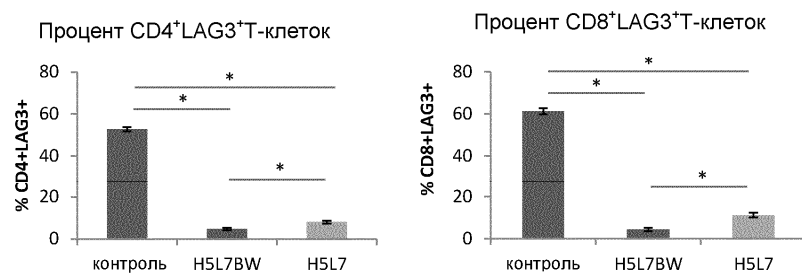
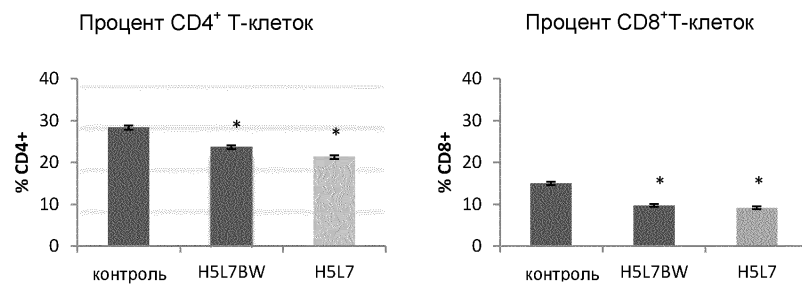


	IMP731	H5L7	H5L7BW	Synagis
IC50	2.141	3.061	3.073	~ 3.597e+010

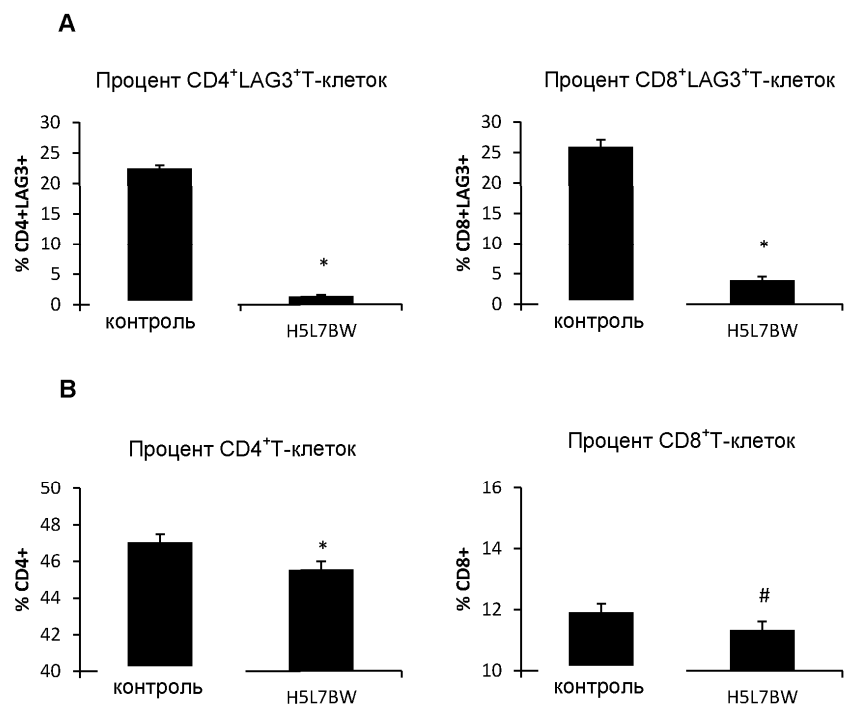
Фиг. 1

A**B**

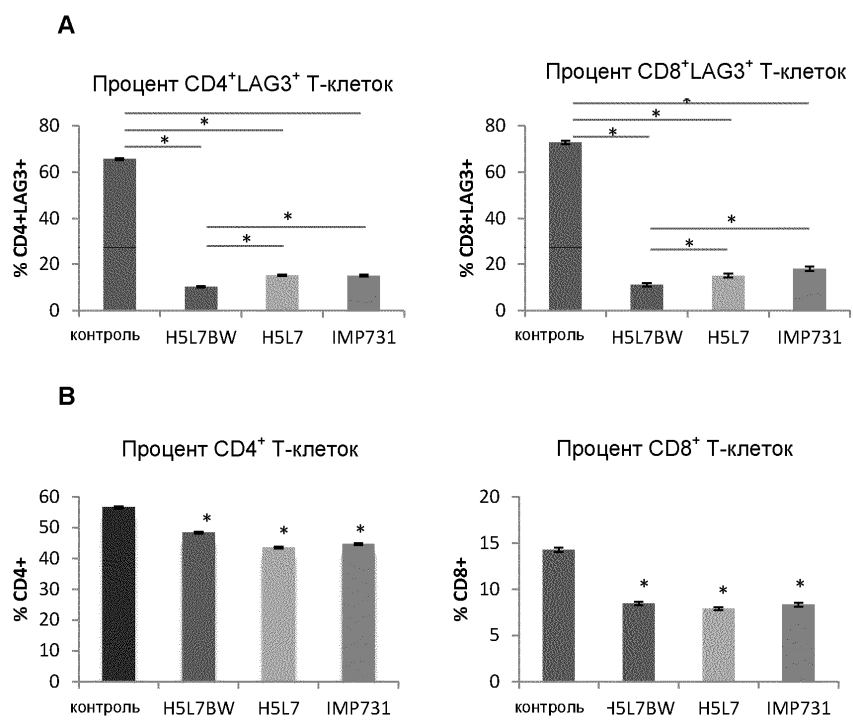
Фиг. 2

A**B**

Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2