

Область, до якої відноситься винахід

Даний винахід стосується антитіл, які зв'язують та поглинають KLK5, а також способів їх використання для лікування захворювань, спричинених порушенням регуляції KLK5. Зокрема, даний винахід стосується антитіл до KLK5 та їх використання для лікування хвороби Нетертона, іхтіозів, таких як вроджений іхтіоз, atopічний дерматит та рак.

Передумови для винаходу

Калікреїн-пов'язані пептидази (відомі як KLK), складають єдине сімейство з 15 висококонсервативних трипсин або хімотрипсин-подібних серинових протеаз, кодованих найбільшим безперервним кластером генів, що кодують протеазу (хромосома 19q13.4) в геномі людини (Сотіропулу Г. та ін., 2009; JBC 284:48, 32989-94).

KLK синтезуються у вигляді неактивних пре-проформ, які протеолітично обробляються для виділення неактивних про-форм. Такі проформи згодом активуються до зрілих пептидаз шляхом специфічного протеолітичного видалення їх N-кінцевого пропептиду або шляхом використання іншої KLK чи ендопептидази, або методом автокаталітичного розщеплення, який використовується для калікреїну-5 (KLK5).

KLK5 зустрічається в кількох тканинах, але найбільша його кількість спостерігається у шкірі. Поряд з KLK7, KLK5 спостерігається у верхніх остистих і зернистих шарах шкіри разом з KLK7, де кератиноцити піддаються кінцевій диференціації та трансформуються в корнеоцити, які складають роговий шар епідермісу. Роговий шар виконує функцію бар'єра, що забезпечує захист від впливу зовнішнього середовища та підтримується завдяки постійному заміщенню корнеоцитів, що злищуються в процесі десквамації. Оскільки KLK5 здатна активувати про-KLK7 та інші калікреїни, вона відіграє важливу роль у десквамації.

Після активації зрілий KLK5 інактивується ендегенним інгібітором, тобто лімфоепітеліальним інгібітором типу Kazal (LEKTI), який кодується геном SPINK5 (Чаванс П. та ін.; Nature Genetics 37, 56-65). LEKTI містить домени 15ти доменного інгібітору серинової протеази, які утворюють щільний комплекс з KLK5. Зміна рівня pH регулює цю тісну взаємодію з кислотним pH, вивільняючи активний KLK5 з комплексу (Дерайзон та ін. 2007; Mol Biol Cell 18 3607-19).

Мутації з втратою функції в гені SPINK5 спричиняють синдром Нетертона, рідкісне аутосомно-рецесивне захворювання шкіри, яке характеризується ознаками іхтіозу з сильним запаленням, лущенням шкіри, підвищеним рівнем імуноглобуліну E та постійними алергічними проявами (Ховнаніан А, 2013; Cell Tissue Res 289:353-10). На фоні гіперактивності епідермальної протеази відсутність LEKTI призводить до відшарування рогового шару, обумовленого активністю KLK5 у десмоглеїні та десмосомах, що, у свою чергу, сприяє високій проникності різних алергенів, які викликають ураження, подібні до atopічного дерматиту. Активність KLK5 на KLK7 також сприяє утворенню дефектного шкірного бар'єру, що призводить до проникнення алергенів та мікробів і вироблення інтерлейкіну 1, бета.

Інгібітори серинової протеази Kazal типу 5 у шкірі мишей (SPINK5) повторюють фенотип, що сильно нагадує синдром Нетертона та має усі запальні ознаки захворювання шкіри (Янт Т. та ін.; 2004, Genes Dev 18 2354-58). Інгібітори серинової протеази типу Kaza (SPINK5) в епідермісі пацієнтів із синдромом Нетертона демонструють активність протеаз KLK5 та KLK7, яка забезпечує активацію прозапальних та просигнальних шляхів, включаючи вісь KLK5-PAR2-TSLP (стромальний лімфопоетин тимуса).

Як у випадку з геном SPINK5 та KLK5 у шкірі мишей, нокаут гену KLK5 був достатнім для виправлення такого шкірного прояву у результаті нокауту гену LEKTI (лімфоепітеліальний інгібітор типу Kazal), що демонструє вирішальну роль KLK5 в гомеостазі шкіри.

Останніми роками результати кількох досліджень визначають генетичний зв'язок між atopічним дерматитом (AD) і поліморфізмом LEKTI з виникненням аномальних варіантів LEKTI (Ховнаніан А. 2013; Cell and Tissue Research 351 289-300).

На сьогоднішній день застосовувалися лише методи лікування, спрямовані на заміну LEKTI, включаючи додавання генів за допомогою лентивірусного або аденовірусного вектору SPINK5 та аутологічних трансплантатів генетично виправлених кератиноцитів пацієнтів (Ді ВЛ та ін.; 2011, Molecular Therapy 19 408-16).

Таким чином, залишається потреба в терапії поглинання KLK5, наприклад, пасивно-імунній терапії, що спрямована на інгібування KLK5, яка може забезпечувати терапевтичний ефект при захворюваннях, пов'язаних з порушенням регуляції KLK5 або викликаних таким порушенням.

Стислий опис винаходу

Даний винахід вирішує вищезгадану проблему шляхом створення інгібіторних антитіл до KLK5 відповідно до наступних варіантів.

Варіант 1: антитіло, яке зв'язується з калікреїном 5 (KLK5), де антитіло містить варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг:

а. змінний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 62 або SEQ ID NO: 63, та ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2, а також визначаючу комплементарність ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3; та

б. варіабельний важкий ланцюг містить CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6.

Варіант 2: Антитіло відповідно до варіанту 1, де:

а. варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3; та

б. варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6.

Варіант 3: антитіло, яке зв'язується з калікреїном 5 (KLK5). При цьому антитіло зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Ser147, Lys14, Lys10, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51.

Варіант 4: Антитіло згідно з варіантом 3, де епітоп характеризують за допомогою рентгенівської кристаліграфії.

Варіант 5: Антитіло згідно з будь-яким з варіантів 1-4, де антитіло інгібує або знижує активність протеази KLK5.

Варіант 6: Антитіло відповідно до варіантів 1-5, де антитіло зв'язується з KLK5, коли KLK5 зв'язується з лімфоепітеліальним інгібітором типу Kazal (LEKTI), або фрагментом LEKTI.

Варіант 7: Антитіло відповідно до варіантів 1-6, де антитіло не конкурує з LEKTI або фрагментом LEKTI за зв'язок з KLK5.

Варіант 8: Антитіло відповідно до варіантів 1-7, де антитіло утворює комплекс із KLK5, зв'язаним з LEKTI, або фрагментом LEKTI.

Варіант 9: Антитіло відповідно до варіантів 6-8, де фрагмент LEKTI представлений людським доменом LEKTI 5, що містить амінокислоти 1-64 з послідовністю SEQ ID NO: 54 або доменом LEKTI 8, що містить амінокислоти 1-71 з послідовністю SEQ ID NO: 61.

Варіант 10: Антитіло відповідно до будь-якого з попередніх варіантів, де антитіло зв'язується з людським KLK5, переважно людським KLK5, що містить послідовність SEQ ID NO: 53, та KLK5 яванської макаки, переважно KLK5 яванської макаки, що містить послідовність SEQ ID NO: 60.

Варіант 11: Антитіло згідно з будь-яким із попередніх варіантів, де антитіло не зв'язується з цинокалікρείном 2 (KLK2), цинокалікρείном 4 (KLK4) або цинокалікρείном 7 (KLK7) людини чи яванської макаки.

Варіант 12: Антитіло відповідно до будь-якого з варіантів 3-11, де антитіло містить варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг:

а. варіабельний легкий ланцюг містить ділянки CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 62 або SEQ ID NO: 63, переважно ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3; та

б. варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6.

Варіант 13: Антитіло відповідно до будь-яких попередніх варіантів, де антитіло є химерним або гуманізованим антитілом.

Варіант 14: Антитіло згідно з будь-яким із попередніх варіантів, де антитіло є повнорозмірним антитілом.

Варіант 15: Антитіло згідно з варіантом 13, де повнорозмірне антитіло взяте з інтерлейкіну plgG1, IgG4 або IgG4P.

Варіант 16: Антитіло згідно з будь-яким з варіантів 1-13, де антитіло взяте з Fab, Fab", F(ab")₂, scFv, dAb або VHH.

Варіант 17: Антитіло згідно з будь-яким із варіантів 1-16, коли антитіло містить:

а. варіабельний легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 7 або 11, або 15, або 19 або 23; та/або

б. варіабельний важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 9 або 27, або 31, або 35, або 39 або 43.

Варіант 18: Антитіло згідно з будь-яким із варіантів 1-15 або 17, де антитіло містить:

а. легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 13 або 17, або 21 або 25; та

б. важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 29 або 33, або 37, або 41 або 45.

Варіант 19: Антитіло за варіантом 17 або 18, де амінокислотний залишок глутаміну (Gln; Q) в L-CDR1 у положенні 24 з послідовністю SEQ ID NO: 15 або 17 замінений аргініном (Arg; R) або лізином (Lys; K).

Варіант 20: Антитіло згідно з будь-яким із попередніх варіантів, де KLK5 представлений людським KLK5 з послідовністю SEQ ID NO: 51 або 52 або 53, або KLK5 яванської макаки з послідовністю SEQ ID NO: 60.

Варіант 21: антитіло, яке:

а. Конкурує за зв'язування KLK5 з антитілом за будь-яким з варіантів - 20; та/або

б. перехресно блокує або перехресно блокується антитілом згідно з будь-яким з варіантів 1-20 для зв'язування KLK5; та/або

с. зв'язує KLK5 з тим же епітопом, що й антитіло згідно з будь-яким з варіантів 1-20; та/або

д. містить варіабельну область важкого ланцюга, що має принаймні 90 % ідентичності або подібності з послідовністю SEQ ID NO: 29 або 33, або 37, або 41 або 45; та/або

е. містить варіабельну область легкого ланцюга, що має принаймні 90 % ідентичності або схожості з послідовністю SEQ ID NO: 13 або 17, або 21 або 25.

Варіант 22: ізольований полінуклеотид, що кодує антитіло згідно за будь-яким з варіантів 1-20.

Варіант 23: ізольований полінуклеотид за варіантом 22, де полінуклеотид кодує:

а. варіабельну ділянку легкого ланцюга, у якій полінуклеотид:

i. принаймні на 90 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 8 (або нуклеотиди 1-330 з SEQ ID NO: 8) або 12 (або нуклеотиди 1-330 з послідовністю SEQ ID NO: 12) або 16 або 20, або 24, або 64 або 66; або

ii. містить послідовність SEQ ID NO: 8 (або нуклеотиди 1-330 з послідовністю SEQ ID NO: 8) або 12 (або нуклеотиди 1-330 з послідовністю SEQ ID NO: 12), або 16, або 20, або 24, або 64 або 66; або

iii. складається по суті з послідовності SEQ ID NO: 8 (або нуклеотидів 1-330 з послідовністю SEQ ID NO: 8) або 12 (або нуклеотидів 1-330 з послідовністю SEQ ID NO: 12) або 16, або 20, або 24, або 64 або 66; або

б. варіабельна ділянка важкого ланцюга, де полінуклеотид:

i. принаймні на 90 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 10 або 28, або 32, або 36, або 40 або 44; або

ii. містить послідовність SEQ ID NO: 10 або 28, або 32, або 36, або 40 або 44; або

iii. по суті складається з послідовності SEQ ID NO: 10 або 28, або 32, або 36, або 40 або 44; або

в. легкий ланцюг, де полінуклеотид:

i. принаймні на 90 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 14 або 18, або 22, або 26, або 65, або 67, або 100, або 101, або 102, або 103, або 104; або

ii. містить послідовність SEQ ID NO: 14 або 18, або 22, або 26, або 65, або 67, або 100, або 101, або 102, або 103, або 104; або

iii. по суті складається з послідовності SEQ ID NO: 14 або 18, або 22, або 26, або 65, або 67, або 101, або 102, або 103, або 104; або

г. важкий ланцюг, де полінуклеотид:

i. принаймні на 90 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 30 або 34, або 38, або 42 або 46; або

ii. містить послідовність SEQ ID NO: 30 або 34, або 38, або 42 або 46; або

iii. по суті складається з послідовності SEQ ID NO: 30 або 34, або 38, або 42 або 46.

Варіант 24: вектор клонування або експресії, що містить один або більше полінуклеотидів згідно з варіантом 22 або 23.

Варіант 25: клітина-хазяїн, що містить:

а. один або більше полінуклеотидів відповідно за варіантом 22 або 23 чи

б. один або більше векторів експресії згідно з варіантом 24.

Варіант 26: Процес виробництва антитіла згідно з будь-яким з варіантів 1-20, що включає культивування клітини-хазяїна згідно з варіантом 25 у відповідних умовах для виробництва та ізоляції антитіла, що продукується клітиною-хазяїном.

Варіант 27: Фармацевтична композиція, що містить антитіло згідно з будь-яким з варіантів 1-20 та один чи більше фармацевтично прийнятних носіїв, допоміжних речовин розріджувачів.

Варіант 28: антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент згідно з будь-яким з варіантів 1-20 або фармацевтична композиція згідно з варіантом 27 для застосування у терапевтичних цілях.

Варіант 29: Антитіло за будь-яким з варіантів 1-20 або фармацевтична композиція згідно з варіантом 27 для застосування при лікуванні захворювання, що характеризується порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5.

Варіант 30: Антитіло, призначене для використання за варіантом 29 для лікування синдрому Нетертона, atopічного дерматиту, іхтіозу, куперозу, астми або раку, такого як рак яєчників або рак сечового міхура або їх комбінації.

Варіант 31: Антитіло для застосування згідно з Варіантом 30 у разі синдрому Нетертона.

Варіант 32: Антитіло для застосування згідно з Варіантом 30 у разі atopічного дерматиту.

Варіант 33: Спосіб лікування захворювань, що обумовлені порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5 у пацієнта. При цьому зазначеному пацієнту вводиться терапевтично ефективна кількість антитіл згідно з будь-яким з варіантів 1-20 або фармацевтичної композиції згідно з варіантом 27.

Варіант 34: Метод відповідно до варіанту 33 для лікування синдрому Нетертона, atopічного дерматиту, іхтіозу, куперозу, астми або раку, такого як рак яєчників або рак сечового міхура.

Варіант 35: Антитіло, що використовується з Варіантом 34 для лікування синдрому Нетертона.

Втілення 36: Антитіло, що використовується з Варіантом 34 для лікування atopічного дерматиту.

Стислий опис рисунків

Рисунок 1. Ексклюзійна хроматографія за розміром (EX3). На панелях А і В показано профілі елюювання лише людської каліреїн-пов'язаної пептидази KLK5 (суцільний слід, крайній правий), окремо Fab-фрагменту антитіла кролика 10236 (пунктирний слід), людського KLK5+LEKTI D5 (довгий штриховий слід, панель А) або людського KLK5+LEKTI D8 (довгий штриховий слід, панель В) та людського KLK5+LEKTI D5+Fab-фрагменту антитіла кролика 10236 (короткий штриховий слід, крайній зліва, панель А) або людського KLK5+LEKTI D8+Fab-фрагменту антитіла кролика 10236 (короткий штриховий слід, крайній зліва, панель В).

Рисунок 2. ДНС-ПААГ пікових фракцій, визначених під час EX3, показаних на рисунках 1А та 1В. Доріжка 1, маркери молекулярної маси. Доріжка 2, пікова фракція подвійного комплексу людського KLK5+LEKTI D5. Доріжка 3, пікова фракція потрійного комплексу KLK5+LEKTI D5+Fab-фрагмент кролячого антитіла 10236. Доріжка 4, пікова фракція подвійного комплексу KLK5+LEKTI D8. Доріжка 5, пікова фракція потрійного комплексу KLK5+LEKTI D8+Fab-фрагмент кролячого антитіла 10236.

Рисунок 3. ДНС-ПААГ каліреїн-пов'язаної пептидази KLK5 для рентгенокристалографічних досліджень. Доріжка М, маркери молекулярної маси. Доріжка 1, людський KLK5, очищений від культур, вирощених у присутності кіфунензину (kif). Доріжка 2, людський KLK5, очищений від культур кіфунензину та оброблений ендоглікозидазою Н (Endo H).

Рисунок 4. Схематичне зображення епітопу KLK5 людини в комплексі з Fab-фрагментом антитіла кролика 10236. А) Важкий (темно-сірий) та світлий (світло-сірий) ланцюги Fab-фрагменту показані на малюнку та прозорій поверхні. KLK5 зображений у вигляді чорної стрічки. Залишки KLK5, які є частиною епітопу на людському KLK5, зв'язаному з антитілом 10236, зображені у вигляді чорних паличок. Б) Лейпептин (поверхня та палички), змодельований у кристалічній структурі KLK5 (стрічка), зв'язаної з Fab-фрагментом кролячого антитіла 10236 (поверхня). Fab-фрагмент 10236 контактує з 99-петлею на KLK5. В) Суперпозиція кристалічних структур 2PSX (білий, без цинку) та 2PSY (сірий, з цинком), що визначає рухи у 99-петлях та бічному ланцюзі His147 та His150 на KLK5, у присутності цинку. Лейпептин зображений у вигляді білої поверхні та паличок. Г) Накладання кристалічної структури 2PSX (KLK5, зв'язаний з лейпептином) на кристалічну структуру KLK5 у комплексі з Fab10236. При порівнянні обох структур визначено рухи у 99-петлі та бічному ланцюзі гістидину His147 та His150. Конформації петлі та залишків гістидину (His) у кристалічній структурі 2PSX та кристалічній структурі Fab10236, зв'язаної з KLK5, позначені, відповідно, білим та чорним кольором. Білий пунктирний прямокутник навколо гістидину His147 (кристалічна структура 2PSX) вказує на те, що ця конформація буде перетинатись з Fab-фрагментом 10236 (сіра поверхня). His147 знаходиться в іншій конформації в структурі KLK5-Fab10236. Біле, штрихове коло навколо His150 (чорне у в комплексі KLK5 з Fab-фрагментом 10236) вказує на те, що воно направлене на S2-кишеню активної частини KLK5, де зв'язується такий субстрат, як лейпептин. Лейпептин (сіра поверхня та палички) з кристалічної структури 2PSX показує місце зв'язку субстрату з активною стороною KLK5.

Рисунок 5. Дві орієнтації кристалічної структури людського KLK5 в комплексі з Fab-фрагментами кролячого антитіла 10236 та 10273. Людський KLK5 зображений у вигляді стрічки, а Fab-фрагменти кролячого антитіла 10236 і 10273 зображені у вигляді суцільної поверхні.

Рисунок 6. Гуманізація послідовності варіабельного легкого ланцюга кролячого антитіла 10236. Трансплантати 10236gL5, gL6, gL7 і gL8 є гуманізованими трансплантатами варіабельного легкого ланцюга кролячого антитіла 10236 з використанням зародкової лінії людини IGKV1-6 у вигляді каркасу акцептора. Донорські залишки виділені жирним шрифтом/курсивом та сірим кольором: Y2, D3 та K63. Ділянки, що визначають комплементарність, виділені жирним шрифтом/підкреслені. Мутації в CDRL1 для збільшення ІТ виділені жирним/підкреслені та виділені маркером: Q24R або Q24K.

Рисунок 7. Гуманізація послідовності варіабельного важкого ланцюга кролячого антитіла 10236. Трансплантати 10236gH9, gH10, gH11, gH12 і gH14 є гуманізованими трансплантатами варіабельного важкого ланцюга кролячого антитіла 10236 з використанням людської зародкової лінії IGHV4-4 у якості каркаса акцептора. Ділянки, що визначають комплементарність, виділені жирним шрифтом/підкреслені. Донорські залишки виділені жирним шрифтом/курсивом та сірим кольором: F67, Q71, S73, T76 та V78.

Рисунок 8. Інгібуюча активність антитіла 10236 gL6gH12 у порівнянні з калікреїновою панеллю та LEKTI D5 Fc-фрагменту кролика у порівнянні з KLK5 людини та яванської макаки.

Рисунок 9. Інгібуювання вивільнення IP-1 з клітин HaCat за допомогою антитіла Ab 10236 gL6gH12. Вивільнення IP-1 стимулювалось шляхом додавання KLK5 до клітин HaCat. Антитіло 10236 gL6gH12 досягло майже повного інгібування IP-1 до рівня, порівнянного з еталонним інгібітором LEKTI D5 Fc-білка кролика. Антитіло A33 Hu IgG4 є ізотопічним контролем.

Рисунок 10. Механізм дії антитіла 10236 gL6gH12 (A) та вихідного антитіла кролика (B). Значення КОБс наносились на графік відносно концентрації субстрату для антитіла 10236 та Fc-білка LEKTI D5 кролика (останній лише в (A)). Наведені дані для 10 нМ антитіла 10236 та 2 нМ інгібітору Fc-білка LEKTI D5 кролика. Схили кривих демонструють, що антитіло 10236 є неконкурентним інгібітором, тоді як білок LEKTI є конкурентним інгібітором.

Рисунок 11. Фарбування гематоксиліном та еозином, яке дозволяє відобразити архітектуру шкіри та цілісність рогового шару на відновленій моделі епідермісу шкіри людини. Вплив середовища, MC903 з або без антитіла 10236 gL6gH12 IgG4P (Ab 10236) або з чи без ізотипового контролю (hIgG4P).

Рисунок 12. Зимографічний аналіз, що демонструє активність серинової протеази в ділянках шкіри при atopічному дерматиті, які оброблені контрольним буфером (A) або антитілом 10236 gL6gH12 IgG4P (B).

Рисунок 13. Стрес-дослідження антитіла 10236 gL6gH12 IgG4P (далі 10236gL6gH12) для оцінки схильності до деамідування послідовності Asn(94)Ser на визначаючій комплементарності ділянці CDR3 легкого ланцюга.

Детальний опис винаходу

У цьому розділі будуть детально описані неорганічні аспекти та варіанти їх реалізації, а також наведені певні рисунки та приклади.

Технічні терміни мають загальноприйняте значення, якщо інше не визначено. Якщо будь-які терміни мають певне значення, відповідне пояснення буде надаватись у контексті використання терміну.

Якщо термін "містить" використовується в цьому описі та заявах, він не виключає інші елементи. У межах цього документу, термін "містить" вважається кращим втіленням терміну "що складається з".

Невизначений або визначений артикль, що застосовується до іменника однини, наприклад "a", "an" або "the", також означає цій іменник у множині, якщо інше не визначено.

Терміни "лікування" означає отримання бажаного фармакологічного та/або фізіологічного ефекту. Ефект може бути профілактичним з точки зору повного або часткового запобігання захворювання або його симптомів і/або терапевтичним з точки зору часткового або повного лікування захворювання та/або несприятливого ефекту, пов'язаного з хворобою. Таким чином, термін лікування означає будь-яке лікування захворювання ссавців, зокрема людини, та передбачає наступне: (а) запобігання виникненню захворювання у суб'єкта, який має схильність до такого захворювання, але ще не був діагностований як хворий; (б) уповільнення протікання хвороби, тобто припинення її розвитку; та (в) полегшення хвороби, тобто усунення захворювання.

"Терапевтично ефективна кількість" означає кількість антитіл KLK5, введення яких ссавцю або іншому суб'єкту є достатнім для лікування такого захворювання. Терапевтично ефективна кількість буде змінюватися залежно від антитіла до KLK5, захворювання та його тяжкості, а також віку, ваги суб'єкта, який підлягає лікуванню.

Термін "ізолюваний" означає, що антитіло або полінуклеотид, залежно від конкретного випадку, існує у фізичному середовищі, відмінному від того, в якому таке антитіло чи полінуклеотид зустрічаються у природних умовах.

У першому аспекті цього винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з калікреїном 5 (KLK5). При цьому антитіло містить варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг, і де:

а. варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 62 або SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3, з послідовністю SEQ ID NO: 3; та

б. варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6.

Переважно, антитіло, яке зв'язується з калікреїном 5 (KLK5) і яке містить варіабельний легкий ланцюг, містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1.

Отже, у переважному варіанті цього винаходу, антитіло, яке зв'язується з калікреїном 5 (KLK5), антитіло котрого містить варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг, характеризується за варіабельним легким ланцюгом, який містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3 та варіабельним важким ланцюгом, який містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6.

Калікреїн 5 (KLK5, KLK-L2, SCTE або будь-який інший відомий синонім) має трипсиноподібну активність. Він виражений у пре-проформі та містить сигнальний пептид із 29 амінокислот, як визначено інструментом для обробки біоінформації SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/index.php>), за яким слідує 37 амінокислотна пропептидна послідовність. При розщепленні пропептиду утворюється активний зрілий фермент, що складається з 237 амінокислот, які містять активну ділянку із каталітичною тріадою залишків, типовою для серин-протеази (Мишель І.П. а ін., 2005; JBC 280:15, 14628-35).

Якщо не вказано інше, термін KLK5 відноситься до будь-яких нативних пре- та проформ (тобто необробленого KLK5, що містить сигнальну послідовність та активаційний пептид), альтернативного сплайсингу або природних варіантів, мутантів і KLK5 інших видів (миші, яванської макаки тощо) та активного KLK5 (в результаті розщеплення без використання ферменту або у іншому випадку). Людський KLK5 містить послідовність, наведену в SEQ ID NO: 53 (активний людський KLK5). Інші послідовності KLK5, згадані тут, містять SEQ ID NO: 52 (проформа KLK5 людини без сигнальної послідовності) або SEQ ID NO: 51 (повнорозмірний людський KLK5 із сигнальною та пропептидною послідовностями), послідовність, що відповідає Uniprot Q9Y337 або нативному варіанту, що містить мутації в положеннях 55 та 153 (у послідовності SEQ ID NO: 51). Приклади цих мутацій включають людський KLK5, що містить залишки 23-293 у послідовності SEQ ID NO: 51, що мають мутації заміни гліцерину на аргінін у залишку 55 (G55R) та/або зміни аспарагінової кислоти на аспарагін у залишку 153 (D153N).

Антитіло відповідно до цього винаходу містить ділянки, що визначають комплементарність (CDR), три з важкого ланцюга та три з легкого ланцюга. Як правило, ділянки CDR знаходяться в каркасі і разом утворюють варіабельну область. Зазвичай прийнято, що ділянки CDR у варіабельній області важкого ланцюга антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента називають CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3, а у варіабельних областях легкого ланцюга - CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3. Вони нумеруються послідовно в напрямку від N-кінця до C-кінця кожного ланцюга.

Ділянки CDR традиційно нумеруються відповідно до системи, розробленої Кабатом та ін. Ця система викладена у роботі Кабата та ін., 1991 р., Послідовності білків, що представляють імунологічний інтерес, Департамент охорони здоров'я та соціальних служб США, НІЗ, США (надалі "Кабат та ін.»). Ця система нумерації використовується в цій специфікації, якщо не вказано інше.

Позначення залишків за схемою нумерації Кабата не завжди відповідають лінійній нумерації амінокислотних залишків. Фактична лінійна амінокислотна послідовність може містити меншу або більшу кількість амінокислот, ніж це передбачено у строгій нумерації за схемою Кабата, що відповідає скороченню або збільшенню структурного компонента, будь то каркас або ділянка, що визначає комплементарність (CDR), основної структури варіабельного домену. Правильну нумерацію залишків за схемою Кабата можна визначити для даного антитіла шляхом розміщення гомологічних залишків у послідовності антитіла зі "стандартною" нумерованою послідовністю за Кабатом.

CDR-ділянки варіабельного домену важкого ланцюга розташовані в залишках 31-35 (CDR-H1), залишках 50-65 (CDR-H2) та залишках 95-102 (CDR-H3) відповідно до схеми нумерації Кабата. Однак, згідно з Чотією (Чотія, І. та Леск А.М.б Молекулярна біологія, 196, 901-917 (1987)), петля, еквівалентна CDR-H1, протягається від залишку 26 до залишку 32. Таким чином, якщо не вказано інше, CDR-H1 означає залишки від 26 до 35, як передбачено системою нумерації Кабата та зазначається у визначенні топологічного циклу Чотії.

CDR-ділянки варіабельного домену легкого ланцюга розташовані на залишках 24-34 (CDR-L1), залишках 50-56 (CDR-L2) і залишках 89-97 (CDR-L3) відповідно до системи нумерації Кабата.

Окрім CDR-петель існує четверта петля між CDR-2 (CDR-L2 або CDR-H2) та CDR-3 (CDR-L3 або CDR-H3), яка утворена каркасом 3 (FR3). Відповідно до системи нумерації Кабата, каркас 3 визначається позиціями 66-94 у важкому ланцюзі та позиціями 57-88 у легкому ланцюзі.

В одному рекомендованому варіанті антитіло містить варіабельну область легкого ланцюга, що містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, а також варіабельну область важкого ланцюга, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6.

В іншому варіанті антитіло містить варіабельну область легкого ланцюга, що містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 62; ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3; а також варіабельну область важкого ланцюга, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4; ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6.

В іншому варіанті антитіло містить варіабельну область легкого ланцюга, що містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 63; ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3; а також варіабельну область важкого ланцюга, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4; ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6.

Антитіло, що містить такі послідовності, які визначають комплементарність (CDR), є інноваційним, оскільки воно характеризується високою спорідненістю до KLK5, переважно KLK5 людини, високим ступенем інгібування біологічної функції KLK5 та високою стабільністю, що є важливим у виробництві. Наприклад, мутації мотиву "NS" на "ND" (з послідовністю SEQ ID NO: 15) у CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3 (QQGYTNSNIINT;), призвели до різкого зниження афінності KLK5.

У другому аспекті цього винаходу пропонується антитіло, яке зв'язується з калікреїном 5 (KLK5), де антитіло зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87 (36), Ala107 (56), Arg110 (59), Lys111 (60), Lys112 (61), Val113 (62), Val137 (86), Lys138 (87), Ser139 (88), Ile140 (89), Pro141 (90), His142 (91), Pro143 (92), Tyr145 (94), Ser146 (95) і His147 (96) у послідовності SEQ ID NO: 51. Переважно епітоп характеризують за допомогою рентгенівської кристалографії. Цифри в дужках відповідають номенклатурі протеаз.

У рекомендованому варіанті, у якому антитіло що зв'язується з калікреїном 5 (KLK5), також зв'язується з епітопом людського KLK5, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51 та містить варіабельний легкий та важкий ланцюг, а також де:

а. варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1 або послідовністю SEQ ID NO: 62 або послідовністю SEQ ID NO: 63, переважно SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2 та CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3; та

б. варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6.

У цьому винаході термін "епітоп" означає як конформаційні, так і лінійні епітопи. Конформаційний епітоп складається з перерваних ділянок первинної амінокислотної послідовності антигену, а лінійний епітоп утворений послідовністю з безперервних амінокислот.

Епітоп можна ідентифікувати будь-яким відповідним методом картування епітопу, відомим у даній галузі техніки, у поєднанні з будь-яким із антитіл, запропонованих у цьому винаході. Приклади таких методів включають скринінг пептидів різної довжини, отриманих з повнорозмірного KLK5, для зв'язування з зазначеним у цьому винаході антитілом або його фрагментом та ідентифікацію найменшого фрагмента, який може специфічно зв'язуватися з антитілом, що містить послідовність епітопу, що розпізнається антитілом. Пептиди KLK5 можна отримати синтетичним шляхом або шляхом протеолітичного розщеплення KLK5. Пептиди, які зв'язують антитіло, можна ідентифікувати, наприклад, за допомогою мас-спектрометричного аналізу. Такі методи, як ЯМР-спектроскопія або рентгенівська кристалографія, можна використовувати для ідентифікації епітопу, зв'язаного з антитілом. Як правило, коли епітоп визначається за допомогою рентгенівської кристалографії, амінокислотні залишки антигену в межах молекулярного сіта 4Å від CDR (область, що визначає комплементарність) вважаються амінокислотними залишками, що входять до складу епітопу. Після ідентифікації епітоп може використовуватись для отримання фрагментів, які зв'язують антитіло, зазначене у даному винаході, і, якщо потрібно, використовуватись як імуноген для отримання додаткових антитіл, які зв'язують той самий епітоп.

Епітоп, як зазначено в аспектах та варіантах здійснення, що описують даний винахід, є переважно епітопом, що характеризується за допомогою рентгенівської кристалографії.

Термін "антитіло", який використовується у цьому контексті, включає цілі антитіла та їх функціонально активні фрагменти, тобто молекули, які містять антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язує антиген, які також називаються антигензв'язувальними фрагментами. Описані у цьому документі характеристики антитіл, також застосовуються до фрагментів, що зв'язують антиген, якщо інше не визначено контекстом. Антитіло може бути моноклональним, мультівалентним, мультиспецифічним, біспецифічним, повністю людським, гуманізованим або химерним (або походити з цих антитіл).

Цілі антитіла, також відомі як "імуноглобуліни (Ig)", як правило, стосуються інтактних або повнорозмірних антитіл, тобто містять елементи двох важких ланцюгів та двох легких ланцюгів, з'єднаних між собою дисульфідними зв'язками, які збираються, щоб визначити характерну Y-подібну тривимірну структуру. Класичні природні цілі антитіла є моноспецифічними, оскільки вони зв'язують один тип антигену, та двовалентними, оскільки вони мають два незалежних антигензв'язуючих домени. Терміни "інтактне антитіло", "повнорозмірне антитіло" та "ціле антитіло" використовуються як взаємозамінні для позначення моноспецифічного двовалентного антитіла, яке має структуру, подібну структурі нативного антитіла, включаючи Fc-область, як визначено тут.

Кожен легкий ланцюг складається з варіабельної області легкого ланцюга (скорочено VL) та константної області легкого ланцюга (CL). Кожен важкий ланцюг складається з варіабельної області важкого ланцюга (скорочено VH) та константної області важкого ланцюга (CH), що складається з трьох константних доменів CH1, CH2 і CH3 або чотирьох константних доменів CH1, CH2, CH3 і CH4, залежно від класу імуноглобуліну. "Клас" імуноглобуліну або антитіл відноситься до типу константної ділянки та включає IgA, IgD, IgE, IgG та IgM, і деякі з них можуть бути додатково розділені на підкласи, наприклад IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Константні ділянки антитіл можуть опосередковувати зв'язування імуноглобуліну з тканинами або клітинними факторами, включаючи різні клітини імунної системи (наприклад, ефекторні клітини) та перший компонент (C1q) класичної системи комплементу.

Термін "константна область(и)" або "константний(и) домен(и)" у цьому документі використовується для позначення домену(ів) антитіла, який знаходиться поза варіабельними областями. Константні домени є ідентичними в усіх антитілах одного ізотипу, але відрізняються між ізотопами. Як правило, константна область важкого ланцюга від N до C-кінцевої частини утворена CH1-шарнір -CH2-CH3-необов'язково CH4, що містить три або чотири константні домени.

Домени константної області молекули антитіла за даним винаходом, якщо вони присутні, можуть обиратись з урахуванням запропонованої функції антитіла, і, зокрема, ефекторних функцій, які можуть знадобитись. Наприклад, домени константної області можуть бути доменами IgA, IgD, IgE, IgG або IgM людини. Зокрема, можна використовувати домени константної області IgG людини, особливо ізотипів IgG1 та IgG3, коли антитіло призначене для терапевтичного застосування та якщо необхідні ефекторні функції антитіла. В якості альтернативи можна використовувати ізотипи IgG2 та IgG4, коли антитіло призначене для терапевтичних цілей та ефекторні функції антитіла не потрібні. Слід розуміти, що також можна використовувати варіанти послідовності цих доменів константної області. Наприклад, IgG4, у якому серин у позиції 241 (пронумерований відповідно до системи нумерації Кабата) був змінений на пролін, як визначено у роботі Ангала та ін. (Ангал та ін., 1993р.). Може використовуватись заміна однієї амінокислоти, яка ліквідує гетерогенність химерного антитіла миші/людини (IgG4), що спостерігається під час аналізу ДНС-ПААГ (Molecular Immunology 30, 105-108). У цій роботі вона називається IgG4P. Ця єдина амінокислотна заміна запобігає природній схильності важких ланцюгів молекул IgG4 міняти місцями химерні молекули.

Терміни "Fc-область", "Fc-фрагмент" або просто "Fc" використовуються для позначення C-кінцевої області антитіла, що включає константну область антитіла, за винятком першої константної області імуноглобулінового домену. Таким чином, Fc відноситься до двох останніх константних доменів, CH2 і CH3, IgA, IgD та IgG, або останніх трьох константних доменів IgE і IgM, а також карбоксильного кінця гнучкої ділянки до цих доменів. Fc-область важкого ланцюга IgG1 людини визначена як така, що включає залишки C226 до його карбоксильного кінця, де нумерація здійснюється відповідно до EU-індексу, як визначено Кабатом. У контексті людського імуноглобуліну IgG1 нижній шарнір відноситься до позицій 226-236, домен CH2 відноситься до позицій 237-340, а домен CH3 відноситься до позицій 341-447 відповідно до EU-індексу, як визначено Кабатом. Відповідну Fc-область інших імуноглобулінів можна ідентифікувати шляхом вирівнювання послідовностей.

У контексті цього винаходу, константна ділянка або Fc-область може бути нативною, як визначено вище, або модифікуватись різними способами, за умови, що вона містить функціональний домен зв'язування з Fc-рецептором і переважно функціональний домен зв'язування з FcRn. Переважно, модифікована константна область або Fc-область призводить до покращення функціональних можливостей та/або фармакокінетики. Модифікації можуть включати видалення певних частин Fc-фрагмента. Модифікації можуть додатково включати різні заміни амінокислот, здатні впливати на біологічні властивості антитіла. Також можуть бути присутніми мутації для поліпшення зв'язку з неонатальним Fc-рецептором а, отже, періоду напіввиведення in vivo. Модифікації можуть додатково включати модифікації профілю глікозилювання антитіла. Нативний Fc-фрагмент глікозилюваний у домені CH2 на кожному з двох важких ланцюгів N-глікану, зв'язаного із залишком аспарагіну в положенні 297 (Asn297). У контексті цього винаходу антитіло може бути глікомодифікованим, тобто мати певний профіль глікозилювання, який, наприклад, призводить до покращення властивостей, наприклад, ефекторної функції або скорочення періоду напіввиведення в сироватці крові.

Антигензв'язувальні фрагменти антитіл включають одноланцюгові антитіла (наприклад, scFv та dsscFv), Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменні антитіла або нанотіла (наприклад, варіабельна область легкого ланцюга або константна область легкого ланцюга, або антитіло важкого ланцюга або варіабельний новий рецептор антигену). Інші фрагменти антитіл для використання в цьому винаході включають фрагменти Fab і Fab', описані в міжнародних патентних заявках WO2011/117648, WO2005/003169, WO2005/003170 і WO2005/003171 (які усі включені сюди шляхом посилання).

Методи створення та виготовлення цих фрагментів антитіл добре відомі в даній галузі (див., наприклад, Верма та ін., 1998, журнал "Journal of Immunological Methods", 216, 165-181).

Типовий антигензв'язувальний фрагмент Fab або Fab', який використовується в цьому документі, містить пару важкого та легкого ланцюгів, у яких важкий ланцюг містить варіабельну область важкого ланцюга, константний домен CH1 та нативну або модифіковану шарнірну область, а легкий ланцюг містить варіабельну область легкого ланцюга та константну область легкого ланцюга. Димери Fab" створюють F(ab')₂, де, наприклад, димеризація може відбуватися через шарнір.

Термін "однодоменне антитіло", як він використовується в цьому документі, стосується фрагмента антитіла, що складається з одного мономерного варіабельного домену антитіла. Приклади однодоменних антитіл включають варіабельну область легкого ланцюга або константну область легкого ланцюга, або антитіло важкого ланцюга або варіабельний новий рецептор антигену.

Термін "Fv" відноситься до двох варіабельних доменів, наприклад кооперативних варіабельних доменів, таких як споріднена пара або зрілі варіабельні домені афінності, тобто пари варіабельної області важкого ланцюга та легкого ланцюга.

"Одноланцюговий варіабельний фрагмент" або "scFv", означає одноланцюговий варіабельний фрагмент, який стабілізований пептидним зв'язком між варіабельними доменами важкого та легкого ланцюгів.

Термін "Дисульфідно-стабілізований одноланцюговий варіабельний фрагмент" або "dsscFv", який використовується в цьому документі, означає одноланцюговий варіабельний фрагмент, який стабілізований пептидним зв'язком між варіабельним доменом важкого ланцюга і варіабельним доменом легкого ланцюга, а також включає міжмономерний дисульфідний зв'язок між варіабельною областю легкого ланцюга та варіабельною областю важкого ланцюга (дивись, наприклад, Везеріл та ін, журнал "Protein Engineering, Design & Selection", 25 (321-329), 2012 р., WO2007109254).

Дисульфідний зв'язок між варіабельними доменами важкого ланцюга та легкого ланцюга існує між двома із зазначених нижче залишків (якщо інше не передбачено, у переліку нижче використовується нумерація Кебота) (Журнал "Protein Science" 6, 781-788 Жу та ін. (1997); Везеріл та інші, журнал Protein Engineering, Design & Selection, 25 (321-329), 2012 р.; Журнал біохімії. 118, 825-831 Луо та інші (1995 р.); науковий журнал FEBS Letters 377 135-139 Юнг та інші (1995 р.);журнал Праці Національної академії наук США том 90 стор. 7538-7542 Брінкман та ін. (1993 р.); журнал "Proteins" 19, 35-47 Джунг та ін. (1994 р.) Біохімія 29 1362-1367; Глокшубер та ін. (1990 р.). Усі посилання на номенклатуру Кебота означають посилання на роботу Кебота та ін., 1991 р. (5-е видання, Bethesda, Md.), Послідовності білків, що представляють імунологічний інтерес, Департамент охорони здоров'я та соціальних служб США, Національний Центр Дослідження Здоров'я, США.

- VH37+VL95C;
- VH44+VL100;
- VH44+VL105;
- VH45+VL87;
- VH55+VL101;
- VH100+VL50;
- VH100b+VL4
- VH98+VL 46;
- VH101+VL46;
- VH105+VL43,

- VH106+VL57;

та відповідне положення або положення в парі варіабельних областей, розташованих у молекулі.

Термін "антитіло", який використовується в цьому документі, також охоплює моновалентні антитіла, тобто антитіла, що містять лише один антигензв'язуючий домен (наприклад, неповні антитіла, що містять з'єднані між собою повнорозмірний важкий ланцюг та повнорозмірний легкий ланцюг, так звані "напівантитіла").

Термін "антитіло" також охоплює полівалентні антитіла, що містять численні специфічності, наприклад біспецифічні, триспецифічні або мультиспецифічні антитіла.

Термін "мультиспецифічне" або "багатоспецифічне антитіло", що використовується в цьому документі, означає антитіла, які мають принаймні два зв'язувальні домени, наприклад, два або три зв'язувальні домени, де щонайменше два зв'язувальні домени незалежно зв'язують два різних антигени або два різних епітопи у одному антигені (їх також називають мультипаратопними). Мультиспецифічні антитіла, як правило, моновалентні для кожної специфічності (антигену). Мультиспецифічні антитіла, описані тут, охоплюють моновалентні та полівалентні, напр. двовалентні, тривалентні, чотиривалентні мультиспецифічні антитіла.

Термін "Антигензв'язуючий домен", який використовується в цьому документі, відноситься до частини антитіла, яка містить частину або один або більше варіабельних доменів, наприклад частину або всю пару варіабельних доменів варіабельної області важкого ланцюга та легкого ланцюга, що взаємодіють специфічно з цільовим антигеном. Зв'язувальний домен може містити одне доменне антитіло. В одному варіанті кожен зв'язуючий домен є моновалентним. Переважно кожен домен зв'язування містить не більше однієї варіабельної області важкого ланцюга та однієї варіабельної області легкого ланцюга.

Різноманітність мультиспецифічних форматів антитіл відома в даній галузі. Були запропоновані різні класифікації, але формати мультиспецифічних антитіл IgG зазвичай включають біспецифічні IgG, доданий імуноглобулін G, мультиспецифічні (наприклад, біспецифічні) фрагменти антитіл, мультиспецифічні (наприклад, біспецифічні) злиті білки та мультиспецифічні (наприклад, біспецифічні) кон'югати антитіл, як описано у роботі Спіес та ін., журнал "Молекулярна імунологія" 67 (2015): 95-106.

Методи створення біспецифічних антитіл включають, але не обмежуються цим, технологію для отримання бі- та мультиспецифічних антитіл CrossMab (Клейн та ін., Методи 154 (2019) 21-31), технологію "Knobs-in-holes" (виступи у западині) (наприклад, WO1996027011, WO1998050431), технологією DuoBody (наприклад, WO2011131746), азиметричну технологію (наприклад, WO2012058768). Подальші технології створення біспецифічних антитіл описані, наприклад, у роботі Годара та ін., 2018 р., "Експертний висновок щодо терапевтичних патентів", 28:3, 251-276. Біспецифічні антитіла включають, зокрема, антитіла CrossMab, DAF (два в одному), DAF (чотири в одному), DutaMab, DT-IgG, загальні лейкоцити із виступами у западині, збірку антитіл з виступами у западині, пару зарядів, антитіло з обміном напівмолекул (Fab-arm exchange), антитіло-подібні білки з доменами, сконструйованими шляхом заміни ланцюгів (SEEDbody), антитіла Triomab, LUZ-Y, область Fcab, клі-тіла та ортогональний антигензв'язуючий фермент.

Приєднані імуноглобуліни G класично включають повнорозмірний IgG, сконструйований шляхом приєднання додаткового антигензв'язуючого домену або антигензв'язувального фрагмента до N- та/або C-кінця важкого та/або легкого ланцюга IgG. Приклади таких додаткових антигензв'язуючих фрагментів включають антитіла sdAb (наприклад, VH або VL), Fv, scFv, dsScFv, Fab, scFav. Додані формати антитіл IgG включають, зокрема, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L, H)-Fv, IgG (H)-V, V(H)-IgG, IgC(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFav, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody та DVI-IgG (чотири -в-одному), наприклад, як описано в роботі Спісса та ін., Альтернативні молекулярні формати та терапевтичні застосування для біспецифічних антитіл. Журнал "Молекулярна імунологія" 67 (2015): 95-106.

Мультиспецифічні фрагменти антитіл включають нанотіло, нанотіло-HAS, біспецифічні антитіла, які активують Т-клітини, діатіло, переорієнтоване антитіло з подвійною аффіністю (DART), тандемне діатіло (TandAb), одноланцюгове діатіло (scDiabody), одноланцюгове діатіло-CH3, діатіло-CH3, потрібне тіло (Triple Body), мініантитіло; мінітіло, три-та бі-специфічне мінітіло, scFv-CH3 KIH, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')2, F(ab')2-scFv2, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, чотиривалентне антитіло, що містить виключно важкі ланцюги, одноланцюгове діатіло-Fc, діатіло-Fc, тандем scFv-Fc та інтратіло, як описано, наприклад, Спіс та ін., для біспецифічних антитіл. Молекулярна імунологія 67 (2015): 95-106.

Мультиспецифічні злиті білки включають антитіла отримані методом Dock and Lock, молекули ImmTAC, HSAbody, одноланцюгове діатіло scDiabody-HAS та Тандем scFv- токсин. Кон'югати мультиспецифічних антитіл включають IgG-IgG; Cov-X-тіло та scFv1-PEG-scFv2.

Додаткові мультиспецифічні формати антитіл були описані, наприклад, у роботі Брінкманна та Контерманна, MAT, 9:2, 182-212 (2017), зокрема на малюнку 2, зображені тандемні одноланцюгові фрагменти (scFv), тритіла, Fab-VHH, таFv-Fc, scFv4-Ig, scFv2-Fcab, scFv4-IgG. Бітіла, тритіла та способи їх отримання описані у публікації WO99/37791.

Доданий імуноглобулін G та приєднаний антиген-зв'язуючий фрагмент (Fab) містять цільний IgG або Fab-фрагмент відповідно, які сконструйовані шляхом додавання щонайменше одного додаткового антиген-зв'язуючого домену (наприклад, двох, трьох або чотирьох додаткових антигензв'язувальних доменів), наприклад, однодоменного антитіла (такі як VH або VL, чи VHH), scFv, dsScFv, dsFv до N- та/або C-кінця важкого та/або легкого ланцюга зазначених IgG або Fab, як описано у публікаціях WO2009/040562, WO2010035012, WO2011/030107, WO2011/061492, WO2011/061246 і WO2011/086091, що включені шляхом посилання. Зокрема, формат Fab-Fv був уперше описаний у публікації WO2009/040562, а його версія, стабілізована дисульфідом, Fab-dsFv, уперше розкрита у публікації WO2010/035012. Однолінкерне антитіло Fab-dsFv, у якому стабілізований дисульфідними зв'язками Fv-фрагмент (dsFv) з'єднаний з антиген-зв'язуючим фрагментом (Fab) через один лінкер між доменом варіабельного легкого або важкого ланцюга або доменом варіабельного важкого ланцюга Fv та C-кінцем легкого чи важкого ланцюга антиген-зв'язуючого фрагмента, вперше був описаний у роботі WO2014/096390, що включена шляхом посилання. Доданий IgG, що містить повнорозмірний IgG1,

сконструйований шляхом приєднання dsFv до С-кінця важкого або легкого ланцюга IgG, вперше був описаний у публікації WO2015/197789, що включена шляхом посилання.

Інший мультиспецифічний формат містить антиген-зв'язуючий фрагмент Fab, пов'язаний з двома фрагментами scFv або dsscFv, причому кожен фрагмент scFv або dsscFv зв'язує ту саму або іншу мішень (наприклад, один scFv або dsscFv зв'язує терапевтичну мішень, а один scFv або dsscFv збільшує період напіввиведення шляхом зв'язування, наприклад, з альбуміном). Такі фрагменти антитіл описані в публікації WO2015/197772, яка включена шляхом посилання. Інший формат містить Fab, пов'язаний лише з одним фрагментом scFv або dsscFv, як описано, наприклад, у публікації WO2013/068571, що включена шляхом посилання, та роботі Дейа та ін., MAT, 8(7) 1319-1335 (2016 р.).

Інші добре відомі формати мультиспецифічних антитіл включають наступне:

Діатіло відноситься до двох пар варіабельних фрагментів (Fv), першої пари VH (варіабельний важкий ланцюг)/VL (варіабельний легкий ланцюг) і додаткової пари VH/VL, які мають два лінкери між варіабельним фрагментом Fv. Таким чином, перший варіабельний фрагмент (Fv) пов'язаний з варіабельним легким ланцюгом другого Fv та варіабельний легкий ланцюг першого Fv пов'язаний з варіабельним важким ланцюгом другого Fv.

Тритіло відноситься до формату, подібного до діатіла, що містить три антиген-зв'язуючі фрагменти та чотири лінкери між антиген-зв'язуючими фрагментами.

Тетратіло відноситься до формату, подібного до діатіла, що містить чотири антиген-зв'язуючі домени та чотири лінкери між антиген-зв'язуючими фрагментами.

Тандемний scFv відноситься до принаймні двох одноланцюгових антиген-зв'язуючих деменів (scFv), пов'язаних через один лінкер, таким чином, що між варіабельним фрагментом (Fv) існує один лінкер.

Тандемний scFv-Fc означає принаймні два тандемні одноланцюгові варіабельні фрагменти scFv. При цьому кожен з цих фрагментів приєднаний до N-кінця домену CH2, наприклад, через шарнір, фрагмента константної області -CH2CH3.

Fab-Fv означає фрагмент Fv із варіабельною ділянкою, приєднаною до С-кінця ділянки CH1 важкого ланцюга та константної ділянки легкого ланцюга. Формат може бути представлений у пегільованій версії.

Fab'-Fv аналогічний FabFv, де частина Fab замінена на Fab'. Формат може бути представлений у пегільованій версії.

Fab-dsFv означає FabFv, де дисульфідний зв'язок усередині варіабельного фрагменту Fv стабілізує приєднані варіабельні ділянки С-кінця. Формат може бути представлений у пегільованій версії.

Fab-scFv є молекулою Fab з одноланцюговим варіабельним фрагментом scFv, приєднаним до С-кінця легкого або важкого ланцюга.

Fab'-scFv є молекулою Fab" з одноланцюговим варіабельним фрагментом scFv, приєднаним до С-кінця легкого або важкого ланцюга.

DiFa означає дві молекули Fab, пов'язані через С-кінець їх важких ланцюгів.

DiFab" означає дві молекули Fab", пов'язані через один або більше дисульфідних зв'язків у їхній шарнірній області.

Одноланцюгове діантитіло є діатілом, що містить внутрішній лінкер Fv, так що молекула містить три лінкери та утворює звичайний одноланцюговий варіабельний фрагмент (scFv), важкий та легкий варіабельні ланцюги кожного зв'язані з однією з варіабельних областей наступної пари Fv.

Термін "Одноланцюгове антитіло-Fc" (Scdiabody-Fc) означає два одноланцюгових антитіла, кожне з котрих з'єднане з N-кінцем домену CH2, наприклад, через шарнір, фрагмента константної області -CH2CH3.

Термін ScFv-Fc-scFv відноситься до чотирьох одноланцюгових варіабельних фрагментів scFv, кожен з котрих приєднаний до N-кінця та С-кінця як важкого, так і легкого ланцюга фрагмента -CH2CH3.

Одноланцюгове діантитіло-CH3 означає дві молекули одноланцюгового діантитіла, кожна з яких пов'язана, наприклад, через шарнір з доменом CH3.

IgG-scFv є повнорозмірним антитілом із одноланцюговим варіабельним фрагментом (scFv) на С-кінці кожного з важких ланцюгів або кожного з легких ланцюгів.

scFv-IgG є повнорозмірним антитілом із одноланцюговим варіабельним фрагментом (scFv) на N-кінці кожного з важких ланцюгів або кожного з легких ланцюгів.

V-IgG є повнорозмірним антитілом із варіабельним доменом на N-кінці кожного з важких ланцюгів або кожного з легких ланцюгів.

IgG-V є повнорозмірним антитілом із варіабельним доменом на С-кінці кожного з важких ланцюгів або кожного з легких ланцюгів.

DVD-Ig (також відомий як подвійний V-домен IgG) — це повнорозмірне антитіло з 4 додатковими варіабельними доменами, по одному на N-кінці кожного важкого та кожного легкого ланцюга.

В одному рекомендованому варіанті, антитіло, яке зв'язується з калікреїном 5 (KLK5), інгібує або знижує активність протеази KLK5 та містить змінний легкий ланцюг та змінний важкий ланцюг, і де:

а. варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 62 або SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3; та

б. варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6.

В іншому варіанті антитіло зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 та His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51 та інгібує або знижує активність протеази KLK5.

У цьому винаході терміном "інгібувати" (та його граматичні варіації) визначається вплив антитіл на біологічну активність KLK5. Біологічна активність KLK5 є протеазною активністю, переважно сериною протеазною активністю. Ефект призводить до повного або часткового пригнічення активності серинової протеази KLK5.

Не прив'язуючись до теорії, вважається, що антитіла зв'язуються з KLK5 і:

i) інгібують (наприклад, повністю або частково) або знижують активність протеази (переважно активність серинової протеази) KLK5; та/або

ii) зв'язуються з KLK5, коли KLK5 зв'язується з лімфоепітеліальним інгібітором типу Kazal або фрагментом лімфоепітеліального інгібітора типу Kazal та/або

iii) не конкурує з фрагментом лімфоепітеліального інгібітора типу Kazal або його фрагментом за зв'язування з KLK5 та/або

iv) утворює комплекс із KLK5, зв'язаним з фрагментом лімфоепітеліального інгібітора типу Kazal або його фрагментом (тобто утворює комплекс, який містить визначене у цьому винаході антитіло, KLK5 та лімфоепітеліальний інгібітор типу Kazal чи його фрагмент)

У цьому винаході термін "LEKTI" означає лімфоепітеліальний інгібітор типу Kazal, який складається з 15 доменів і розщеплюється пропротеїнконтвертазами, такими як фурин-протеаза, на менші функціональні фрагменти, у результаті чого утворюються фрагменти LEKTI, що складаються з одного або декілька доменів. Ці фрагменти секретуються у позаклітинний простір, де вони можуть утворювати інгібіторні комплекси з протеазами, такими як KLK5. LEKTI також відомий як інгібітор серинової протеази типу Kazal 5 (SPINK5) і є білком, який у людини кодується геном SPINK5. У людей продукуються три варіанти сплайсингу мРНК LEKTI, у результаті чого створюються повнорозмірні, довгі та короткі ізоформи білка, які відрізняються лише своїми карбоксикінцевими ділянками.

SPINK5 є членом сімейства генів, розташованого на хромосомі 5q32, який кодує інгібітори серинових протеаз. Це включає в себе інші епідермальні білки SPINK6 та LEKTI-2 (SPINK9), які також включені у даний винахід та позначаються терміном "LEKTI".

Термін "утворювати комплекс" (та будь-який його граматичний варіант) означає, що антитіло згідно з цим винаходом здатне зв'язуватись з KLK5, коли останній вже зв'язаний з іншим білком, таким як LEKTI, або фрагментом LEKTI, або іншим антитілом чи його фрагментом, таким як Fab.

Переважа цього антитіла полягає в тому, що воно може зв'язуватись з KLK5 та інгібувати біологічну (тобто протеазну) активність KLK5, при цьому конкуруючи з LEKTI або його фрагментом за зв'язування з KLK5. Таким чином, це антитіло може забезпечити інгібування активності KLK5 в умовах, коли LEKTI відділяється від комплексу KLK5: LEKTI, такого як прогресивно кислотне середовище від базального до рогового шару епідермісу.

Антитіло, яке "конкурує", "перехресно блокує", "перехресно блокується" або "зв'язується з тим самим епітопом у KLK5 людини" (або будь-яка інша граматична форма) як антитіло цього винаходу, вважається антитілом, яке не здатне утворювати комплекс із KLK5, зв'язаним з антитілом, яке зазначене у цьому винаході.

В одному варіанті цього винаходу LEKTI являє собою домен 5 LEKTI людини, що містить амінокислоти 1-64 з послідовністю SEQ ID NO: 54, або домен LEKTI 8, що містить амінокислоти 1-71 з послідовністю SEQ ID NO: 61.

Таким чином, у кращому варіанті антитіло, яке зв'язується з калікреїном 5 (KLK5):

i. зв'язується з KLK5, коли KLK5 зв'язаний з лімфоепітеліальним інгібітором типу Kazal (LEKTI) або його фрагментом;

ii. не конкурує з LEKTI або фрагментом LEKTI за зв'язування з KLK5 та/або

iii. утворює комплекс із KLK5, зв'язаним з LEKTI або фрагментом LEKTI;

де переважно фрагмент LEKTI є доменом людського LEKTI 5, що містить амінокислоти 1-64 з послідовністю SEQ ID NO: 54, або доменом LEKTI 8, що містить амінокислоти 1-71 з послідовністю SEQ ID NO: 61, і де антитіло містить варіабельний легкий ланцюг та змінний важкий ланцюг, та де:

a. варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 62 або SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3; і

b. варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6.

В іншому варіанті антитіло зв'язується з KLK5, переважно людський KLK5. У цьому випадку антитіло зв'язується з епітопом людського KLK5, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51 та:

i. зв'язується з KLK5, коли KLK5 зв'язується з LEKTI або фрагментом LEKTI;

ii. не конкурує з LEKTI або фрагментом LEKTI за зв'язок з KLK5 та/або

iii. утворює комплекс із KLK5, зв'язаним з LEKTI або фрагментом LEKTI;

де переважно фрагмент LEKTI є доменом 5 LEKTI людини, що містить амінокислоти 1-64 SEQ з послідовністю ID NO: 54, або доменом LEKTI 8, що містить амінокислоти 1-71 з послідовністю SEQ ID NO: 61.

В іншому варіанті антитіло, зазначене у цьому винаході, зв'язується з KLK5 людини, що переважно містить послідовність SEQ ID NO: 53, а також зв'язується з KLK5 яванської макаки, що переважно містить послідовність SEQ ID NO: 60.

В іншому варіанті антитіло, зазначене у цьому винаході, не зв'язується з калікреїном 2 (KLK2) людини або яванської макаки (супо), калікреїном 4 людини або яванської макаки (KLK4) чи калікреїном 7 людини або яванської макаки (KLK7). Іншими словами, антитіло є специфічним для KLK5, а не для інших калікреїнів.

Терміном "Специфічний", який використовується в цьому документі, позначається антитіло, яке розпізнає лише антиген, до якого воно є специфічним або антитіло, яке має значно вищу афінність зв'язування з антигеном, до якого воно специфічне (наприклад, KLK5), порівняно зі зв'язуванням з антигенами до яких таке антитіло є неспецифічним (наприклад, інші калікреїни), наприклад, афінність зв'язування, яка щонайменше в 5, 6, 7, 8, 9, 10 разів вища.

У цьому документі термін " K_D " означає константу дисоціації, яку отримують із співвідношення K_d до K_a (тобто K_d/K_a) і виражають як молярну концентрацію (M). K_d і K_a стосуються швидкості дисоціації та асоціації конкретної взаємодії антиген-антитіло (або його антиген-зв'язувального фрагмента). Значення K_D для антитіл можна визначити за допомогою добре відомих у даній галузі методів. Метод визначення K_D антитіла оснований на

поверхнево плазменном резонансі, тобто використанні системи Biacore®, як наведено у Прикладах цього документа, з використанням рекомбінантного KLK5 або його відповідного злитого білка/поліпептиду. В одному прикладі афінність вимірюють за допомогою рекомбінантного KLK5, як описано в Прикладах цього документа. З метою створення поверхневого плазмонного резонансу цільові молекули іммобілізуються на твердій фазі та піддаються впливу лігандів у рухомій фазі, що протікає вздовж проточної кювети. Якщо відбувається зв'язування ліганду з іммобілізованою мішенню, локальний показник заломлення змінюється, що призводить до зміни кута поверхневого плазмонного резонансу, який можна контролювати в режимі реального часу шляхом виявлення змін в інтенсивності відбитого світла. Швидкість зміни сигналу поверхневого плазмонного резонансу можна проаналізувати для визначення констант швидкості для фаз асоціації та дисоціації реакції зв'язування. Співвідношення цих значень дає уявну константу рівноваги (афінність) (див., наприклад, Вольф та ні., Cancer Research 53:2560-65 (1993)).

В одному варіанті антитіло, відповідно до цього винаходу, має більш високу афінність зв'язування (тобто меншу K_D) для KLK5 людини, ніж для KLK5 яванської макаки або миші. Термін "афінність" відноситься до сили взаємодії між антитілом і KLK5.

В одному варіанті концентрація напівмаксимального інгібування (IC_{50}) антитіла для блокування активності протеази KLK5 складає менше 800 пМ. Переважним є варіант, коли концентрація напівмаксимального інгібування (IC_{50}) антитіла для блокування активності протеази KLK5 є меншою за 18 пМ у аналізах *in vitro*.

Термін IC_{50} , який використовується у цьому документі, означає концентрацію напівмаксимального інгібування, за якою визначається ефективність речовини, такої як антитіло, щодо інгібування певної біологічної або біохімічної функції, якою в контексті цього винаходу є протеазна активність KLK5. IC_{50} - це кількісна міра, яка вказує, скільки конкретної речовини необхідно для пригнічення даного біологічного процесу, функції чи активності на половину.

Антитіло, що визначене у цьому винаході, згідно з даним винаходом може включати каркасні ділянки тварини, в яких було отримано антитіло. Наприклад, якщо антитіло було отримано у кролика, воно буде містити області, що визначають комплементарність, як зазначено вище, та каркасні ділянки антитіла кролика, наприклад антитіло, що містить варіабельну область легкого ланцюга відповідно до послідовності SEQ ID NO: 7 (нуклеотидна послідовність якої показана у SEQ ID NO: 8 або нуклеотиди 1-330 з послідовністю SEQ ID NO: 8) та варіабельну область важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 9 (нуклеотидна послідовність показана у послідовності SEQ ID NO: 10).

В одному варіанті антитіло може бути химерним або гуманізованим антитілом.

Химерні антитіла зазвичай отримують за допомогою методів рекомбінантної ДНК. ДНК може модифікуватись шляхом заміни кодуючої послідовності константних ділянок легкого та важкого ланцюгів людини відповідними константними ділянками легкого та важкого ланцюгів нелюдського походження (наприклад, миші або кролика) (Моррисон; PNAS 81, 6851 (1984)).

Антитіла людини містять варіабельні ділянки важкого або легкого ланцюга або повнорозмірні важкі чи легкі ланцюги, які є "похідними" або "походять від" певної послідовності зародкової лінії, якщо варіабельні ділянки або повнорозмірні ланцюги антитіла отримані із системи, яка використовує гени людського імуноглобуліну зародкової лінії. Такі системи включають імунізацію трансгенної миші, що несе гени людського імуноглобуліну, відповідним антигеном або скринінг бібліотеки генів людського імуноглобуліну, відображеної на фагах, за допомогою відповідного антигену. Людське антитіло або його фрагмент, яке походить з послідовності імуноглобуліну зародкової лінії людини, можна ідентифікувати шляхом порівняння амінокислотної послідовності антитіла людини з амінокислотними послідовностями імуноглобулінів зародкової лінії людини та вибору послідовності імуноглобуліну зародкової лінії людини, яка є найближчою (тобто має найбільший % ідентичності) до послідовності антитіла людини. Антитіло людини, яке є "похідним" або "походить від" конкретної послідовності імуноглобуліну зародкової лінії людини, може містити амінокислотні відмінності порівняно з послідовністю зародкової лінії через, наприклад, природні соматичні мутації або навмисне введення сайт-спрямованого мутагенезу. Проте вибране людське антитіло зазвичай є щонайменше на 90 % ідентичним до амінокислотної послідовності, кодованої геном імуноглобуліну зародкової лінії людини, і містить амінокислотні залишки, які ідентифікують антитіло людини як людське в порівнянні з амінокислотної послідовності імуноглобуліну зародкової лінії інших видів (наприклад, послідовності зародкової лінії миші). У деяких випадках амінокислотна послідовність людського антитіла може бути принаймні на 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, або 95 %, чи навіть на 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною амінокислотній послідовності, яка кодується геном імуноглобуліну зародкової лінії. Як правило, людське антитіло, отримане з конкретної послідовності зародкової лінії людини, демонструватиме не більше ніж 10 амінокислотних відмінностей від амінокислотної послідовності, кодованої геном імуноглобуліну зародкової лінії людини. У деяких випадках людське антитіло може мати не більше ніж 5 або навіть не більше ніж 4, 3, 2 або 1 відмінностей від амінокислотної послідовності, закодованої геном імуноглобуліну зародкової лінії.

Людські антитіла можна отримати різними методами, що зазвичай використовуються у цій галузі. Людські антитіла можна отримати гібридомним методом з використанням ліній клітин мієломи людини або мишачої гетеромієломи людини (Козбор, Journal of Immunology; (1984 p.) 133:3001; Бродер, Monoclonal Isolated Antibody Production Techniques and Applications, стр. 51-63, Marcel Dekker Inc, 1987 p.). Альтернативні методи включають використання бібліотек фагів або трансгенних мишей. Обидва ці методи передбачають використання наборів варіабельної області людини (Винтер Г.; (1994) журнал Annual Review of Immunology 12:433-455, Грін Л.Л., (1999) Journal of Immunological Methods 231:1 1-23).

В одному з варіантів антитіло згідно з цим винаходом є гуманізованим.

Антитіла згідно з даним винаходом можна отримати за допомогою будь-якого відповідного способу, відомого в даній галузі техніки. KLK5, включаючи його злиті білки, клітини (рекомбінантні або нативні), що експресують KLK5, можна використовувати для виробництва антитіл, які специфічно розпізнають KLK5. Можна використовувати різні форми KLK5, як описано у цьому документі.

В одному варіанті використовуваний антиген є активним KLK5, переважно отриманим, як описано в Прикладах нижче.

KLK5 або його фрагменти, що використовуються для імунізації носія можуть бути отримані способами, добре відомими в даній галузі, з генно-інженерних клітин-господарів, що містять системи експресії, або виділяються з природних біологічних джерел. KLK5 або його фрагмент може в деяких випадках бути частиною більшого білка, такого як злитий білок, наприклад, злитий з афінною міткою або подібним матеріалом.

Антитіла до KLK5, що значені у цьому винаході, можуть бути отримані, якщо імунізація тварини необхідна, шляхом введення KLK5 тварині, переважно нелюдині, з використанням добре відомих та стандартних протоколів, дивись, наприклад, Довідник з експериментальної імунології, Д.М. Біер (ред.), Том 4, Blackwell Scientific Publishers, Оксфорд, Англія, 1986). Багато теплокровних тварин, таких як кролики, миші, щури, вівці, корови, верблюди або свині, можуть бути імунізовані. Однак найбільше підходять миші, кролики, свині та щури.

Моноклональні антитіла можуть бути отримані будь-яким методом, відомим у цій галузі, таким як метод клітинного гібриду (Колер и Мильштейн, 1975 р., Nature, 256:495-497), триомна техніка, гібридомна техніка В-клітин людини (Козбор та ін., 1983, Журнал Immunology Today, 4:72) і техніка ЕБВ-гібридоми (Коул та ін., Журнал Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, стр. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985 р).

Зазначені антитіла також можна отримувати методом створення антитіл з окремих лімфоцитів. шляхом клонування та експресії кДНК варіабельної області імуноглобуліну, створених з окремих лімфоцитів, відібраних для виробництва специфічних антитіл, наприклад, методами, описаними у роботі Бабук Джей та ін., 1996, Proceedings of the National Academy of Sciences 93(15):7843-7848; WO92/02551; WO2004/051268 і WO2004/106377.

Скринінг на наявність антитіл можна проводити за допомогою аналізів для визначення зв'язування з KLK5 та/або аналізів для вимірювання інгібування біологічної активності KLK5, переважно активності протеази KLK5.

В одному переважному варіанті антитіло, яке зв'язується з калікреїном 5 (KLK5), є химерним або гуманізованим антитілом, переважно гуманізованим антитілом. При цьому антитіло містить варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг, і де:

а. варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 62 або SEQ ID NO: 63, переважно з послідовністю SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3; та

б. варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6.

В іншому варіанті антитіло, яке зв'язується з KLK5. При цьому антитіло зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51, де антитіло містить варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг і де:

а. варіабельний легкий ланцюг включає:

i. ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 62 або SEQ ID NO: 63, переважно SEQ ID NO: 1;

ii. ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2 і

iii. ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3; і

б. область варіабельного важкого ланцюга, що містить:

iv. ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4;

v. ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 і

vi. ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6

де антитіло є химерним або гуманізованим; переважно, антитіло є гуманізованим антитілом.

В іншому переважному варіанті гуманізоване антитіло, яке зв'язується з KLK5, містить варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг, де:

а. варіабельний легкий ланцюг включає:

i. ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 62 або SEQ ID NO: 63, переважно SEQ ID NO: 1;

ii. ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2 і

iii. ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3; і

б. область варіабельного важкого ланцюга, що містить:

iv. ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4;

v. ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 і

vi. ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6

де антитіло інгібує або знижує активність протеази KLK5 та/або зв'язується з KLK5, коли KLK5 зв'язується з LEKTI або фрагментом LEKTI; та/або не конкурує з LEKTI або фрагментом LEKTI за зв'язування з KLK5 та/або утворює комплекс із KLK5, зв'язаним з LEKTI або фрагментом LEKTI.

У більш переважному варіанті, гуманізоване антитіло зв'язується з епітопом людського KLK5, що містить Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51; де антитіло містить варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг і де:

а. область варіабельного легкого ланцюга включає:

i. ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 62 або SEQ ID NO: 63. Переважно є послідовність SEQ ID NO: 1;

ii. ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2 і

iii. ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3; і

б. область варіабельного важкого ланцюга, що містить:

- i. ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4;
- ii. ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 i
- iii. ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6

де антитіло інгібує або знижує активність протеази KLK5 та/або зв'язується з KLK5, коли KLK5 зв'язується з LEKTI або фрагментом LEKTI; i/або не конкурує з LEKTI чи його фрагментом за зв'язування KLK5 та/або утворює комплекс із KLK5, зв'язаним з LEKTI або його фрагментом.

Терміном "гуманізоване" антитіло позначається антитіло, у якому важкий та/або легкий ланцюг містить один або більше ділянок, що визначають комплементарність, (включаючи одну або більше модифікованих ділянок, що визначають комплементарність) від донорського антитіла (наприклад, нелюдського антитіла, такого як мишаче або кроляче моноклональне антитіло), зрощеного в каркас варіабельної області важкого та/або легкого ланцюга акцепторного антитіла (наприклад, антитіла людини). Дивись роботу Ваугана та ін., Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. В одному варіанті, в каркас антитіла людини переноситься не вся ділянка, що визначає комплементарність (CDR), а лише одна або більше специфічних ознак, що визначають залишки будь-якої з CDR (див., наприклад, роботу Кашмірі та ні., 2005, Methods, 36, 25-34). В одному варіанті лише залишки, що визначають специфічність, з однієї або кількох ділянок CDR, які зазначені у цьому документі вище, переносяться у каркас антитіла людини. В іншому варіанті лише залишки, що визначають специфічність, з кожної ділянки CDR, що визначені у цьому документі вище, переносяться в каркас антитіла людини.

Коли ділянки, які визначають комплементарність, зрощуються, можна використовувати будь-яку відповідну каркасну послідовність варіабельної області акцептора з урахуванням класу/типу донорного антитіла, з якого походять отримані ділянки, що визначають комплементарність, включаючи каркасні області миші, примата та людини.

Переважним є варіант, коли гуманізоване антитіло має варіабельний домен, що містить людські акцепторні каркасні області, а також один або більше ділянок, що визначають комплементарність та наведені у цьому документі. Таким чином, в одному варіанті передбачається використання блокуючого гуманізованого антитіла, яке зв'язується з KLK5, переважно людським KLK5. При цьому варіабельний домен містить акцепторні каркасні області людини та донорські ділянки CDR нелюдського походження.

Прикладами людських структур, які можна використовувати в цьому винаході, є KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY i POM (Кабат та ін., вище). Наприклад, KOL i NEWM можна використовувати для важкого ланцюга, REI можна використовувати для легкого ланцюга, а EU, LAY i POM можна використовувати як для важкого, так і для легкого ланцюга. У якості альтернативного варіанту, можуть використовуватись послідовності зародкової лінії людини. Відповідна інформація доступна у наступному посиланні: <http://www.imgt.org/>

У гуманізованому антитілі, що зазначене у цьому дослідженні, акцепторні важкі та легкі ланцюги не обов'язково повинні походити від того самого антитіла та можуть містити складні ланцюги, що мають каркасні ділянки, отримані від різних ланцюгів.

Відповідна каркасна область для легкого ланцюга гуманізованого антитіла згідно з цим винаходом походить із зародкової лінії людини IGKV1-6 JK4, що має послідовність SEQ ID NO: 47 та нуклеотидна послідовність якої відображена у SEQ ID NO: 48.

Відповідну каркасну область для важкого ланцюга гуманізованого антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагмента отримують із людської зародкової лінії IGHV4-4 JH4, яка має послідовність SEQ ID NO: 49 та нуклеотидна послідовність якої визначена у SEQ ID NO: 50.

Відповідно, в одному варіанті використовується гуманізоване антитіло, яке зв'язується з KLK5. При цьому антитіло містить варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг, де:

a. легкий варіабельний ланцюг включає:

i. ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 62 або SEQ ID NO: 63, переважною є послідовність SEQ ID NO: 1; i

ii. ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2 i

iii. ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3; i

b. варіабельну область важкого ланцюга, що містить:

i. ділянку CDR-H1, що містить послідовність SEQ ID NO: 4; i

ii. ділянку CDR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO: 5 i

iii. ділянку CDR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO: 6

каркасна область легкого ланцюга походить із людської зародкової лінії IGKV1-6 JK4, що містить послідовність SEQ ID NO: 47, а каркасна область важкого ланцюга походить із людської зародкової лінії IGHV4-4 JH4, що містить послідовність SEQ ID NO: 49. Переважно антитіло інгібує або знижує активність протеази KLK5 та/або зв'язується з KLK5, коли KLK5 зв'язується з LEKTI або фрагментом LEKTI; та/або не конкурує з LEKTI або фрагментом LEKTI за зв'язування з KLK5 та/або утворює комплекс із KLK5, зв'язаним з LEKTI або фрагментом LEKTI.

В іншому варіанті запропоновано гуманізоване антитіло, яке зв'язується з KLK5. При цьому антитіло зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 i His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51; де антитіло містить варіабельний легкий ланцюг i варіабельний важкий ланцюг i де:

a. варіабельний легкий ланцюг включає:

i. ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 62 або SEQ ID NO: 63, переважною є послідовність SEQ ID NO: 1; i

ii. ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2 i

iii. ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3; i

b. варіабельну область важкого ланцюга, що містить:

i. ділянку CDR-H1, що містить послідовність SEQ ID NO: 4; i

ii. ділянку CDR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO: 5 і

iii. ділянку CDR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO: 6

каркасна область легкого ланцюга походить із людської зародкової лінії IGV1-6 JK4, що містить послідовність SEQ ID NO: 47, а каркасна область важкого ланцюга походить із людської зародкової лінії IGHV4-4 JH4, що містить послідовність SEQ ID NO: 49. Переважно антитіло інгібує або знижує активність протеази KLK5 та/або зв'язується з KLK5, коли KLK5 зв'язаний з LEKTI або фрагментом LEKTI; і/або не конкурує з LEKTI або фрагментом LEKTI за зв'язування з KLK5 та/або утворює комплекс із KLK5, зв'язаним з LEKTI або фрагментом LEKTI; і

У гуманізованому антитілі каркасні ділянки можуть не мати таких же точних послідовностей, як у акцепторного антитіла. Наприклад, незвичайні залишки можуть бути замінені на залишки, що зустрічаються частіше для цього класу або типу акцепторного ланцюга. У якості альтернативного варіанту, обрані залишки в акцепторних каркасних областях можуть змінюватись таким чином, щоб вони відповідали залишкам, виявленим у тому самому положенні в донорному антитілі (див. Рейхман та ін., 1998, Nature, 332, 323-324). Такі зміни повинні бути зведені до мінімуму, необхідного для відновлення афінності донорського антитіла. Протокол для вибору залишків у акцепторних каркасних областях, які, можливо, потребують зміни, викладено у публікації WO91/09967 (посилання на яку наведено у цьому документі).

Таким чином, в одному варіанті 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 залишків у каркасі замінені альтернативним амінокислотним залишком.

Відповідно, в одному варіанті запропоновано гуманізоване антитіло згідно з цим винаходом, у якому залишки в кожному з положень 2, та/або 3, та/або 63 варіабельного легкого ланцюга (з послідовністю SEQ ID NO: 47 або SEQ ID NO: 15) є донорськими залишками. Переважно, щоб залишок у положенні 2 варіабельного легкого ланцюга був тирозином, а залишок у положенні 3 варіабельного легкого ланцюга був аспарагіновою кислотою. У деяких варіантах залишок у положенні 63 варіабельного легкого ланцюга представлений лізином.

В іншому варіанті запропоновано гуманізоване антитіло, у котрому залишки в кожному з положень 68, 72, 74, 77 і 79 (з послідовністю SEQ ID NO: 49; або положення 67, 71, 73, 76 і 78 з послідовністю SEQ ID NO: 39) варіабельного важкого ланцюга є донорними залишками.

Переважно, щоб залишок у положенні 72 варіабельного важкого ланцюга був глутаміном, а залишок у положенні 74 був серином та залишок у положенні 79 був валіном. У деяких варіантах залишок у положенні 68 змінного важкого ланцюга представлений фенілаланіном, та/або залишок у положенні 77 був представлений треоніном.

В одному переважному варіанті гуманізоване антитіло зв'язується з KLK5. При цьому гуманізоване антитіло містить:

- варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 11, або 15, або 19, або 23, і варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 27, або 31, або 35, або 39, або 43; або

- варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, де амінокислотним залишком у положенні 24 є аргінін (Arg; R) або лізин (Lys; K), та варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 27, або 31, або 35, або 39 або 43. Переважно антитіло інгібує або знижує активність протеази KLK5 та/або зв'язується з KLK5, коли KLK5 зв'язується з LEKTI або фрагментом LEKTI; та/або не конкурує з LEKTI або фрагментом LEKTI за зв'язування з KLK5 та/або утворює комплекс із KLK5, зв'язаним з LEKTI або фрагментом LEKTI.

В іншому варіанті запропоновано гуманізоване антитіло, яке зв'язується з KLK5, де антитіло зв'язується з епітопом людського KLK5, що містить Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 5. При цьому антитіло містить:

- варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 11, або 15, або 19, або 23, та варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 27, або 31, або 35, або 39, або 43; або

- варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, де амінокислотним залишком у положенні 24 є аргінін (Arg; R) або лізин (Lys; K), а також варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 27, або 31, або 35, або 39 або 43.

Переважно антитіло інгібує або знижує активність протеази KLK5 та/або зв'язується з KLK5, коли KLK5 зв'язується з LEKTI або фрагментом LEKTI; і/або не конкурує з LEKTI або фрагментом LEKTI за зв'язування з KLK5 та/або утворює комплекс із KLK5, зв'язаним з LEKTI або фрагментом LEKTI.

В одному переважному варіанті здійснення цього винаходу антитіло містить варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, і варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 39.

Більш переважно, щоб гуманізоване антитіло зв'язувалося з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51; де антитіло містить варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, і варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 39.

Ще більш переважним є варіант, коли гуманізоване антитіло інгібує або знижує активність протеази KLK5 та/або зв'язується з KLK5, коли KLK5 зв'язується з LEKTI або фрагментом LEKTI; та/або не конкурує з LEKTI або фрагментом LEKTI за зв'язування з KLK5 та/або утворює комплекс із KLK5, зв'язаним з LEKTI або фрагментом LEKTI.

В одному варіанті винахід передбачає використання антитіла, яке містить послідовність, що на 80 % подібна або ідентична послідовності, описаній у цьому документі, наприклад, на 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % відносно частини або всієї відповідної послідовності, наприклад послідовності

варіабельного домену, послідовності ділянки, що визначає комплементарність, або послідовності варіабельного домену, за винятком ділянки, що визначає комплементарність. В одному варіанті відповідною послідовністю є SEQ ID NO: 15. В іншому варіанті відповідною послідовністю є SEQ ID NO: 39.

В одному варіанті антитіло, яке зв'язує KLK5, містить легкий та важкий ланцюг, де варіабельний легкий ланцюг містить послідовність, яка принаймні на 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична або подібна до послідовності, що міститься в послідовності SEQ ID NO: 15, та/або варіабельний важкий ланцюг містить послідовність, що принаймні на 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична або подібна до послідовності SEQ ID NO: 39.

В одному варіанті антитіло, яке зв'язується з KLK5, містить легкий ланцюг, який принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % подібний або ідентичний до послідовності, SEQ ID NO: 15, але де антитіло має послідовність, що містить SEQ ID NO: 1 (або SEQ ID NO: 62 або 63) для ділянки CDR-L1, послідовність SEQ ID NO: 2 для ділянки CDR-L2 та послідовність SEQ ID NO: 3 для ділянки CDR-L3.

"Ідентичність", "ідентичний" або інші граматичні варіації, що використовуються в цьому документі, вказують на те, що в будь-якій конкретній позиції у вирівняних послідовностях амінокислотний залишок є ідентичним між послідовностями.

Термін "Подібність", "подібний" або інші граматичні варіації, які використовуються у цьому документі, означає, що в будь-якій конкретній позиції у вирівняних послідовностях амінокислотний залишок має подібний тип між послідовностями. Наприклад, лейцин може бути замінений на ізолейцин або валін. Інші амінокислоти, які часто взаємозамінюються, включають, але не обмежуються цим:

- фенілаланін, тирозин і триптофан (амінокислоти з ароматичними бічними ланцюгами);
- лізин, аргінін та гістидин (амінокислоти, що мають основні бічні ланцюги);
- аспартат та глутамат (амінокислоти з кислими бічними ланцюгами);
- аспарагін та глутамін (амінокислоти з амідними бічними ланцюгами); та
- цистеїн та метіонін (амінокислоти, що мають сірковмісні бічні ланцюги).

Ступінь ідентичності та подібності можна легко обчислити (Облікова молекулярна біологія, Лек, А.М., ред., Видавництво Оксфордського Університету, Нью-Йорк, 1988 р.; Біообчислення. Проекти з інформатики та геному, Сміт, Д.В., ред., Academic Press, Нью-Йорк, 1993; Комп'ютерний аналіз даних послідовності, частина 1, Гріффін, А.М., та Гріффін, Г.Г., ред., видавництво Humana Press, Нью-Джерсі, 1994 р.; Аналіз послідовностей у молекулярній біології, фон Хейн'є, Г., Academic Press, 1987 р., Аналіз послідовностей Primer, Грібсков, М. та Девереукс, Джей., ред., M Stockton Press, Нью-Йорк, 1991, програмне забезпечення BLAST™ доступне в NCBI (Алтсшуль С.Ф. та ін., 1990, Journal of Molecular Biology 215:403-410; Гіш В. та Стейтс, Д.Джей. 1993 р., Nature Genet. 3:266-272. Мадден, Т.Л. та інші, 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Алтсшуль С.Ф. та інші, 1997 р., Nucleic Acids Research 25:3389-3402; Чжан Дж. та Медден Т.Л. 1997 р., Genome Res. 7:649-656).

В одному варіанті антитіло є повнорозмірним антитілом, переважно вибраним із IgG1 та IgG4 або IgG4P.

Отже, даний винахід передбачає повнорозмірне гуманізоване антитіло, яке зв'язує з KLK5 та містить:

а. варіабельну область легкого ланцюга, що містить:

- i. ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1;
- ii. ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2 і
- iii. ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3; і

б. варіабельну область важкого ланцюга, що містить:

- iv. ділянку CDR-H1, що містить послідовність SEQ ID NO: 4;
- v. ділянку CDR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO: 5 і
- vi. ділянку CDR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO: 6.

Переважно, повнорозмірне гуманізоване антитіло зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51, де антитіло є ізоформою IgG4P.

В іншому варіанті запропоновано повнорозмірне гуманізоване антитіло, яке зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 у послідовності SEQ ID NO: 51 і де антитіло є ізоформою IgG4P.

Фахівці знають, що антитіла можуть зазнавати різноманітних посттрансляційних модифікацій. Тип та ступінь цих модифікацій часто залежить від лінії клітин-господарів, яка використовується для експресії антитіла, а також від умов культивування. Такі модифікації можуть включати зміни в глікозилуванні, окисленні метіоніну, утворенні дикетопіперазину, ізомеризації аспартату та дезамідуванні аспарагіну. Частою модифікацією є втрата карбоксикінцевого основного залишку (такого як лізин або аргінін) через дію карбоксипептидаз (як описано в роботі Харріса, Журнал Хроматографії 705:129-134, 1995). Відповідно, С-кінцевий лізин важкого ланцюга антитіла може бути відсутнім.

В одному варіанті С-кінцева амінокислота від антитіла відщеплюється під час посттрансляційних модифікацій.

В одному варіанті N-кінцева амінокислота від антитіла відщеплюється під час посттрансляційних модифікацій.

В одному переважному варіанті антитіло, яке зв'язується з KLK5, є повнорозмірним антитілом, що містить варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, і варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 39. Переважно, антитіло зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 у послідовності SEQ ID NO: 51.

В іншому варіанті антитіло, яке зв'язується з KLK5, є повнорозмірним антитілом IgG4, що містить легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 17, та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 41. Переважно,

щоб антитіло зв'язувалося з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51.

У ще в одному варіанті антитіло є Fab-фрагментом, що містить варіабельну область легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 15, та варіабельну область важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 39.

В іншому варіанті здійснення антитіло містить варіабельну область легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 15 та варіабельну область важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 27 або 31, або 35, або 39, або 43. Наприклад, антитіло є повнорозмірним антитілом IgG4, що містить варіабельну область легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 15 та варіабельну область важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 27 або 31, або 35, або 39, або 43, переважною є послідовність SEQ ID NO: 39. В одному варіанті амінокислота глутамін 24 (Gln; Q) з послідовністю SEQ ID NO: 15 є аргініном (Arg; R) Q24R або лізином (Lys; K) Q24K.

В іншому варіанті антитіло є повнорозмірним антитілом IgG4, що містить варіабельну область легкого ланцюга, що включає SEQ ID NO: 11, і варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність SEQ ID NO: 27 або 31, або 35, або 39, або 43. В іншому варіанті антитіло являє собою Fab'-фрагмент, що містить варіабельну область легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 11 та варіабельну область важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 27, або 31, або 35, або 39, або 43.

В іншому варіанті антитіло є повнорозмірним антитілом IgG4, що містить варіабельну область легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 19 та варіабельну область важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 27 або 31, або 35, або 39, або 43. В іншому варіанті здійснення антитіло являє собою фрагмент Fab', що містить варіабельну область легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 19 та варіабельну область важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 27, або 31, або 35, або 39, або 43.

В іншому варіанті антитіло є повнорозмірним антитілом IgG4, що містить варіабельну область легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 23 та варіабельну область важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 27, або 31, або 35, або 39, або 43.

В іншому варіанті антитіло є Fab-фрагментом, що містить легку варіабельну область з послідовністю SEQ ID NO: 23 та важку варіабельну область з послідовністю SEQ ID NO: 27, або 31, або 35, або 39, або 43.

В іншому варіанті антитіло, яке зв'язується з KLK5, є повнорозмірним антитілом IgG4, яке містить:

1. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13, і важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45; або

2. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 17, і важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45; або

3. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 17, де глутамін 24 (Gln; Q) є аргініном (Arg; R) Q24R або лізином (Lys; K) Q24K, та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29 або 33 або 37 або 41 або 45; або

4. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 2 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45; або

5. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 25, та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45.

Переважно щоб антитіло зв'язувалося з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51.

В одному переважному варіанті антитіло, яке зв'язується з KLK5, є повнорозмірним антитілом IgG4, що містить легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 17, та важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 41. У цьому варіанті антитіло зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51.

Даний винахід також передбачає використання зазначеного антитіла для утворення комплексу з KLK5, переважно людським KLK5, зв'язаним з іншим антитілом, яке містить:

1. варіабельний легкий ланцюг, що містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 68, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 69, та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 70 та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 71, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 72 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 73; та/або

2. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 74, та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 76; та/або

3. варіабельний легкий ланцюг, кодований нуклеотидом, що містить послідовність SEQ ID NO: 75, та варіабельний важкий ланцюг, кодований нуклеотидом з послідовністю SEQ ID NO: 77.

В одному варіанті пропонується антитіло, яке зв'язується з KLK5, переважно епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51. При цьому антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому, варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2, ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 23 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43.

У цьому варіанті антитіло утворює комплекс із KLK5, переважно людським KLK5, зв'язаним з іншим антитілом, яке містить:

1. варіабельний легкий ланцюг, що містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 68, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 69, та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 70, та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 71, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 72 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 73; та/або

2. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 74 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 76; та/або

3. варіабельний легкий ланцюг, кодований нуклеотидом, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 та варіабельний важкий ланцюг, кодований нуклеотидом, що містить послідовність SEQ ID NO: 77.

Таким чином, даний винахід також передбачає використання антитіла, яке зв'язує KLK5, переважно KLK5 людини, що містить:

1. варіабельний легкий ланцюг з ділянкою CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 68, ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 69, та ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 70 та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 71, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 72 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 73; де антитіло необов'язково гуманізовано; та/або

2. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 74 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 76; та/або

3. варіабельний легкий ланцюг, кодований нуклеотидом, що містить послідовність SEQ ID NO: 75 та варіабельний важкий ланцюг, кодований нуклеотидом, що містить послідовність SEQ ID NO: 77.

Крім того, даний винахід також містить комплекс KLK5-антитіла, що містить:

a. KLK5, переважно людський KLK5 та

b. антитіло, яке зв'язується з KLK5, де антитіло переважно зв'язується з епітопом людського KLK5, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51 і де антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг, де варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3 та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 23 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; і

c. інше антитіло, яке містить:

1. варіабельний легкий ланцюг, що містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 68, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 69 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 70 та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 71, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 72, ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 73; де антитіло необов'язково гуманізовано; та/або

2. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 74, і варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 76; та/або

3. варіабельний легкий ланцюг, кодований нуклеотидом, що містить послідовність SEQ ID NO: 75 та варіабельний важкий ланцюг, кодований нуклеотидом, що містить послідовність SEQ ID NO: 77.

Слід розуміти, що так зване "інше антитіло" зв'язує KLK5, переважно KLK5 людини, з епітопом, який відрізняється від описаного у цьому документі епітопу та не перекриває його (і містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51), як показано в прикладах нижче. У цьому відношенні такі антитіла не конкурують між собою.

Крім того, даний винахід також передбачає використання антитіла, яке конкурує за зв'язування з KLK5, переважно KLK5 людини, шляхом перехресного блокування або перехресно блокується антитілом, яке зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51. Таким чином, антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг і варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 62, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3; та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

3. варіабельний легкий ланцюг і варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

4. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 2 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

5. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15 та у якому амінокислотний залишок глутаміну 24 (Gln; Q) у послідовності SEQ ID NO: 15 є аргініном (Arg; R) або лізином (Lys; K); та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

6. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13, або 17, або 21, або 25, та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45.

В одному варіанті таке конкуруюче антитіло має варіабельну область важкого ланцюга, яка щонайменше на 80 % ідентична або подібна до послідовності, що містить SEQ ID NO: 29 або 33 або 37 або 41 або 45; та/або має варіабельну область легкого ланцюга, яка щонайменше на 80 % ідентична або подібна до послідовності, що містить SEQ ID NO: 13 або 17 або 21 або 25 або 30.

Конкуруючі антитіла можна ідентифікувати за допомогою будь-якого відповідного методу, що використовується в даній галузі, наприклад, за допомогою аналізу конкурентного ELISA або BIAcore, де зв'язування KLK5 конкуруючим антитілом шляхом перехресного блокування запобігає зв'язуванню антитіла, визначеного у цьому винаході, та навпаки.

Такі конкуруючі аналізи можуть використовувати ізолюваний природний або рекомбінантний KLK5 чи його відповідний злитий білок/поліпептид. В одному прикладі конкуренція вимірюється з використанням рекомбінантного активного KLK5 людини (такого, що містить, наприклад, SEQ ID NO: 53).

Біологічні молекули, такі як антитіла або фрагменти, містять кислотні та/або основні функціональні групи, що надає молекулі чистий позитивний або негативний заряд. Величина загального "спостережуваного" заряду залежить від абсолютної послідовності амінокислот суб'єкта, локального середовища заряджених груп у тривимірній структурі та умов навколишнього середовища молекули. Ізоелектрична точка (pI) - це рівень pH, при якому конкретна молекула або її доступна для розчинника поверхня не несуть чистого електричного заряду. В одному прикладі антитіло, що зв'язується з KLK5, який зв'язаний з епітопом KLK5 людини, який містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 5, можна сконструювати таким чином, який дозволяє отримати відповідну ізоелектричну точку. Таким чином, можна отримати антитіла із більш стійкими властивостями, зокрема відповідними профілями розчинності та/або стабільності та/або покращеними характеристиками очищення.

Таким чином, в одному аспекті винахід пропонує антитіло, що зв'язується з KLK5, що переважно зв'язане з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 у послідовності SEQ ID NO: 51. У цьому випадку антитіло містить:

а. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 23 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

б. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13 або 17 або 21 або 25 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29 або 33 або 37 або 41 або 45.

яке сконструйовано таким чином, що його ізоелектрична точка відрізняється від ізоелектричної точки початково ідентифікованого антитіла.

Антитіло можна, наприклад, сконструювати шляхом заміни амінокислотного залишку, такого як заміна кислого амінокислотного залишку одним або декількома основними амінокислотними залишками. У якості альтернативного варіанту, можуть вводитись основні амінокислотні залишки або видаляться кислі амінокислотні залишки. Якщо молекула має неприйнятно високі значення ізоелектричної точки (pI), кислотні залишки можуть вводитись для зниження ізоелектричної точки (pI), якщо це необхідно. Під час здійснення маніпуляцій з ізоелектричною точкою (pI) слід дотримуватися обережності, щоб зберегти бажану активність антитіла або фрагмента. Таким чином, в одному варіанті здійснення сконструйоване антитіло має таку саму або по суті таку саму активність, що й "немодифіковане" антитіло або фрагмент.

Такі програми, як ** ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html і http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html, можна використовувати для прогнозування ізоелектричної точки антитіла.

Слід розуміти, що спорідненість антитіл, що забезпечується цим винаходом, може бути змінена за допомогою будь-якого відповідного методу, відомого в даній галузі техніки. Таким чином, даний винахід також відноситься до варіантів антитіла, які мають покращену спорідненість до KLK5, зокрема до KLK5 людини. Такі варіанти можна отримати за допомогою низки протоколів дозрівання афінності, включаючи мутацію ділянок, що визначають комплементарність (Янг та ін., *Journal of Molecular Biology*, 254, 392-403, 1995), перетасування ланцюга (Marks та ін., *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992), використання мутаторних штамів *E. coli* (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996), перестановку ДНК (Паттен та ін., *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 724-733, 1997), фагове відображення (Томпсон та ін., *Journal of Molecular Biology*, 256, 77-88, 1996) та ПЦР з імітацією статевого розмноження (Крамері та ін., *Nature*, 391, 288-291, 1998 р.).

При бажанні антитіло, зазначене у цьому винаході, може з'єднуватись з однією або кількома ефекторними молекулами. Слід розуміти, що ефекторна молекула може включати одну ефекторну молекулу або дві або більше таких молекул, з'єднаних таким чином, щоб утворити один фрагмент, який можна приєднати до антитіл, зазначених у цьому документі. Якщо потрібно отримати фрагмент антитіла, пов'язаного з ефекторною молекулою, його можна отримати за допомогою стандартних хімічних процедур або процедур рекомбінантної ДНК, у яких фрагмент антитіла зв'язують або безпосередньо, або через агент зв'язування з ефекторною молекулою. Методи кон'югування таких ефекторних молекул з антитілами добре відомі в даній галузі (дивись роботу Хеллсторма та ін., *Controlled Drug Delivery*, 2га редакція, Обінсон та ін., ред., 1987, стр.623-53; Торп та ін., 1982, *Immunological Review*, 62:119-58 та Дубовчик та ін., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Конкретні хімічні процедури описані у публікаціях WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 та WO 03/031581. У якості альтернативного варіанту, коли ефекторна молекула є білком або поліпептидом, зв'язування може забезпечуватись за допомогою процедур рекомбінантної ДНК, наприклад, як описано в публікації WO 86/01533 та EP0392745.

Термін "ефекторна молекула", що використовується в цьому документі, включає, наприклад, протипухлинні агенти, ліки, токсини, біологічно активні білки, наприклад, ферменти, інші антитіла або фрагменти антитіл,

синтетичні або природні полімери, нуклеїнові кислоти та їх фрагменти, наприклад, ДНК, РНК та їх фрагменти, радіонукліди, зокрема радіойодид, радіоізотопи, хелатні сполуки металів, наночастки та репортерні групи, такі як флуоресцентні сполуки або сполуки, які можуть бути виявлені за допомогою спектроскопії ЯМР або ЕПР.

Приклади ефекторних молекул можуть включати цитотоксини або цитотоксичні агенти, включаючи будь-який агент, який є шкідливим для клітин (наприклад, вбиває). Приклади включають комбрестатини, доластатини, епотилони, ставроспорин, майтансиноїди, спонгістатини, ризоксин, галіхондрини, роридини, геміастерліни, таксол, цитохалазин В, грамїцидин D, бромід етідію, еметин, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкристин, вінбластин, колхіцин, даксорубіцин, дигідроксиантрацидін, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин та їх аналоги або гомологи.

Ефекторні молекули також включають, але не обмежуються цим, антиметаболіти (наприклад, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, цитарабін, 5-фторурацил, декарбазин), алкілюючі агенти (наприклад, мехлоретамін, тіопа хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) та ломустин (CCNU), циклофосфамід, бусульфамід, дибромоманітол, стрептозотозин, мітоміцин C і цис-дихлордіамін платина (II) (DDP) цисплатин), антрацикліни (наприклад, даунорубіцин (раніше дауноміцин) і доксорубіцин), антибіотики (наприклад, дактиноміцин (раніше актиноміцин), блеоміцин, мітраміцин, антраміцин (AMC), каліхеаміцин або дуокарміцин) та антимітотичні засоби (наприклад, вінкристин і вінбластин).

Приклади ефекторних молекул можуть включати цитотоксини або цитотоксичні агенти, включаючи будь-який агент, який є шкідливим для клітин (наприклад, вбиває). Приклади включають комбрестатини, доластатини, епотилони, ставроспорин, майтансиноїди, спонгістатини, ризоксин, галіхондрини, роридини, геміастерліни, таксол, цитохалазин В, грамїцидин D, бромід етідію, еметин, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкристин, вінбластин, колхіцин, даксорубіцин, дигідроксиантрацидін, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин та їх аналоги або гомологи.

Ефекторні молекули також включають, але не обмежуються цим, антиметаболіти (наприклад, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, цитарабін, 5-фторурацил, декарбазин), алкілюючі агенти (наприклад, мехлоретамін, тіопа хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) та ломустин (CCNU), циклофосфамід, бусульфамід, дибромоманітол, стрептозотозин, мітоміцин C і цис-дихлордіамін платина (II) (DDP) цисплатин), антрацикліни (наприклад, даунорубіцин (раніше дауноміцин) і доксорубіцин), антибіотики (наприклад, дактиноміцин (раніше актиноміцин), блеоміцин, мітраміцин, антраміцин (AMC), каліхеаміцин або дуокарміцин) та антимітотичні засоби (наприклад, вінкристин і вінбластин).

Інші ефекторні молекули можуть включати хелатні радіонукліди, такі як ^{111}In і ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{213}Bi , ^{252}Cf , ^{192}Ir і ^{188}Re або лікарські засоби, включаючи, але не обмежуючись цим, алкілфосфохоліни, інгібітори топоізомерази I, таксоїди та сураміни.

Інші ефекторні молекули включають білки, пептиди та ферменти. Ферменти, що представляють інтерес, включають, але не обмежуються цим, протеолітичні ферменти, гідролази, ліази, ізомерази, трансферази. Білки, поліпептиди та пептиди, які представляють інтерес, включають, але не обмежуються ними, імуноглобуліни, токсини, такі як абрин, рицин А, екзотоксин синьогнійної кислоти або дифтерійний токсин, білок, такий як інсулін, фактор некрозу пухлини, α -інтерферон, β -інтерферон, фактор росту нервів, тромбоцитарний фактор росту або тканинний активатор плазміногену, тромботичний агент або антиангіогенний агент, напр. ангіостатин або ендостатин, або модифікатор біологічної відповіді, такий як лімфокін, інтерлейкін-1 (IL-1), інтерлейкін-2 (IL-2), гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ), гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (Г-КСФ), фактор росту нервів (ФРН) або інший фактор росту та імуноглобуліни.

Інші ефекторні молекули можуть включати речовини, які можна виявити та які використовуються у діагностиці. Приклади виявлених речовин включають різні ферменти, простетичні групи, флуоресцентні матеріали, люмінесцентні матеріали, біоломінесцентні матеріали, радіоактивні нукліди, метали, що випромінюють позитрони (для використання в позитронно-емісійній томографії), і нерадіоактивні парамагнітні іони металів. Дивись патент США № 4,741,900 щодо іонів металів, які можуть бути кон'юговані з антитілами для використання в якості діагностики. Відповідні ферменти включають пероксидазу хрому, лужну фосфатазу, бета-галактозидазу або ацетилхолінестеразу. Відповідні простетичні групи включають стрептавідин, авидин та біотин. Флуоресцентні матеріали включають умбеліферон, флуоресцеїн, флуоресцеїн ізотіоціанат, родамін, дихлортриазиніламін флуоресцеїн, дансил хлорид і фікоеритрин. Люмінесцентні матеріали включають люмінол. Відповідні біоломінесцентні матеріали включають люциферазу, люциферин і екворин. Радіоактивні нукліди включають ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In та ^{99}Tc .

В іншому прикладі ефекторна молекула може збільшити період напіврозпаду антитіла *in vivo* та/або зменшити імуногенність антитіла та/або посилити доставку антитіла через епітеліальний бар'єр до імунної системи. Приклади відповідних ефекторних молекул цього типу включають полімери, альбумін, білки, що зв'язують альбумін, або сполуки, що зв'язують альбумін, як описано в WO05/117984.

Якщо ефекторна молекула є полімером, вона, як правило, може бути синтетичним або природним полімером, наприклад, необов'язково заміщеним поліалкїленовим, поліалкїленовим або поліоксїалкїленовим полімером з прямим або розгалуженим ланцюгом, або розгалуженим чи нерозгалуженим полісахаридом, наприклад, гомо- або гетерополісахаридом. До замісників, які можуть бути присутні у вищезазначених синтетичних полімерах, відноситься одна або кілька гідрокси-, метильних або метокси-груп.

Конкретні приклади синтетичних полімерів включають заміщений полі(етилєнглїколь) з прямим або розгалуженим ланцюгом, полі(пропіленглїколь), полі(вініловий спирт) або їх похідні, особливо заміщений полі(етилєнглїколь), такий як метоксиполі(етилєнглїколь) або його похідні.

Природні полімери включають лактозу, амілозу, декстран, глікоген або їх похідні.

В одному варіанті полімер представлений альбуміном або його фрагментом, таким як сироватковий альбумін людини або його фрагмент.

"Похідні", як зазначено в цьому документі, включають реакційноздатні похідні, наприклад тіолселективні реакційноздатні групи, такі як малеїміди тощо. Реакційноздатна група може зв'язуватись з полімером безпосередньо або через сегмент лінкера. Слід розуміти, що залишок такої групи в деяких випадках утворюватиме частину продукту, таку як сполучна група між фрагментом антитіла та полімером.

Розмір полімеру може змінюватись за бажанням, але, як правило, середня молекулярна маса буде в діапазоні від 500 Да до 50000 Да, наприклад, від 5000 до 40000 Да, наприклад, від 20000 до 40000 Да. Розмір полімеру, зокрема, може бути обраний на основі передбачуваного використання продукту, наприклад, здатності локалізуватися в певних тканинах, таких як пухлини, або подовжити циркулюючий період напіввиведення (дивись роботу Чапмана, 2002 р., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Таким чином, якщо продукт призначений для виходу з кровообігу та проникнення в тканини, наприклад, для лікування пухлини, слід використовувати полімер з низькою молекулярною масою, наприклад, з молекулярною масою близько 5000 Да. Якщо продукт залишається в обігу, доцільним буде використання полімеру з більш високою молекулярною масою, наприклад, в діапазоні від 20000 Да до 40000 Да.

Відповідні полімери включають поліалкіленовий полімер, такий як полі(етилєнглїколь) або, особливо, метоксиполі(етилєнглїколь) або його похідні, особливо з молекулярною масою в діапазоні від 15000 Да до приблизно 40000 Да.

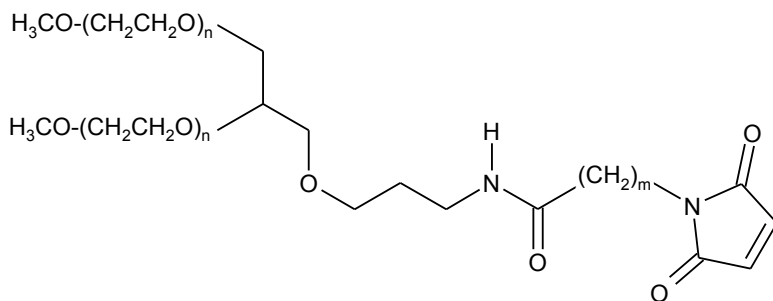
В одному прикладі антитіло, що зазначене у цьому винаході, приєднується до фрагментів полі(етилєнглїколю) (ПЕГ). В одному конкретному варіанті антитіло та молекули ПЕГ можуть приєднуватись через будь-яку доступну функціональну групу бічного ланцюга амінокислоти або кінцеву амінокислотну групу, розташовану у фрагменті антитіла, наприклад, будь-яку вільну аміно-, іміно-, тіолову, гідроксильну групу або карбоксильну групу. Такі амінокислоти можуть зустрічатись у фрагменті антитіла у природніх умовах або можуть вводитись в антитіло методом рекомбінантної ДНК (див., наприклад, US 5219996; US 5667425; WO98/25971, WO2008/038024). В одному прикладі антитіло за даним винаходом являє собою модифікований Fab-фрагмент, де модифікація полягає в додаванні до С-кінця його важкого ланцюга однієї або більше амінокислот для забезпечення можливості приєднання ефекторної молекули. Відповідно, додаткові амінокислоти утворюють модифіковану шарнірну область, що містить один або більше залишків цистеїну, до яких може бути приєднана ефекторна молекула. Для приєднання двох або більше молекул ПЕГ можна використовувати кілька сайтів.

Відповідно, що молекули ПЕГ ковалентно пов'язані через тіолову групу принаймні одного залишку цистеїну, розташованого у фрагменті антитіла. Кожна полімерна молекула, приєднана до модифікованого фрагмента антитіла, може бути ковалентно зв'язана з атомом сірки залишку цистеїну, розташованого у фрагменті. Ковалентний зв'язок, як правило, буде дисульфідним зв'язком або, зокрема, зв'язком сірка-вуглець. Якщо тіольна група використовується як точка приєднання, можна використовувати належним чином активовані ефекторні молекули, наприклад, селективні похідні тіолу, такі як малеїміди та похідні цистеїну. Активований полімер може використовуватись як вихідний матеріал для отримання фрагментів антитіл, модифікованих полімером, як описано вище. Активований полімер може бути будь-яким полімером, що містить тіолову реакційноздатну групу, таку як α -галогенкарбонова кислота або складний ефір, наприклад, йодоацетамід, імід, наприклад, малеїмід, вінілсульфон або дисульфід. Такі вихідні матеріали можна придбати (наприклад, у компанії Nektar, попередня назва Shearwater Polymers Inc., Хантсвілл, штат Алабана, США) або отримати з доступних вихідних матеріалів, використовуючи звичайні хімічні методи. Конкретні молекули ПЕГ включають 20К метокси-ПЕГ-амін (наприклад, у компанії Nektar, попередня назва Shearwater Polymers Inc.; Rapp Polymere; і SunBio) та метоксиполі(етилєнглїколь) сукцинімідил пропіонат (у компанії Nektar, попередня назва Shearwater).

В одному варіанті антитіло є модифікованим фрагментом Fab, Fab' або diFab, який є ПЕГільованим, тобто містить ПЕГ (полі(етилєнглїколь)), ковалентно приєднаний до нього, наприклад, відповідно до методу, описаному в EP 0948544 або EP1090037 (див. також "Полі(етилєнглїколь) хімія, біотехнічні та біомедичні застосування", 1992., Джей Мільтон Харрис (ред.), Plenum Press, Нью-Йорк, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997 р., Джей Мільтон Харрис та С. Заліпський (верс.), Американське хімічне товариство, Вашингтон, округ Колумбія, та "Методи з'єднання білків біокон'югації у біомедичних науках", 1998 р., М. Аслам та А. Дент, Grove Publishers, Нью-Йорк; Чепмен, А. 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54:531-545). В одному прикладі ПЕГ приєднаний до цистеїну в шарнірній області. В одному прикладі ПЕГ-модифікований фрагмент Fab містить малеїмідну групу, ковалентно зв'язану з однією тіоловою групою в модифікованій шарнірній області. Залишок лізину може бути ковалентно зв'язаний з малеїмідною групою, і до кожної з аміних груп на залишку лізину може бути приєднаний полімер метоксиполі (етилєнглїколю) з молекулярною масою приблизно 20000 Да. Таким чином, загальна молекулярна маса ПЕГ, приєданого до Fab-фрагмента, може становити приблизно 40 000 Да.

Конкретні молекули ПЕГ включають 2-[3-(N-малеїмідо)пропіонамідо]етиламід N, N'-біс (метоксиполі (етилєнглїколю) молекулярної маси 20 000) модифікованого лізину, також відомого як PEG2MAL40K (можна отримати від компанії Nektar, попередня назва Shearwater).

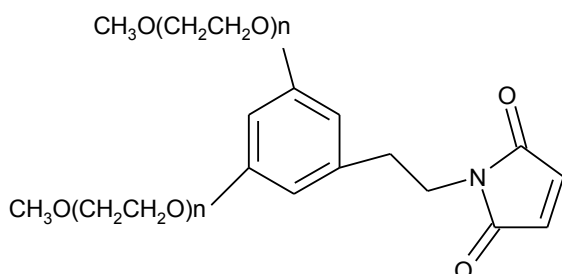
Альтернативні джерела лінкерів ПЕГ включають NOF, які постачають GL2-400MA3 (де m у наведеній нижче структурі дорівнює 5) та GL2-400MA (де m дорівнює 2), а n дорівнює приблизно 450:



m дорівнює 2 чи 5

Таким чином, в одному варіанті ПЕГ представлений 2,3-біс(метилполіоксіетилен-окси)-1-[[3-(6-малеїмідо-1-оксогексил)аміно]пропілокси] гексан (2-розгалужений ПЕГ, -CH₂) 3NHCO (CH₂)₅-MAL, молекулярна маса 40 000, відомий як SUNBRIGHT GL2-400MA3.

Інші альтернативні ефекторні молекули ПЕГ наступного типу:



є у наявності у компанії Dr Reddy, NOF та Jenkem.

В одному варіанті фрагменти Fab або Fab' кон'юговані з молекулою ПЕГ.

В одному варіанті пропонується молекула ПЕГ Fab", що містить один або більше полімерів ПЕГ, наприклад, 1 або 2 полімери, такі як полімер або полімери 40 кДа.

Молекули Fab'-ПЕГ відповідно до цього винаходу можуть мати особливу перевагу в тому, що вони мають період напіввиведення, незалежний від Fc-фрагмента. В одному варіанті пропонується використовувати фрагмент Fab", кон'югований з полімером, таким як молекула ПЕГ, молекула крохмалю або молекула альбуміну. В одному варіанті пропонується використовувати односторонній варіабельний фрагмент, кон'югований з полімером, таким як молекула ПЕГ, молекула крохмалю або молекула альбуміну. В одному варіанті фрагмент Fab або Fab" кон'югований із сироватковим альбуміном людини. В одному варіанті антитіло або фрагмент кон'югують з молекулою крохмалю, наприклад, для подовження періоду напіввиведення. Способи кон'югування крохмалю з білком, як описано в патенті США 8017739, визначені у наведеному посиланні.

Даний винахід також передбачає виділений полінуклеотид, що кодує антитіло згідно з цим винаходом. Виділений полінуклеотид згідно з даним винаходом може включати синтетичну ДНК, отриману, наприклад, шляхом хімічної обробки, кДНК, геномну ДНК або будь-яку їх комбінацію.

Стандартні методи молекулярної біології можуть використовуватись для отримання послідовностей ДНК, що кодує антитіло за даним винаходом. Бажані послідовності ДНК можуть бути повністю або частково синтезовані за допомогою методів синтезу олігонуклеотидів. У відповідних випадках можна використовувати методи спрямованого мутагенезу та полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

В одному варіанті виділений полінуклеотид кодує:

a. варіабельну область легкого ланцюга, де полінуклеотид:

i. принаймні на 90 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 8 (або нуклеотидам 1-330 з послідовністю SEQ ID NO: 8), або 12 (або нуклеотидам 1-330 з послідовністю SEQ ID NO: 12), або 16, або 20, або 24, або 64, або 66; або

ii. містить послідовність SEQ ID NO: 8 (або нуклеотиди 1-330 з послідовністю SEQ ID NO: 8), або 12 (або нуклеотиди 1-330 з послідовністю SEQ ID NO: 12), або 16, або 20, або 24, або 64, або 66; або

iii. складається в основному з послідовності SEQ ID NO: 8 (або нуклеотидів з 1-330 з послідовністю SEQ ID NO: 8), або 12 (або нуклеотидів 1-330 з послідовністю SEQ ID NO: 12), або 16, або 20, або 24, або 64, або 66;

b. варіабельну область важкого ланцюга, де полінуклеотид:

i. щонайменше на 90 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 10, або 28, або 32, або 36, або 40, або 44; або

ii. містить послідовність SEQ ID NO: 10 або 28 або 32 або 36 або 40 або 44; або

iii. складається по суті з послідовності SEQ ID NO: 10 або 28 або 32 або 36 або 40 або 44;

c. легкий ланцюг, у якому полінуклеотид:

i. щонайменше на 90 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 14 або 18 або 22 або 26 або 65 або 67 або 100 або 101 або 102 або 103 або 104; або

ii. містить послідовність SEQ ID NO: 14 або 18 або 22 або 26 або 65 або 67 або 100 або 101 або 102 або 103 або 104; або

iii. складається в основному з послідовності SEQ ID NO: 14 або 18 або 22 або 26 або 65 або 67 або 100 або 101 або 102 або 103 або 104;

d. важкий ланцюг, у якому полінуклеотид:

i. щонайменше на 90 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 30, або 34, або 38, або 42, або 46; або

ii. містить послідовність SEQ ID NO: 30, або 34, або 38, або 42, або 46; або

iii. складається в основному з послідовності SEQ ID NO: 30 або 34 або 38 або 42 або 46.

В одному варіанті даний винахід передбачає використання ізольованого полінуклеотида, що кодує важкий ланцюг фрагмента Fab' антитіла або антитіла IgG1 або IgG4, який містить послідовність SEQ ID NO: 10 або 28 або 32 або 36 або 40 або 44. Також передбачається використання ізольованого полінуклеотиду, що кодує легкий ланцюг Fab'-фрагмента антитіла або антитіла IgG1 або IgG4, яке містить послідовність SEQ ID NO: 8 (або нуклеотиди 1-330 з послідовністю SEQ ID NO: 8), або 12 (або нуклеотиди 1-330 з послідовністю SEQ ID NO: 12), або 16, або 20, або 24, або 64, або 66.

В іншому варіанті даний винахід передбачає використання виділеного полінуклеотиду, що кодує важкий та легкий ланцюг антитіла IgG4(P). Полінуклеотид, що кодує важкий ланцюг, містить послідовність SEQ ID NO: 30 або 34, або 38, або 42, або 46, та полінуклеотид, що кодує легкий ланцюг, містить послідовність SEQ ID NO: 14 або 18 або 22 або 26 або 65 або 67 або 100 або 101 або 102 або 103 або 104.

Даний винахід також передбачає використання вектору для клонування або експресії, що містить один або більше полінуклеотидів, описаних у цьому документі. В одному прикладі вектор для клонування або експресії містить один або кілька ізольованих полінуклеотидів, які, у свою чергу, містять послідовність SEQ ID NO: 14 або 18 або 22 або 26 або 65 або 67 або 100 або 101 або 102 або 103 або 104 або 30, або 34, або 38, або 42, або 46.

Для конструювання векторів використовуються добре відомі у галузі методи трансфекції та методи культивування. У цьому контексті, робиться посилання на "Поточні протоколи в молекулярній біології", 1999, Ф. М. Аусубель (верс.), Wiley Interscience, Нью-Йорк, та Інструкції Маніатіса, опубліковані видавництвом Cold Spring Harbor Publishing.

Також передбачається використання клітини-господаря, що містить одну або кілька ізольованих полінуклеотидних послідовностей, або один або більше векторів клонування або експресії, що містять одну або більше ізольованих полінуклеотидних послідовностей, які кодують антитіло. Для експресії полінуклеотидних послідовностей, що кодують антитіло, зазначене у цьому винаході, можна використовувати будь-яку відповідну систему клітина-господар/вектор. Можуть використовуватись бактеріальні, наприклад, *Escherichia coli*, та інші мікробні системи або еукаріотичні, у випадку ссавців, системи експресії клітин-господарів. Відповідні клітини-господарі ссавців включають клітини яєчників китайського хом'яка, міеломи або гібридоми.

Відповідні типи яєчників китайського хом'яка (СНО-клітини), що використовуються у цьому винаході, можуть включати клітини СНО і СНО-K1, включаючи клітини ДГФР-СНО, такі як клітини СНО-DG44 і клітини СНО-DXB11, які можна використовувати з селективним маркером ДГФР або клітини СНОK1-SV, які можна використовувати з селективним маркером глутамінсинтетази. Інші типи клітин, які використовуються для експресії антитіл, включають лімфоцитарні клітинні лінії, наприклад, клітини міеломи NSO і клітини SP2, клітини COS. Клітину-господаря можна стабільно трансформувати або трансфікувати ізольованими полінуклеотидними послідовностями або векторами експресії згідно з даним винаходом.

В одному варіанті клітина-господар є клітиною СНО-DG44, стабільно трансфікованою векторами експресії, що містять ізольовані полінуклеотидні послідовності, переважно містять ізольовані полінуклеотидні послідовності, що містять послідовність SEQ ID NO: 8 (або нуклеотиди 1 до 330 з послідовністю SEQ ID NO: 8), 10, 12 (або нуклеотиди з 1 по 330 з послідовністю SEQ ID NO: 12), 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 64, 65, 66, 67, 100, 101, 102, 103 або 104.

Даний винахід також передбачає спосіб виробництва антитіла, що зв'язується з KLK5, у тому числі культивування клітини-господаря в умовах, придатних для виробництва антитіла, і виділення отриманого антитіла.

Антитіло може містити тільки важкий або легкий ланцюг, і в цьому випадку для трансфекції клітин-господарів необхідно використовувати лише полінуклеотидну послідовність важкого або легкого ланцюга. Для виробництва антитіл, що містять як важкий, так і легкий ланцюги, клітинну лінію можна трансфікувати двома векторами, першим вектором, що кодує легкий ланцюг, і другим вектором, що кодує важкий ланцюг. Альтернативно, може бути використаний єдиний вектор, який містить полінуклеотидні послідовності, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг.

Таким чином, пропонується процес культивування клітини-господаря та експресії антитіла, виділення останнього та, необов'язково, процес очищення для отримання ізольованого антитіла. Таким чином, в одному варіанті запропоновано ізольоване антитіло, що зв'язується з KLK5, переважно людським KLK5, таким як гуманізоване антитіло, зокрема очищене від ендотоксину та/або білка клітини-господаря чи ДНК. При цьому антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг і варіабельний важкий ланцюг, де варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2, і ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3 та варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, що містить послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг і варіабельний важкий ланцюг. Варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 62, ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, що містить послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO: 6; або

3. варіабельний легкий ланцюг і варіабельний важкий ланцюг, де варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3 та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-

H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO: 6; або

4. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 23 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

5. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, де амінокислотний залишок глутаміну 24 (Gln; Q) з послідовністю SEQ ID NO: 15 є аргініном (Arg; R) або лізином (Lys; K) та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

6. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13, або 17, або 21, або 25 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45.

В іншому варіанті пропонується ізольоване антитіло, що зв'язується з KLK5, переважно KLK5 людини, таким як гуманізоване антитіло, зокрема антитіло згідно з винаходом, яке є істотно або практично очищеним від ендотоксину та/або білка клітини-господаря або ДНК, де антитіло зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51. У цьому варіанті антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. Варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3 та варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, що містить послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. Варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 62, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

3. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. Варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3 та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

4. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 23 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

5. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, де амінокислотний залишок глутаміну 24 (Gln; Q) у послідовності SEQ ID NO: 15 представлений аргініном (Arg; R) або лізином (Lys; K) та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

6. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13, або 17, або 21, або 25 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45.

Термін "По суті не містить ендотоксину" означає, що вміст ендотоксину складає 1 OE на мг антитіла чи менше, наприклад 0,5 або 0,1 OE на мг продукту.

Термін "По суті не містить білка або ДНК клітини-хазяїна" означає, що вміст білка та/або ДНК клітини-господаря складає 400 мкг на мг антитіла або менше, наприклад 100 мкг/мг чи 20 мкг/мг.

Оскільки антитіла, зазначені у цьому винаході, можуть використовуватись для лікування, діагностики та/або профілактики патологічного стану, даний винахід також передбачає фармацевтичну або діагностичну композицію, що містить антитіло у комбінації з одним або декількома з фармацевтично прийнятних носіїв, допоміжних речовин або розріджувачів.

Переважно, фармацевтична або діагностична композиція містить антитіло, яке зв'язується з KLK5, переважно KLK5 людини. При цьому антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг і варіабельний важкий ланцюг. При цьому, варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3, а також варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 62, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

3. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, а також варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

4. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 23 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

5. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15. При цьому амінокислотний залишок глутаміну 24 (Gln; Q) з послідовністю SEQ ID NO: 15 є аргініном (Arg; R) або лізином (Lys; K) та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

6. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13, або 17, або 21, або 25 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45.

Переважно, щоб антитіло зв'язувалося з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51.

В одному варіанті антитіло, зазначене у цьому винаході, є єдиним активним інгредієнтом. В іншому варіанті, таке антитіло міститься разом з одним або кількома додатковими активними інгредієнтами. У якості альтернативного варіанту, фармацевтичні композиції можуть містити антитіло, яке є єдиним активним інгредієнтом та його можна вводити індивідуально пацієнту в комбінації (наприклад, одночасно, послідовно або окремо) з іншими терапевтичними, діагностичними або паліативними засобами.

В іншому варіанті фармацевтична композиція містить антитіло, що зв'язується з KLK5, переважно KLK5 людини. При цьому антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2, ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3 та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 62, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3 та варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

3. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

4. варіабельний легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 2 та варіабельний важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

5. варіабельний легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 15. При цьому амінокислотний залишок глутаміну 24 (Gln; Q) з послідовністю SEQ ID NO: 15 є аргініном (Arg; R) або лізином (Lys; K) та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

6. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13, або 17, або 21, або 2 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45;

та один або кілька фармацевтично прийнятних носіїв, ексципієнтів розріджувачів.

Бажано, щоб фармацевтична композиція, що містить антитіло, яке зв'язується з KLK5, зв'язувалась з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 та His147 у послідовності SEQ ID NO: 51. Більш переважно, щоб фармацевтична композиція містила антитіло, яке зв'язується з KLK5. При цьому антитіло зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 та His147 у послідовності SEQ ID NO: 51 та антитіло якого містить варіабельну область легкого ланцюга у послідовності SEQ ID NO: 15 та варіабельну область важкого ланцюга у послідовності SEQ ID NO: 39.

Фармацевтичні композиції, зазначені у цьому винаході, можна відповідним чином вводити пацієнту для визначення необхідної терапевтично ефективної кількості. Термін "терапевтично ефективна кількість", який використовується в цьому документі, стосується кількості терапевтичного агенту, необхідного для лікування, полегшення або запобігання цільовому захворюванню чи стану або для прояву виявленого терапевтичного чи профілактичного ефекту. Терапевтично ефективну кількість будь-якого антитіла можна спочатку оцінити в аналізах клітинних культур або на модельних тваринах, як правило, гризунах, кроликах, собаках, свинях або приматах. Модельні тварини також можуть використовуватись для визначення відповідного діапазону концентрації та шляху введення. Така інформація може використовуватись для визначення корисних доз та шляхів введення людям.

Точна терапевтично ефективна кількість для суб'єкта-людини залежить від тяжкості захворювання, загального стану здоров'я суб'єкта, віку, ваги та статі суб'єкта, раціону харчування, часу та частоти введення, комбінації(ів) препаратів, реакції чутливості та толерантності/відповіді на терапію. Як правило, терапевтично ефективна кількість становитиме від 0,01 мг/кг до 500 мг/кг, наприклад, від 0,1 мг/кг до 200 мг/кг, наприклад, 100 мг/кг. Фармацевтичні композиції можуть бути зручно представлені у формах одиничних доз, що містять заздалегідь визначену кількість активного агента на дозу.

Фармацевтично прийнятні носії в терапевтичних композиціях можуть додатково містити рідини, такі як вода, фізіологічний розчин, гліцерин та етанол. Крім того, у таких композиціях можуть бути присутніми допоміжні речовини, такі як зволожувачі або емульгуючі агенти чи буферізуючі речовини для підтримки pH. Такі носії дозволяють складати фармацевтичні композиції у вигляді таблеток, пігулок, драже, капсул, рідин, гелів, сиропів та суспензій.

Відповідні форми для введення включають форми, придатні для парентерального введення, наприклад шляхом ін'єкції або інфузії, шляхом болюсної ін'єкції або безперервної інфузії, у внутрішньовенній, інгаляційній або підшкірній формі. Якщо продукт призначений для ін'єкцій або інфузій, він може мати форму суспензії, розчину або емульсії в масляному або водному розчиннику та може містити допоміжні речовини, такі як суспендуючі, консерванти, стабілізатори та/або диспергуючі агенти. У якості альтернативного варіанту, антитіло, зазначене у цьому винаході, може мати суху форму для розведення перед використанням з відповідною стерильною рідиною. Також можна приготувати тверді форми, придатні для розчинення або суспензії в рідких носіях перед ін'єкцією.

Після приготування композиції винаходу можна вводити безпосередньо суб'єкту. Таким чином, у цьому винаході передбачаються антитіла для виробництва лікарського засобу.

Переважно, фармацевтична композиція згідно з даним винаходом адаптована для введення людям.

Отже, в іншому варіанті даного винаходу передбачено використання антитіла, яке зв'язується з KLK5. При цьому, антитіло або фармацевтична композиція, що містить антитіло, призначене для використання у терапевтичних цілях. При цьому антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг, При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3 та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 62, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

3. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2, з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

4. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 23 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

5. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, де амінокислотний залишок глутаміну 24 (Gln; Q) у послідовності SEQ ID NO: 15 є аргініном (Arg; R) або лізином (Lys; K) та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

6. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13, або 17, або 21, або 25 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45.

Переважно, щоб антитіло зв'язувалось з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 у послідовності SEQ ID NO: 51.

У переважному варіанті використовується антитіло, яке зв'язується з KLK5, або фармацевтична композиція, що містить антитіло, призначене для використання у фармацевтичних цілях. При цьому антитіло містить наступне:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг, де варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3, а також варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3, з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 39; або

3. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 17, та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 41.

Переважно, антитіло зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 у послідовності SEQ ID NO: 51.

В іншому переважному варіанті антитіло, яке зв'язується з KLK5, повинне зв'язуватись з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 у послідовності SEQ ID NO: 51 або фармацевтичною композицією, що містить антитіло, призначене для використання в фармацевтичних цілях. При цьому антитіло містить наступне:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 39; або

3. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 17 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 41

Зокрема, застосування в терапевтичних цілях передбачає використання в лікуванні одного або кількох захворювань, що характеризуються порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5.

У ще в одному варіанті даний винахід передбачає спосіб лікування одного або кількох захворювань, що характеризуються порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5 у пацієнта, що включає введення вказаному пацієнту терапевтично ефективної кількості антитіла, яке зв'язується з KLK5, або фармацевтичної композиції, що містить антитіло. При цьому антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ

ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, що містить послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. Варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 62, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

3. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При чому, варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

4. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 23 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

5. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, де амінокислотний залишок глутаміну 24 (Gln; Q) у послідовності SEQ ID NO: 15 є аргініном (Arg; R) або лізином (Lys; K) та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

6. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13, або 17, або 21, або 25 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45.

Переважно, щоб антитіло зв'язувалось з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 а His147 у послідовності SEQ ID NO: 51

В іншому переважному варіанті даний винахід передбачає спосіб лікування одного або кількох захворювань, що характеризуються порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5 у пацієнта, що включає введення зазначеному пацієнту терапевтично ефективної кількості антитіла або фармацевтичної композиції, що містить антитіло. При цьому антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 39; або

3. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 17 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 41.

Переважно, щоб антитіло зв'язувалось з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 та His147 у послідовності SEQ ID NO: 51.

В іншому варіанті передбачається використання антитіла, яке зв'язується з KLK5, або фармацевтичної композиції, що містить антитіло. При цьому антитіло призначене для лікування одного або кількох захворювань, що характеризуються порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5. При цьому антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 62, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3 та варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

3. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3 з послідовністю SEQ ID NO: 3 та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

4. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 23 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

5. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, де амінокислотний залишок глутаміну 24 (Gln; Q) у послідовності SEQ ID NO: 15 є аргініном (Arg; R) або лізином (Lys; K) та варіабельний важкий ланцюг, що містить SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

6. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13, або 17, або 21, або 25 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45.

Переважно, щоб антитіло зв'язувалось з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 та His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51.

В іншому переважному варіанті пропонується антитіло, яке зв'язується з KLK5, або фармацевтична композиція, що містить антитіло, при цьому останнє призначене для лікування одного або кількох захворювань,

що характеризуються порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5. При цьому антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що містить SEQ ID NO: 1, CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3, що містить SEQ ID NO: 3, а також варіабельний важкий ланцюг, що включає ділянку CDR-H1 з послідовністю SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2 з послідовністю SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3 з послідовністю SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 39; або

3. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 17 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 41.

Переважно, щоб антитіло зв'язувалось з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 та His147 з послідовністю SEQ. ID NO: 51.

Переважно, щоб одне або більше захворювань, що характеризуються порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5, вибирались із синдрому Нетертона, atopічного дерматиту, іхтіозу, розацеа, астми або раку, такого як рак яєчників або рак сечового міхура або їх комбінація.

Отже, даний винахід пропонує спосіб лікування синдрому Нетертона, atopічного дерматиту, іхтіозу, розацеа, астми або раку, наприклад раку яєчників або раку сечового міхура, або комбінації цих захворювань у пацієнта, що передбачає введення зазначеному пацієнту терапевтично ефективної кількості антитіла, яке зв'язується з KLK5, або фармацевтичної композиції, що містить антитіло. При цьому антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що включає послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, що включає послідовність SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, що включає послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, що включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, що включає послідовність SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3, що включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що включає послідовність SEQ ID NO: 62, ділянку CDR-L2, що включає послідовність SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3, що включає послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, що включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, що включає послідовність SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3, що включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

3. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що включає послідовність SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2, що включає послідовність SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3, що включає послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, що включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, що включає послідовність SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3, що включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

4. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 23 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

5. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, де амінокислотний залишок глутаміну 24 (Gln; Q) з послідовністю SEQ ID NO: 15 є аргініном (Arg; R) або лізином (Lys; K) та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

6. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13, або 17, або 21, або 25, та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45.

Переважно, щоб антитіло зв'язувалось з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 та His147 з послідовністю SEQ. ID NO: 51.

Цей спосіб призначений для лікування синдрому Нетертона та/або atopічного дерматиту.

В іншому варіанті пропонується антитіло, яке зв'язується з KLK5, або фармацевтична композиція, що містить антитіло, яке призначене для лікування синдрому Нетертона, atopічного дерматиту, іхтіозу, розацеа, астми або раку, такого як рак яєчників або сечового міхура або комбінації цих захворювань. При цьому антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому, варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що включає послідовність SEQ ID NO: 62, ділянку CDR-L2, що включає послідовність SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3, що включає послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

3. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

4. варіабельний легкий ланцюг, що містить ділянку SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 2 та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

5. варіабельний легкий ланцюг, що містить ділянку SEQ ID NO: 15, де амінокислотний залишок глутаміну 24 (Gln; Q) у послідовності SEQ ID NO: 15 є аргініном (Arg; R) або лізином (Lys; K) та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

6. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13, або 17, або 21, або 25 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45.

Переважно, антитіло зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 та His147 з послідовністю SEQ. ID NO: 51.

Більш переважно, щоб антитіло використовувалось для лікування синдрому Нетертона та/або atopічного дерматиту.

В іншому переважному варіанті даний винахід пропонує спосіб лікування синдрому Нетертона, atopічного дерматиту, іхтіозу, розацеа, астми або раку, наприклад раку яєчників або раку сечового міхура, або їх комбінації у пацієнта, шляхом введення зазначеному пацієнту терапевтично ефективної кількості антитіла, що зв'язується з KLK5, або фармацевтичної композиції, що містить антитіло. При цьому, антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, що включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, що включає послідовність SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3, що включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 39; або

3. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 17 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 41

Переважно, щоб антитіло зв'язувалось з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ. ID NO: 51.

Бажано використовувати метод лікування синдрому Нетертона та/або atopічного дерматиту.

В іншому переважному варіанті антитіло, яке зв'язується з KLK5, або фармацевтична композиція, що містить антитіло, призначена для лікування синдрому Нетертона, atopічного дерматиту, іхтіозу, розацеа, астми або раку, наприклад раку яєчників або раку сечового міхура, або комбінації цих захворювань. При цьому антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що включає послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, що включає послідовність SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, що включає послідовність SEQ ID NO: 3 та варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, що включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, що включає послідовність SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3, що включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 39; або

3. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 17, та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 41.

Переважно, щоб антитіло зв'язувалось з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 та His147 з послідовністю SEQ. ID NO: 51.

Більш переважно, щоб антитіло використовувалось для лікування синдрому Нетертона та/або atopічного дерматиту.

Даний винахід також передбачає використання антитіла, яке зв'язується з KLK5, або фармацевтичної композиції, що містить антитіло, де антитіло призначене для лікування синдрому Нетертона, atopічного дерматиту, іхтіозу, розацеа, астми або раку, такого як рак яєчників або рак сечового міхура, або їх комбінації, де антитіло зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 та His147 у послідовності SEQ ID NO: 51.

Даний винахід також передбачає метод лікування синдрому Нетертона, atopічного дерматиту, іхтіозу, розацеа, астми або раку, такого як рак яєчників або рак сечового міхура, або їх комбінації у пацієнта, що включає введення зазначеному пацієнту терапевтично ефективної кількості антитіла, яке зв'язує KLK5, або фармацевтичної композиції, що містить антитіло, де антитіло зв'язується з епітопом людського KLK5, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 у послідовності SEQ ID NO: 51

Даний винахід також передбачає застосування антитіла, яке зв'язується з KLK5, де антитіло зв'язується з епітопом людського KLK5, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51 або фармацевтичної композиції, що містить антитіло, для виробництва лікарського засобу з метою лікування одного або кількох захворювань, що характеризуються порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5, коли таке порушення регуляції переважно обумовлено синдромом Нетертона, atopічним дерматитом, іхтіозом, розацеа, астмою або раком, таким як рак яєчників або рак сечового міхура, або комбінацією цих захворювань, переважно синдрому Нетертона та/або atopічного дерматиту.

Зокрема, винахід також передбачає використання антитіла, яке зв'язується з KLK5, де антитіло переважно зв'язується з епітопом KLK5 людини, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51 або фармацевтичної композиції, що містить антитіло, для виробництва лікарського засобу з метою лікування

одного або кількох захворювань, що характеризуються порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5, де таке порушення регуляції переважно обумовлене синдромом Нетертона, atopічним дерматитом, іхтіозом, розацеа, астмою або раком, таким як рак яєчників або рак сечового міхура, або комбінацією цих захворювань, більш переважно синдромом Нетертона та/або atopічним дерматитом. При цьому антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, включаючи послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, включаючи послідовність SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3, включаючи послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, що включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, що включає послідовність SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3, що включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що включає послідовність SEQ ID NO: 62, ділянку CDR-L2, що включає послідовність SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, що включає послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, яка включає SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, яка включає SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3, яка включає SEQ ID NO: 6; або

3. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 3 та варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

4. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 23 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

5. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, де амінокислотний залишок глутаміну 24 (Gln; Q) у послідовності SEQ ID NO: 15 є аргініном (Arg; R) або лізином (Lys; K) та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

6. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13, або 17, або 21, або 25, та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45.

Даний винахід також передбачає використання антитіла, яке зв'язується з KLK5, де антитіло зв'язується з епітопом людського KLK5, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 з послідовністю SEQ ID NO: 51 у якості діагностично ефективних агентів або у діагностичних аналізах, наприклад, для діагностики синдрому Нетертона, atopічного дерматиту, іхтіозу, розацеа, астми або раку, такого як рак яєчників або рак сечового міхура.

Більш переважно, щоб антитіло містило:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3 та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 62, ділянку CDR-L2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

3. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

4. варіабельний легкий ланцюг, що містить SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 23 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

5. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, де амінокислотний залишок глутаміну 24 (Gln; Q) у послідовності SEQ ID NO: 15 є аргініном (Arg; R) або лізином (Lys; K) та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

6. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13, або 17, або 21, або 25 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45.

Діагноз краще ставити на біологічних зразках. "Біологічний зразок" охоплює різноманітні типи зразків, отриманих від особи, які можуть використовуватися в діагностичному або контрольному аналізі. Зразками є кров, така як плазма та сироватка, та інші рідкі зразки біологічного походження, такі як сеча та слина, цереброспінальна рідина, зразки твердої тканини, такі як біоптати, біопсії шкіри або культури тканин або отримані з них клітини та їхнє потомство. Визначення також проводиться з використанням зразків, з якими здійснювались будь-які маніпуляції після отримання, наприклад, обробка реагентами, солюбілізація або збагачення певними компонентами, такими як полінуклеотиди.

Діагностичне тестування переважно можна проводити на біологічних зразках, які не контактують з тілом людини чи тварини. Таке діагностичне тестування також називають тестуванням *in vitro*. Під час діагностичного тестування *in vitro* використовується метод виявлення KLK5 у біологічному зразку *in vitro*, взятий у особи. Таке тестування включає наступні етапи: i) контактування біологічного зразка з антитілом, що описане у цьому документі; і ii) виявлення зв'язування антитіла з KLK5. Шляхом порівняння виявленого рівня KLK5 або наявності

специфічної посттрансляційно модифікованої форми KLK5 (включаючи будь-яку проформу) з відповідним контролем можна ідентифікувати одне або більше захворювань, що характеризуються порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5. Таким чином, такий метод виявлення може використовуватись для визначення того, чи має суб'єкт (включаючи ембріон або плід) захворювання, що характеризуються порушенням регуляції KLK5 чи порушенням регуляції інгібування KLK5, або наявність ризику розвитку таких захворювань.

Отже, даний винахід передбачає використання антитіла, яке зв'язується з KLK5, де антитіло переважно зв'язується з епітопом людського KLK5, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 у послідовності SEQ ID NO: 51, де антитіло призначене для діагностики одного або кількох захворювань, що характеризуються порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5, для діагностики синдрому Нетертона, atopічного дерматиту, іхтіозу, розацеа, астми або раку, наприклад раку яєчників або раку сечового міхура. При цьому антитіло містить:

1. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 3 та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

2. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 62, ділянку CDR-L2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 3, а варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

3. варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг. При цьому варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, яка включає послідовність SEQ ID NO: та варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 5, та ділянку CDR-H3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 6; або

4. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 23 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

5. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 15, де амінокислотний залишок глутаміну 24 (Gln; Q) у послідовності SEQ ID NO: 15 є аргініном (Arg; R) або лізином (Lys; K) та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43; або

6. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13, або 17, або 21, або 2 та важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29, або 33, або 37, або 41, або 45.

Отже, даний винахід включає наступні варіанти втілення:

Варіант 1: антитіло, яке зв'язується з калікреїном 5 (KLK5), де антитіло містить варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг, і де:

a. варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1 з послідовністю SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 62 або SEQ ID NO: 63, ділянку CDR-L2 з послідовністю SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3; і

b. варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, що містить послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO: 6.

Варіант 2: Антитіло, визначене у варіанті 1:

a. варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що включає послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, що включає послідовність SEQ ID NO: 2, та ділянку CDR-L3, що включає послідовність SEQ ID NO: 3; і

b. варіабельний важкий ланцюг містить ділянку CDR-H1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 6.

Варіант 3: антитіло, яке зв'язується з калікреїном 5 (KLK5), де антитіло зв'язується з епітопом людського KLK5, що містить амінокислотні залишки Arg87, Ala107, Arg110, Lys111, Lys112, Val113, Val137, Lys138, Ser139, Ile140, Pro141, His142, Pro143, Tyr145, Ser146 і His147 у послідовності SEQ ID NO: 51.

Варіант 4: антитіло згідно з варіантом 3, де епітоп характеризують за допомогою рентгенівської кристаллографії.

Варіант 5: антитіло за будь-яким з варіантів 1-4, де антитіло інгібує або знижує активність протеази KLK5.

Варіант 6: антитіло за будь-яким з варіантів 1-5, де антитіло зв'язується з KLK5, коли KLK5 зв'язаний з LEKTI, або фрагментом LEKTI.

Варіант 7: антитіло за будь-яким з варіантів 1-6, де антитіло не конкурує з LEKTI або фрагментом LEKTI за зв'язування з KLK5.

Варіант 8: антитіло за будь-яким з варіантів 1-7, де антитіло утворює комплекс із KLK5, зв'язаний з LEKTI, або фрагментом LEKTI.

Варіант 9: Антитіло за будь-яким з варіантів 6-8, де фрагмент LEKTI є доменом 5 LEKTI людини, що містить амінокислоти 1-64 у послідовності SEQ ID NO: 54, або доменом LEKTI 8, що містить амінокислоти 1-71 у послідовності SEQ ID NO: 61.

Варіант 10: Антитіло за будь-яким із попередніх варіантів, де антитіло зв'язується з KLK5 людини, переважно KLK5 людини, що містить послідовності SEQ ID NO: 53, та KLK5 макаки, переважно KLK5 яванської макаки, що містить послідовність SEQ ID NO: 60.

Варіант 11: антитіло згідно з будь-яким із попередніх варіантів, де антитіло не зв'язується з калікреїном 2 людини або яванської макаки 2 (KLK2) або калікреїном 4 людини або яванської макаки (KLK4); або калікреїном 7 людини чи яванської макаки (KLK7).

Варіант 12: антитіло за будь-яким із варіантів 3-11, де антитіло містить варіабельний легкий ланцюг та варіабельний важкий ланцюг, і де:

a. варіабельний легкий ланцюг містить ділянку CDR-L1, що включає послідовність SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 62 або SEQ ID NO: 63, переважно ділянку CDR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO: 1, ділянку CDR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO: 2 та ділянку CDR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO: 3; та

b. варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1, яка містить послідовність SEQ ID NO: 4, ділянку CDR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO: 5 та ділянку CDR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO: 6.

Варіант 13: антитіло за будь-яким із попередніх варіантів, де антитіло є химерним або гуманізованим.

Варіант 14: антитіло за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, де антитіло є повнорозмірним антитілом.

Варіант 15: антитіло за варіантом 13, де повнорозмірне антитіло вибрано з IgG1, IgG4 або IgG4P.

Варіант 16: антитіло за будь-яким із варіантів 1-13, де антитіло вибрано з Fab, Fab', F(ab')₂, одноланцюгового варіабельного фрагменту (scFv), однокласового антитіла (dAb) або антитіл, що містять важкі ланцюги (V_H).

Варіант 17: антитіло за будь-яким із варіантів втілення 1-16, де антитіло містить:

a. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 7 або 11 або 15 або 19 або 23; та/або

b. варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 9 або 27 або 31 або 35 або 39 або 43.

Варіант 18: антитіло згідно з будь-яким з варіантів 1-15 або 17, де антитіло містить:

a. легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 13 або 17 або 21 або 25; та

b. важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 29 або 33 або 37 або 41 або 45.

Варіант 19: антитіло згідно з варіантом 17 або 18, де амінокислотний залишок глутаміну (Gln; Q) у ділянці L-CDR1 у положенні 24 у послідовності SEQ ID NO: 15 або 17 замінено на аргінін (Arg; R) або на лізин (Lys; K).

Варіант 20: Антитіло згідно з будь-яким із попередніх варіантів, де KLK5 є KLK5 людини, що містить послідовність SEQ ID NO: 51, або 52, або 53, або KLK5 яванської макаки, що містить послідовність SEQ ID NO: 60.

Варіант 21: антитіло згідно з будь-яким із попередніх варіантів здійснення, де антитіло утворює комплекс із KLK5, переважно людським KLK5, зв'язаним з іншим антитілом, яке містить:

a. варіабельний легкий ланцюг, що містить ділянку CDR-L1, яка має послідовність SEQ ID NO: 68, ділянку CDR-L2, яка містить послідовність SEQ ID NO: та ділянку CDR-L3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 70 та варіабельний важкий ланцюг, що містить ділянку CDR-H1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 71, ділянку CDR-H2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 72, та ділянку CDR-H3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 73; та/або

b. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 74 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 76; та/або

c. варіабельний легкий ланцюг, який кодується нуклеотидом, що містить послідовність SEQ ID NO: 75 та варіабельний важкий ланцюг, який кодується нуклеотидом, що містить послідовність SEQ ID NO: 77.

Варіант 22: антитіло, що зв'язується з KLK5, переважно KLK5 людини, де антитіло містить:

a. варіабельний легкий ланцюг, що містить ділянку CDR-L1, яка включає послідовність SEQ ID NO: 68, ділянку CDR-L2, яка включає послідовність SEQ ID NO: 69 та ділянку CDR-L3, яка включає послідовність SEQ ID NO: 70 та варіабельний важкий ланцюг, який містить ділянку CDR-H1, що включає послідовність SEQ ID NO: 71, ділянку CDR-H2, що включає послідовність SEQ ID NO: 7 та ділянку CDR-H3, що включає послідовність SEQ ID NO: 73; та/або

b. варіабельний легкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 74 та варіабельний важкий ланцюг, що містить послідовність SEQ ID NO: 76; та/або

c. варіабельний легкий ланцюг, який кодується нуклеотидом, що містить послідовність SEQ ID NO: 75 та варіабельний важкий ланцюг, який кодується нуклеотидом, що містить послідовність SEQ ID NO: 77.

Варіант 23: комплекс KLK5-антитіло, що містить:

a. KLK5, переважно людського KLK5

b. антитіло згідно з будь-яким із варіантів 1-18 і

c. антитіло згідно з варіантом 19 або 20.

Варіант 24: антитіло, яке:

a. конкурує за зв'язування KLK5 з антитілом згідно з будь-яким із варіантів 1-20; та/або

b. перехресно блокує антитіло згідно з будь-яким із варіантів 1-20 для зв'язування KLK5; та/або

c. зв'язує KLK5 з тим самим епітопом, що й антитіло згідно з будь-яким із варіантів від 1 до 20; та/або

d. містить варіабельну область важкого ланцюга, що принаймні на 90 % ідентична або подібна до послідовності SEQ ID NO: 29 або 33 або 37 або 41 або 45; та/або

e. містить варіабельну область легкого ланцюга, що принаймні на 90 % ідентична або подібна до послідовності SEQ ID NO: 13 або 17 або 21 або 25.

Варіант 25: ізольований поліпептид, що кодує антитіло за будь-яким з варіантів 1-20.

Варіант 26: ізольований поліпептид за варіантом 25, де поліпептид кодує:

a. варіабельну область легкого ланцюга, де поліпептид:

i. принаймні на 90 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 8 (або нуклеотидам 1-330 у послідовності SEQ ID NO: 8), або 12 (або нуклеотидам з 1-330 у послідовності SEQ ID NO: 12), або 16, або 20, або 24, або 64, або 66; або

ii. містить послідовність SEQ ID NO: 8 (або нуклеотиди 1-330 у послідовності SEQ ID NO: 8), або 12 (або нуклеотиди 1-330 у послідовності SEQ ID NO: 12), або 16, або 20, або 24, або 64, або 66; або

iii. складається в основному з послідовності SEQ ID NO: 8 (або нуклеотидів 1-330 у послідовності SEQ ID NO: 8), або 12 (або нуклеотидів 1-330 у послідовності SEQ ID NO: 12), або 16, або 20, або 24, або 64, або 66; або

b. варіабельну область важкого ланцюга, де полінуклеотид:

i. щонайменше на 90 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 10, або 28, або 32, або 36, або 40, або 44; або

ii. містить послідовність SEQ ID NO: 10 або 28 або 32 або 36 або 40 або 44; або

iii. складається по суті з послідовності SEQ ID NO: 10 або 28 або 32 або 36 або 40 або 44; або

c. легкий ланцюг, де полінуклеотид:

i. щонайменше на 90 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 14 або 18 або 22 або 26 або 65 або 67 або 100 або 101 або 102 або 103 або 104; або

ii. містить послідовність SEQ ID NO: 14 або 18 або 22 або 26 або 65 або 67 або 100 або 101 або 102 або 103 або 104; або

iii. складається в основному з послідовності SEQ ID NO: 14 або 18 або 22 або 26 або 65 або 67 або 100 або 101 або 102 або 103 або 104; або

d. важкий ланцюг, де полінуклеотид:

i. щонайменше на 90 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 30, або 34, або 38, або 42, або 46; або

ii. містить послідовність SEQ ID NO: 30, або 34, або 38, або 42, або 46; або

iii. складається в основному з послідовності SEQ ID NO: 30 або 34 або 38 або 42 або 46.

Варіант 27: Вектор для клонування або експресії, що містить один або більше полінуклеотидів за варіантом 25 або 26.

Варіант 28: клітина-господар, що містить:

a. один або більше полінуклеотидів згідно за варіантом 25 або 26 чи

b. один або більше векторів експресії за варіантом 27.

Варіант 29: Процес виробництва антитіла за варіантами 1-20, що включає культивування клітини-хазяїна згідно з варіантом 28 у відповідних умовах для виробництва антитіла та виділення антитіла, виробленого клітиною-хазяїном.

Варіант 30: Фармацевтична композиція, що містить антитіло згідно з будь-яким із варіантів 1-20 та один або більше фармацевтично прийнятних носіїв, наповнювачів або розріджувачів.

Варіант 31: антитіло або його антиген-зв'язуючи фрагмент згідно з будь-яким із варіантів 1-20 або фармацевтична композиція за варіантом 30 для використання в терапії.

Варіант 32: антитіло згідно за будь-яким з варіантів 1-20 або фармацевтична композиція за варіантом 30 для застосування в лікуванні захворювання, що характеризується порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5.

Варіант 33: антитіло для застосування за варіантом 32, де захворювання включає синдром Нетертона, atopічний дерматит, іхтіоз, розацеа, астму або рак, наприклад рак яєчників або рак сечового міхура або комбінацію цих захворювань.

Варіант 34: антитіло, що застосовується за варіантом 33, де захворювання є синдром Нетертона.

Варіант 35: антитіло, що застосовується за варіантом 33, де захворювання є atopічний дерматит.

Варіант 36: Спосіб лікування захворювань, що характеризується порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5 у пацієнта, що включає введення зазначеному пацієнту терапевтично ефективного кількості антитіла згідно за будь-яким з варіантів 1-20 або фармацевтичної композиції відповідно за варіантом 30.

Варіант 37: Спосіб за варіантом 34, де захворювання представлено синдромом Нетертона, atopічним дерматитом, іхтіозом, розацеа, астмою або раком, таким як рак яєчників або рак сечового міхура.

Варіант 38: Антитіло, призначене для використання за варіантом 35, де захворювання є синдром Нетертона.

Варіант 39: антитіло, призначене для застосування за варіантом 35, де захворювання є atopічний дерматит.

Варіант 40: антитіло за будь-яким із варіантів 1-20 або фармацевтична композиція за варіантом 30 для виробництва лікарського засобу для лікування одного або кількох захворювань, що характеризуються порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5.

Варіант 41: антитіло для виготовлення за варіантом 40, де хвороба включає синдром Нетертона, atopічний дерматит, іхтіоз, розацеа, астму або рак, наприклад рак яєчників або рак сечового міхура або комбінації цих захворювань.

Варіант 42: антитіло для виготовлення за варіантом 40, де захворювання включає синдром Нетертона або atopічний дерматит або комбінації цих захворювань.

Варіант 43: Антитіло за будь-яким із варіантів 1-20 для використання у якості діагностичного агента або для використання в діагностичному аналізі чи комплексі для діагностики одного або кількох захворювань, що характеризуються порушенням регуляції KLK5 або порушенням регуляції інгібування KLK5.

Варіант 44: антитіло згідно з варіантом 43, де захворювання вибрано із синдрому Нетертона, atopічного дерматиту, іхтіозу, розацеа, астми або раку, наприклад раку яєчників або раку сечового міхура або їх комбінації.

Послідовності, включені в даний винахід, наведені в таблиці 1:

Таблиця 1

Назва	Ідентифікаційний номер послідовності:	Послідовність
Ділянка CDR-L1	1	QASQSISSWLA
Ділянка CDR-L2	2	LASTLAS
Ділянка CDR-L3	3	QQGYTNSNIINT

Ділянка CDR-H1	4	GFPLSNYAMS
Ділянка CDR-H2	5	DIYPSDIIDYASWAKG
Ділянка CDR-H3	6	DNNDYGLDI
Варіабельний легкий ланцюг кролячого антитіла	7	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISSWLAWYQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISGVECADAAITYYCQQGYTNSNIINTFGGGTEVVVK
Нуклеотид варіабельного легкого ланцюга кролика	8	gcctatgatatgaccagactccagcctctgtggaggtagctgtggaggcacagtcaccatcaagtgccaggccagtcagagcattagcagttggtagcctggtagcagcagaacacaggtcagcctccaagctctgactatctggcatccactctggcatctggggtctcatcgcggttcaaaggcagctggatctgggacacagttcactctcaccatcagcggcgtggagctgtgccgatctgccacttactactgtcaacagggttatactaataagtaataattattaatacttctggcggaggggaccgaggtgtggtcaaacgtacg
Важкий ланцюг кролика	9	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFPLSNYAMSWVRQAPGKGLEWIGDIYPSDIIDYASWAKGRFTISQTSTTVELKITGPTTEDTATYFCARDNNDYGLDIWGPGLTVSS
Нуклеотид варіабельного важкого ланцюга кролика	10	cagtcggtggaggagtcggggggtgcctgggtcacgcctgggacacccctgacactcacctgcacccgtctctgggtccccctcagtaattatgcaatgagctgggtccgcagggtccagggaaggggcggaatggatcgagacattatcctagtgatatcatagactacgcgagctgggcgaaaggccgattaccatctccaaacctgcaccagctgggagctgaaaatcacgggtccgacaaccgaggacacggccacctatttctgtgccagagacaacaatgactatggctctggacatctggggcccaggcacccctgtgcacgtctcgagt
Варіабельний легкий ланцюг 10236 gL5	11	AYDMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFKSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYTNSNIINTFGGGTKVEIK
Нуклеотид варіабельного легкого ланцюга 10236 gL5.	12	gcctacgacatgactcagtcctccatcctcctgtccgcatccgtgggggatagagtcacatcacctgtcaagccagccagtcgaattagctcgtggctggcctggtagcagagaagccgggaaaggctcccaagttgctgatctacctggcctcaacgctcgcgtcgggagtgctagccgctttaagggttccggatctggcaccgacttcactctcaccatttcgagcctcaaccggaggacttcgccacttactactgccagcagggttacaccaactccaacatcatcaacaccttcggcggaggggaccaaaagtggaaatcaagcgtacg
Легкий ланцюг 10236 gL5	13	AYDMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFKSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYTNSNIINTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Нуклеотид легкого ланцюга 10236 gL5	14	gcctacgacatgactcagtcctccatcctcctgtccgcatccgtgggggatagagtcacatcacctgtcaagccagccagtcgaattagctcgtggctggcctggtagcagcagaagccgggaaaggctcccaagttgctgatctacctggcctcaacgctcgcgtcgggagtgctagccgctttaagggttccggatctggcaccgacttcactctcaccatttcgagcctcaaccggaggacttcgccacttactactgccagcagggttacaccaactccaacatcatcaacaccttcggcggaggggaccaaaagtggaaatcaagcgtacgcgtacggtggcgcgtccctcctgtttcatcttccaccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgcctcgtgtgctgtgaacaactctaccctccgagggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtcgggcaactccagggaatccgtcaccgagcaggactccaaggacagcacctactcctgtctccaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggtcgtccagcccgtgaccaagtccttcaaccggggcagtg
Варіабельний легкий ланцюг 10236 gL6	15	AYDMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYTNSNIINTFGGGTKVEIK
Нуклеотид варіабельного легкого ланцюга 10236 gL6	16	gcctacgacatgactcagtcctccatcctcctgtccgcatccgtgggggatagagtcacatcacctgtcaagccagccagtcgaattagctcgtggctggcctggtagcagcagaagccgggaaaggctcccaagttgctgatctacctggcctcaacgctcgcgtcgggagtgctagccgcttttccggttccggatctggcaccgacttcactctcaccatttcgagcctcaaccggaggacttcgccacttactactgccagcagggttacaccaactccaacatcatcaacaccttcggcggaggggaccaaaagtggaaatcaag
Легкий ланцюг 10236 gL6	17	AYDMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYTNSNIINTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Нуклеотид легкого ланцюга 10236 gL6	18	gcctacgacatgactcagtcctccatcctcctgtccgcatccgtgggggatagagtcacatcacctgtcaagccagccagtcgaattagctcgtggctggcctggtagcagcagaagccgggaaaggctcccaagttgctgatctacctggcctcaacgctcgcgtcgggagtgctagccgcttttccggttccggatctggcaccgacttcactctcaccatttcgagcctcaaccggaggacttcgccacttactactgccagcagggttacaccaactccaacatcatcaacaccttcggcggaggggaccaaaagtggaaatcaagcgtacggtggcgcgtccctcctgtttcatcttccacctccgacgagcagctgaatccggaccacctccatctgtatgactctgaacaacttctaccctccagagccaaagt

		cagtggaaaggtggacaacgccttcagtcggcaactcccaggaatccgtcaccgagcagg actccaaggacagcacctactcctgtcctccaccctgaccctgtccaaggccgactacgaga agcacaagggtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggtcctgtccagccccgtgaccaagtc cttcaaccggggcgagtg
Варіабельний легкий ланцюг 10236 gL7	19	AIDMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSISSWLAWYQQKPGKAPKL LIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQGYT NSNIINTFGGGTKVEIK
Нуклеотид варіабельного легкого ланцюга 10236 gL7	20	gcgatcgacatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtccgtgggagatcgctgactatc acgtgtcaggcctcacaatccattagctcctggctggcctgtgtaccagcagaagccaggga ggctccgaagctgctgatctacctggcctccaccctgtcccggtgccttcacgggtttctgga tccggctcgggaaccgacttcacccctaccatctcgtcgtccaaccggaggacttcgaaacct actactgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaacaccttcggtggcggaactaag gtcgaaatcaag
Легкий ланцюг 10236 gL7	21	AIDMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSISSWLAWYQQKPGKAPKL LIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQGYT NSNIINTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Нуклеотид легкого ланцюга 10236 gL7	22	gcgatcgacatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtccgtgggagatcgctgactatc acgtgtcaggcctcacaatccattagctcctggctggcctgtgtaccagcagaagccaggga ggctccgaagctgctgatctacctggcctccaccctgtcccggtgccttcacgggtttctgga tccggctcgggaaccgacttcacccctaccatctcgtcgtccaaccggaggacttcgaaacct actactgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaacaccttcggtggcggaactaag gtcgaaatcaaggtggcctcctcctcctgtgtcatctccaccctccgacgagcagctgaagt ccggcaccgcctccgctgctgtgctgctgaacaactctacccccgcgagggccaaggtgcagt ggaaaggtggacaacgccttcagtcgggcaactcccaggaatccgtaccgagcaggactc caaggacagcacctactcctgtcctccaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagc acaaggtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggtcctgacccccgtgaccaagtccttc aaccggggcgagtg
Варіабельний легкий ланцюг 10236 gL8	23	AYQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSISSWLAWYQQKPGKAPK LLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQGY TNSNIINTFGGGTKVEIK
Нуклеотид легкого варіабельного ланцюга 10236 gL8	24	gcgatcagatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtccgtgggagatcgctgactatca cgtgtcaggcctcacaatccattagctcctggctggcctgtgtaccagcagaagccaggga gctccgaagctgctgatctacctggcctccaccctgtcccggtgccttcacgggtttctgga ccggctcgggaaccgacttcacccctaccatctcgtcgtccaaccggaggacttcgaaacct actactgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaacaccttcggtggcggaactaag gtcgaaatcaag
Легкий ланцюг 10236 gL8	25	AYQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSISSWLAWYQQKPGKAPK LLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQGY TNSNIINTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Нуклеотид легкого ланцюга 10236 gL8	26	gcgatcagatgactcagagcccgtccagcctgtccgcgtccgtgggagatcgctgactatca cgtgtcaggcctcacaatccattagctcctggctggcctgtgtaccagcagaagccaggga gctccgaagctgctgatctacctggcctccaccctgtcccggtgccttcacgggtttctgga ccggctcgggaaccgacttcacccctaccatctcgtcgtccaaccggaggacttcgaaacct actactgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaacaccttcggtggcggaactaag gtcgaaatcaaggtggcctcctcctcctgtgtcatctccaccctccgacgagcagctgaagt ccggcaccgcctccgtcgtgtgctgctgaacaactctacccccgcgagggccaaggtgcagt ggaaaggtggacaacgccttcagtcgggcaactcccaggaatccgtaccgagcaggactc caaggacagcacctactcctgtcctccaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagc acaaggtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggtcctgacccccgtgaccaagtccttc aaccggggcgagtg
Варіабельний важкий ланцюг 10236 gH9	27	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPGKGL EWIGDIYPSDIIYASWAKGRVTISQDSSKTQVSLKLSSVTAADTAV YYCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSS
Нуклеотид важкого варіабельного ланцюга 10236 gH9	28	gaagtgcagctgcaagagtcaggaccgggctgtgtaagcccagcggaaccctgtccctga ctgtgctgctgggttcccgctgtcgaactacgcgatgtcctgggtcagacagcctccggga aagggtctgaatgatcggtgacatctaccaagcgacattattgattacgcatcctgggcca agggacgcgtgacatctccaccagactctccaagaccgaagtgcctcctcaagctgtccagc tgaccgtcggacactgcctgtactattgcgcgggataacaacgactacgggtcggac atctggggccagggtaccctcgtgactgtctcgagc
Важкий ланцюг 10236 gH9	29	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPGKGL EWIGDIYPSDIIYASWAKGRVTISQDSSKTQVSLKLSSVTAADTAV

		YYCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
Нуклеотид важкого ланцюга 10236 gH9	30	gaagtcagctgcaagagtcaggaccgggcttggtcaagcccagcggaaccctgtccctga cttggtccgtgtcgggttcccgtgtcgaactacgcgatgtcctgggtcagacagcctcccga aaggccctgaatggatcggcgacatctaccaagcgacattattgattacgcatctctggcca agggacgcgtgacctctcccaggactctccaagacccaagtgctcctcaagctgtccagcg tgaccgtgtccgacactgcccgtgtactattgcgcgggataacaacgactacgggctggac atctggggccaggggtaccctcgtgactgtctcgagcgcttctacaaaggccctcctgttccc tctggcccctgtctccgggtccacctccgagctaccgcccgtctgggctgctgtgtaaggact actccccgagcccggtgacagtgctctggaactctggcgccctgacctccggcggtgcacacct ccctgcggtgtgcagctcctccggcctgtactcctgtcctcctgctgacacctgtccctcctcag ctgtggccaccaagacactacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacacgaaggtggac aagcgggtggaatctaagtagcggccctcctgccccccctgcccctgacctgaatttctggcg gaccttccgtgttctgttcccccaaaagcccaaggacacctgatgatctccgggacccccga agtgacctgctgtgtgtgtgacgtgtcccaggaagatcccagggtccagttcaattggtacgtg gacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccagagaggaacagttcaactccacc taccgggtgtgtcctgtgtgacgtgtgcaccaggactggctgaacggcgaagagtacaa gtgaaggtgtccaacaaggcctgcccctcagcatcgaaaagaccatctccaaggccaag ggccagccccgcgagcccaggtgtacacctgccccctagccaggaagagatgtacaaag aaccaggtgtccctgacctgtctgtcaagggtcttacctcccgacttgccgtggaatggga gtccaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgtgtgacagcgacgg ctcttctctgtactctcggtgacctgtgacaagtccgggtggcaggaaggaacgtcttctc ctgtccgtgtgacgagggccctgcacaacctacaccagaagtcctgtctcctgagcct gggcaag
Варіабельний важкий ланцюг 10236 gH10	31	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPGKGL EWIGDIYPSDIIDYASWAKGRVTISVDSSKTQVSLKLSSVTAADTAVY YCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSS
Нуклеотид важкого варіабельного ланцюга 10236 gH10	32	gaagtcagctgcaagagtcaggaccgggcttggtcaagcccagcggaaccctgtccctga cttggtccgtgtcgggttcccgtgtcgaactacgcgatgtcctgggtcagacagcctcccga aaggccctgaatggatcggcgacatctaccaagcgacattattgattacgcatctctggcca agggacgcgtgacctctccgtgactctccaagacccaagtgctcctcaagctgtccagcg gaccgctgcccagactgcccgtgtactattgcgcgggataacaacgactacgggctggaca tctggggccagggtacctcgtgactgtctcgagcgttctacaaaggccctcctgttccct ctggcccctgtctccgggtccacctccgagctaccgcccgtctgggctgctgtgtaaggacta cttccccgagccgtgacagtgctctggaacttggcgccctgacctccggcggtgcacacctc cctgcccgtgtgcagtcctcggcctgtactcctgtcctcctgctgacctgtccctcctcagc ctgggccaagacactacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggaca agcgggtggaatctaagtagcggccctcctgccccccctgcccctgacctgaatttctggcg accttccgtgttctgttcccccaaaagcccaaggacacctgatgatctccgggacccccga gtgacctgctgtgtgtgtgacgtgtcccaggaagatcccagggtccagttcaattggtacgtg acggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccagagaggaacagttcaactccacct accgggtgtgtcctgtgacctgtgtgcaccaggactggctgaacggcgaagagtacaag tgcaaggtgtccaacaaggcctgcccctcagcatcgaaaagaccatctccaaggccaagg gccagccccgcgagcccaggtgtacacctgccccctagccaggaagagatgaccaaga accaggtgtccctgacctgtgtgtcaagggtcttacctcccgacttgccgtggaatgggag tccaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgtgtgacagcgacggct
Важкий ланцюг 10236 gH10	33	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPGKGL EWIGDIYPSDIIDYASWAKGRVTISVDSSKTQVSLKLSSVTAADTAVY YCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
Нуклеотид важкого ланцюга 10236 gH10	34	gaagtcagctgcaagagtcaggaccgggcttggtcaagcccagcggaaccctgtccctga cttggtccgtgtcgggttcccgtgtcgaactacgcgatgtcctgggtcagacagcctcccga aaggccctgaatggatcggcgacatctaccaagcgacattattgattacgcatctctggcca agggacgcgtgacctctccgtgactctccaagacccaagtgctcctcaagctgtccagcg gaccgctgcccagactgcccgtgtactattgcgcgggataacaacgactacgggctggaca tctggggccagggtacctcgtgactgtctcgagcgttctacaaaggccctcctgttccct ctggcccctgtctccgggtccacctccgagctaccgcccgtctgggctgctgtgtaaggacta cttccccgagccgtgacagtgctctggaacttggcgccctgacctccggcggtgcacacctc cctgcccgtgtgcagtcctcggcctgtactcctgtcctcctgctgacctgtccctcctcagc ctgggccaagacactacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggaca agcgggtggaatctaagtagcggccctcctgccccccctgcccctgacctgaatttctggcg accttccgtgttctgttcccccaaaagcccaaggacacctgatgatctccgggacccccga gtgacctgctgtgtgtgtgacgtgtcccaggaagatcccagggtccagttcaattggtacgtg acggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccagagaggaacagttcaactccacct accgggtgtgtcctgtgacctgtgtgcaccaggactggctgaacggcgaagagtacaag tgcaaggtgtccaacaaggcctgcccctcagcatcgaaaagaccatctccaaggccaagg gccagccccgcgagcccaggtgtacacctgccccctagccaggaagagatgaccaaga accaggtgtccctgacctgtgtgtcaagggtcttacctcccgacttgccgtggaatgggag tccaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgtgtgacagcgacggct

		cctctctctgtactctcggtgaccgtggacaagtcccgggtggcaggaaggcaaccttctcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagcctgggcaag
Варіабельний важкий ланцюг 10236 gH11	35	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPGKGL EWIGDIYPSDIIDYASWAKGRVTISQDKSKTQVSLKLSSVTAADTAV YYCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSS
Нуклеотид варіабельного легкого ланцюга 10236 gH11	36	gaagtcgagctgcaagagtcaggaccgggcttggtcaagccagcggaacctgtccctga cttggtccgtgtcggggtcccgtgtcgaactacgcgatgtcctgggtcagacagcctcccgga aagggttggaatggatcggtgacatctaccaagcgacattattgattacgcatcctgggcca agggacgcgtgaccatctcccaggacaagtccaagaccaagtgtccctcaagctgtccagc gtgaccgtgcccagactgpkpctgtactattgcgcgaggataacaacgactacgggctgga catctggggccagggtaccctcgtgactgtctcgagc
Важкий ланцюг 10236 gH11	37	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPGKGL EWIGDIYPSDIIDYASWAKGRVTISQDKSKTQVSLKLSSVTAADTAV YYCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTITTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHREALHNYHTQKSLSLSLGK
Нуклеотид важкого ланцюга 10236 gH11	38	gaagtcgagctgcaagagtcaggaccgggcttggtcaagccagcggaacctgtccctga cttggtccgtgtcggggtcccgtgtcgaactacgcgatgtcctgggtcagacagcctcccgga aagggttggaatggatcggtgacatctaccaagcgacattattgattacgcatcctgggcca aggacgcgtgaccatctccaggacaagtccaagaccaagtgtccctcaagctgtccagc gtgaccgtgcccagactgcccgtgtactattgcgcgaggataacaacgactacgggctgga catctggggccagggtaccctcgtgactgtctcgagcgtcttacaagggtccctcctgttcc cttggtccctgtcctgggtccacctcagctaccgcccgtctgggtgctgtcgtgcaaggac tactccccgagcccgtgacagtgctctggaacttggtgcccctgacctccggctgacacatt ccctgcccgtgtcagctcctccggctgtactcctgtctccgtcgtgaccgtgccctcctccag cctgggccaagacctacacctgaactgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggac aagcgggtggaatctaagtacggccctcctgccccctgcccctgacctgaattctgggag gaccttcgtgttctgttcccccaaggccaagacacctgatgtctccggagacccccga agtgacctgctggtggtggagctgtcccaggaagatcccagggtccagttaattggtacgtg gacggcgtggaagtcacaatgccaagaccaagccagagaggaacaggtcaactccacc taccgggtgtgtcgtgctgaccgtgtgaccaggtggtgacgcaagagatataa gtgcaaggtgtccaacaagggtcctccagcatgaaaagacctctccaaggccaag ggcagccccgcgagccccaggtgtacacctgccccctagcaggaagagatgaccaag aaccaggtgtccctgacctgtctggaagggtctaccctccgacctggaatggga gtccaacggccagcccagacaactacaagaccacccccctgtgtgacagcgacgg ctccttctctgtactctgggtgaccgtggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgtctctc ctgtccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagcct gggcaag
Варіабельний важкий ланцюг 10236 gH12	39	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPGKGL EWIGDIYPSDIIDYASWAKGRVTISQDSSKNQVSLKLSSVTAADTAV YYCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSS
Нуклеотид варіабельного важкого ланцюга 10236 gH12	40	gaggtgcagcttcaggaatccggaccgggtctggtcaagccgagcggaacctgtcactgac ttgcgcgggtgtcgggtctcccctgtccaattacgcatgtcattgggtccggcaaccacctggga aagggttgagtggtggtggacatctaccgagcgacatcattgattacgctcgtgggcca gggtagagtgaccatcagccaggactcctccaagaaccaagtgtcgtgaagctcctccgt gaccgcagccgataccgtgtgtactattgtgccgcgacaacaacgactacggcctgatat ctggggacaggggaacctcgtgactgtctcgagc
Важкий ланцюг 10236 gH12	41	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPGKGL EWIGDIYPSDIIDYASWAKGRVTISQDSSKNQVSLKLSSVTAADTAV YYCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTITTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHREALHNYHTQKSLSLSLGK
Нуклеотид варіабельного важкого ланцюга 10236 gH12	42	gaggtgcagcttcaggaatccggaccgggtctggtcaagccgagcggaacctgtcactgac ttgcgcgggtgtcgggtctcccctgtccaattacgcatgtcattgggtccggcaaccacctggga aagggttgagtggtggtggacatctaccgagcgacatcattgattacgctcgtgggcca gggtagagtgaccatcagccaggactcctccaagaaccaagtgtcgtgaagctcctccgt gaccgcagccgataccgtgtgtactattgtgccgcgacaacaacgactacggcctgatat ctggggacaggggaacctcgtgactgtctcgagc

		ctggggacaggggaaccctcgtgactgtctcgagcgcttctacaagggccctcgtgtccct ctggcccttgctcccggtccacctccgagctaccgccgctctgggctgcttggtcaaggacta cttccccgagcccgtagcagtgctggaactctggccctgacctccggcgtgacaccttc cctgccgtgctgcagtcctcggcctgtactccctgtcctccgtcgtgacctgcccctccagc ctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggaca agcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccctgcccctgcccctgaatttctgggcgg acctccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatctcccgacccccgaa gtgacctgcgtggtggtggacgtgtccaggaagatcccagggtccagttaattggtacgtgg acggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccagagaggaacagttaactccacct accgggtggtgtcgtgctgacctgtctgaccaggtgctgaccaggtgctgaacggcaagagta tgcaagggttccaacaaggcctgcccctcagcatcgaaaagaccatctccaaggccaagg gccagccccgcgagccccaggtgtacacctgccccctagccaggaagagatgaccaaga accaggtgtccctgacctgtctggtcaagggtcttaccctccgacattgacctggaatgggag tccaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggct ccttctcgtactctcggctgacctgtggacaagtcccgggtggcaggaaggcaaccttctcct gtccgtgatgcagaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagcctgg gcaag
Варіабельний важкий ланцюг 10236 гН14	43	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPGKGL EWIGDIYPSDIIDYASWAKGRFTISQDSSKNQVSLKLSVTAADTAV YYCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSS
Нуклеотид варіабельного важкого ланцюга 10236 гН14	44	gaagtgcagctgcaagagtcaggaccgggcttggtcaagcccagcggaacctcgtccctga cttggtccgtgtcggggttcccgtgtcgaactacgcgatgtcctgggtcagacagctcccggga aagggccttgatggtatggcgacatctaccaagcgacattattgattacgcatctgggcca agggacgcttcaccatctcccaggactctccaagaaccaagtgtccctcaagctgtccagcgt gaccgctgcgacactgcccgtgtactattgcgcgaggataacaacgactacgggtgga tctggggccagggtacctcgtgactgtctcgagc
Важкий ланцюг 10236 гН14	45	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFPLSNYAMSWVRQPPGKGL EWIGDIYPSDIIDYASWAKGRFTISQDSSKNQVSLKLSVTAADTAV YYCARDNNDYGLDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGFTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYPGPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHREALHNYHTQKSLSLSLGK
Нуклеотид варіабельного важкого ланцюга 10236 гН14	46	gaagtgcagctgcaagagtcaggaccgggcttggtcaagcccagcggaacctcgtccctga cttggtccgtgtcggggttcccgtgtcgaactacgcgatgtcctgggtcagacagctcccggga aagggccttgatggtatggcgacatctaccaagcgacattattgattacgcatctgggcca agggacgcttcaccatctcccaggactctccaagaaccaagtgtccctcaagctgtccagcgt gaccgctgcgacactgcccgtgtactattgcgcgaggataacaacgactacgggtgga tctggggccagggtacctcgtgactgtctcgagcgttctacaagggccctcgtgtccct ctggcccttgctcccggtccacctccgagctaccgccgctctgggctgcttggtcaaggacta cttccccgagcccgtagcagtgctcctggaactctggcgcctgacctccggcgtgacaccttc cctgccgtgctgcagtcctcggcctgtactccctgtcctccgtcgtgacctgcccctccagc ctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggaca agcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccctgcccctgcccctgaatttctgggcgg accttccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatctcccgacccccgaa gtgacctgcgtggtggtggacgtgtccaggaagatcccagggtccagttaattggtacgtgg acggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccagagaggaacagttaactccacct accgggtggtgtcgtgctgacctgtctgaccaggtgctgaacggcaagagtagacaag tgcaagggttccaacaaggcctgcccctcagcatcgaaaagaccatctccaaggccaagg gccagccccgcgagccccaggtgtacacctgccccctagccaggaagagatgaccaaga accaggtgtccctgacctgtctggtcaagggtcttaccctccgacattgacctggaatgggag tccaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggct ccttctcgtactctcggctgacctgtggacaagtcccgggtggcaggaaggcaaccttctcct gtccgtgatgcagaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagcctgg gcaag
Акцепторний каркас людського гену IGKV1-6 JK4	47	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPKGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYN YPLTFGGGTKEIK
Нуклеотид акцепторного каркасу гену IGKV1-6 JK4	48	gccatcagatgaccaggtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagatcaccatca cttgccgggcaagtcaggcattagaaatgattaggtggtatcagcagaaaccagggaaa gcccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttacaagtggggtcccatcaaggttcagcgg cagtggtatctggcacagatttactctaccatcagcagcctgcagcctgaagattttgaaactt attactgtctacaagattacaattaccctctacttctggcggagggaaggtggagatcaaa
Акцепторний каркас людського	49	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPGK GLEWIGEIYHSGSTNYPNPSLKSRTISVDKSKNQFSLKLSVTAADT

гену IGHV4-4 JH4		AVYYCARYFDYWGGTLTVSS
Нуклеотид акцепторного каркасу IGHV4-4 JH4	50	cagggtgcagctgcaggagtcggggccaggactggtgaagccttcggggaccctgtccctcac ctgcgctgtctctggtggtccatcagcagtagtaactggtggagttgggtccgcccagccccag ggaaggggtggtgagtggtggtgaaatctatcatagtgaggacccaactacaacccgtcc ctcaagagtcgagtcaccatatcagtagacaagtccaagaaccagttctccctgaagctgagc tctgtgaccgccgcgacacggccgtgtattactgtgcgagatacttgactactggggccaag gaaccctggtcaccgtctcctca
Людський KLK5 (повна довжина з сигнальною послідовністю)	51	MATARPPWMWVLCALITALLGVTEHVLANNVSCDHPSTNTPVPSG SNQDLGAGAGEDARSDDSSSRIINGSDCDMHTQPWQAALLLRPNQ LYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPPVYESGQQMFQ GVKSIPHPGYSHPGHSNDLMLIKLNRIRPTKDVPRINVSSHCPASAG TKCLVSGWGTTKSPQVHFVKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDT MFCAGDKAGRDSCQGDSSGPVVCNGSLQGLVSWGDYPCARPNR PGVYTNLCKFTKWIQETIQANS
Проформа людського KLK5	52	VTEHVLANNVSCDHPSTNTPVPSGSNQDLGAGAGEDARSDDSSSRI INGSDCDMHTQPWQAALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKK VFRVRLGHYSLSPPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGHSNDLMLI KLNRIRPTKDVPRINVSSHCPASAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFVKV LQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGRDSCQGDSSGP VVCNGSLQGLVSWGDYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS
Активний людський KLK5	53	IINGSDCDMHTQPWQAALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRK KVFRVRLGHYSLSPPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGHSNDLML IKLNRIRPTKDVPRINVSSHCPASAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFVK VLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGRDSCQGDSSGP VVCNGSLQGLVSWGDYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQAN S
Людський інгібітор LEKTI D5 білка кролика	54	EIVKLCSQYQNQAKNGILFCTRENDPIRGPDGKMHGNLCSMCQAY FQAENEEKKKAEARARNLEKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDDDPEVQFTWYINNEQVTRARP PLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAIEKTI SKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWE KNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSV MHEALHNHYTQKSISRSPGK
Проформа людського KLK7	55	EEAQGDKIIDGAPCARGSHPWQVALLSGNQLHCGGVLVNERWVLT AAHCKMNEYTVHLGSDTLGDRRAQRIKASKSFRHPGYSTQTHVND LMLVKLNSQARLSSMVKKVRLPSRCEPPGTTCTVSGWGTTTSPDV TFPSDLMCVDVKLISPQDCTKVYKDLENSMLCAGIPDSKKNACNG DSGGPLVCRGTLQGLVSWGTFPCGQPNDPGVYTQVCKFTKWIND TMKKHR
Активний людський KLK7	56	IIDGAPCARGSHPWQVALLSGNQLHCGGVLVNERWVLTAAHCKMN EYTVHLGSDTLGDRRAQRIKASKSFRHPGYSTQTHVNDLMLVKLNS QARLSSMVKKVRLPSRCEPPGTTCTVSGWGTTTSPDVTFPSDLMC VDVKLISPQDCTKVYKDLENSMLCAGIPDSKKNACNGDSGGPLVC RGTLQGLVSWGTFPCGQPNDPGVYTQVCKFTKWINDTMKKHR
Проформа KLK7 яванської макаки	57	GQEAQGDKIIDGAPCTRGSHPWQVALLSGNQLHCGGVLVNERWV LTAHCKMNDYIVHLGSDTLGDRKAQRIKASRSFRHPGYSTQTHVN DLMLVKLNSPARLSSTVKKVRLPSRCEPPGTTCTVSGWGTTTSPD VTFPSDLMCVDVKLISSQDCTKVYKDMLGNSMLCAGIPNSKKNACN GDSGGPLVCRGTLQGLVSWGTFPCGQPNDPGVYTQVCKFTKWIND DTIKKHR
Активний KLK7 яванської макаки	58	IIDGAPCTRGSHPWQVALLSGNQLHCGGVLVNERWVLTAAHCKMN DYIVHLGSDTLGDRKAQRIKASRSFRHPGYSTQTHVNDLMLVKLNS PARLSSTVKKVRLPSRCEPPGTTCTVSGWGTTTSPDVTFPSDLMC VDVKLISSQDCTKVYKDMLGNSMLCAGIPNSKKNACNGDSGGPLV CRGTLQGLVSWGTFPCGQPNDPGVYTQVCKFTKWINDTIKKHR
Активний KLK5 миші	59	IVNGSDCQKDAQPWQGALLGPNKLYCGAVLISPQWLLTAAHCRK PVFRIRLGHHSMPVYESGQQMFQGIKSIPHPGYSHPGHSNDLMLI KMNRIKIRDSHSVKEIACDCATEGTRCMVSGWGTTSSSHNNFPK VLQCLNITVLSEERCKNSYPGQIDKTMFCAGDEEGRDSCQGDSSGP VVCNGKLGQGLVSWGDFPCAQRNRPVYTNLCEVFKWIKDTMNS N
Активний KLK5 яванської макаки	60	IINGSDCDEHTQPWQAALLGPNQLYCGGVLVHPQWLLTAAHCRK KVFRVRLGHYSLSPPVYESGQQMFQGIKSIPHPGYSHPGHSNDLMLI KLNRRIHSTKDVPRINVSSHCPASAGTKCLVSGWGTTTRSPQVHFVKV LQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDEAGRDSCQGDSSGP VVCNGSLQGLVSWGDYPCAKPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

Кролячий Fc-фрагмент LEKTI D8 людини	61	EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNKCAMCAS VFKLEEEEEKNDKEEKGVAEKVEKTVAPSTCSKPTCPPPELLG GPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQDDPEVQFTWYINNE QVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKAL PAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPS DISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRG DVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
CDR-L1 Q24R	62	RASQSISSWLA
CDR-L1 Q24K	63	KASQSISSWLA
нуклеотид варіабельного легкого ланцюга 10236 gL6 Q24R	64	gcgtatgacatgactcagagcccggtccagcctgtccggtccgtgggagatcgcggtgactatca cgtgtcggggcctcacaatccattagctcctggctggcctgtaccagcagaagccagggaag gctccgaagctgtgtatctacctggcctccacccttgctccggcgtgccttcacggttttctggat ccggctcgggaaccgacttcaccctcaccatctcgtcgtccaaccgaggacttcgcaacct actactgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaaccttcggtggcggaactaag gtcgaatacaag
нуклеотид легкого ланцюга 10236 gL6 Q24R	65	gcgtatgacatgactcagagcccggtccagcctgtccggtccgtgggagatcgcggtgactatca cgtgtcggggcctcacaatccattagctcctggctggcctgtaccagcagaagccagggaag gctccgaagctgtgtatctacctggcctccacccttgctccggcgtgccttcacggttttctggat ccggctcgggaaccgacttcaccctcaccatctcgtcgtccaaccgaggacttcgcaacct actactgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaaccttcggtggcggaactaag gtcgaatacaaggtggcgcctccctcctgttcatcttcccaccctccgacgagcagctgaagt ccggcaccgctcctcgtgtgtcgtgtaacaacttctaccccgagggcaaggtgcagt ggaaggtggacaacgcctgcagtcgggcaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactc caaggacagcacctactcctgtcctccaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagc acaaggtgtacgctgcgaagtgaccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagtcctc aaccggggcgagtg
нуклеотид варіабельного легкого ланцюга 10236 gL6 Q24K	66	gcgtatgacatgactcagagcccggtccagcctgtccggtccgtgggagatcgcggtgactatca cgtgtaaggcctcacaatccattagctcctggctggcctgtaccagcagaagccagggaag gctccgaagctgtgtatctacctggcctccacccttgctccggcgtgccttcacggttttctggat ccggctcgggaaccgacttcaccctcaccatctcgtcgtccaaccgaggacttcgcaacct actactgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaaccttcggtggcggaactaag gtcgaatacaag
нуклеотид варіабельного легкого ланцюга 10236 gL6 Q24K	67	gcgtatgacatgactcagagcccggtccagcctgtccggtccgtgggagatcgcggtgactatca cgtgtaaggcctcacaatccattagctcctggctggcctgtaccagcagaagccagggaag gctccgaagctgtgtatctacctggcctccacccttgctccggcgtgccttcacggttttctggat ccggctcgggaaccgacttcaccctcaccatctcgtcgtccaaccgaggacttcgcaacct actactgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaaccttcggtggcggaactaag gtcgaatacaaggtggcgcctccctcctgttcatcttcccaccctccgacgagcagctgaagt ccggcaccgctcctcgtgtgtcgtgtaacaacttctaccccgagggcaaggtgcagt ggaaggtggacaacgcctgcagtcgggcaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactc caaggacagcacctactcctgtcctccaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagc acaaggtgtacgctgcgaagtgaccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagtcctc aaccggggcgagtg
10273 CDR-L1	68	QSSQSVYNNNDLA
10273 CDR-L2	69	RASTLAS
10273 CDR-L3	70	LGGYDDDDVDTYT
10273 CDR-H1	71	GFSLSSYGMS
10273 CDR-H2	72	IISSSGSTYYASWAKG
10273 CDR-H3	73	DHIYRYDDYGDYPTYGMXP
Варіабельний легкий ланцюг 10273 кролика	74	AVVLTQTPSPMSAAVGGTVTISCQSSQSVYNNNDLAWYQQKPGQ PPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCL GGYDDDDVDTYTFGGGTEVVVK
Нуклеотид варіабельного легкого ланцюга 10273 кролика	75	gcagtcgtgtgactcagacaccatcaccatgtctgcagctgtgggaggcacagtcaccatc agtgccagtcagtcagagtggttataataataacgacttagcctggtatcagcagaaccag ggcagcctcctaagctcctgatctacagggaactcactctggcatctgggtcccgtcgggttc agcggcagtggtatctgggacacagttcactctcaccatcagcggcgtgcagtgtagcatgct gccacttactactgtctaggcggttatgatgatgatgtgatacgtatacttcggcgaggaggacc gaggtggtgtcaaa
Варіабельний важкий ланцюг	76	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSYGMSWVRQAPGKGLE WIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKSTTTVDLKIAPTTEDTATYFCA

10273 кролика		RDHIYRYDDYGDYPTYYGMDPWGPGTLTVSS
Нуклеотид варіабельного важкого ланцюга 10273 кролика	77	cagtcggtggaggagtcggtgggtgcctggtcacgcctgggacaccctgacactcacctg cacagtccttgattctccctcagtagctatggaatgagctgggtccgaggtccagggaag gggctggaatggatcggaattattagtagtagtgtagcacatactacgcgagctggcgaaa ggccgattcaccatctccaagacctcgaccacggtggatctgaaatcgccagtcggacaac cgaggacacggccacctattctgtgccagagatcacattataggtacgatgactatggtgatt accctactactacggcatggacccctggggccaggcaccctggtcaccgtctcgagc
Легкий ланцюг 10273 mIgG кролика	78	AVVLTQTPSP MSAVGGTVT ISCQSSQSVY NNNDLAWYQQ KPGQPPKLLI YRASTLASGV PSRFSGSGSG TQFTLTISGV QCDDAATYYC LGGYDDVDVT YTFGGGTEVV VKRTDAAPTV SIFPPSSEQL TSGGASVVCFLNNFYPKDIN VKWKIDGSER QNGVLNSWTD QSKDCTYSM SSTLTCLKDE YERHNSYTCE ATHKTSTSPI VKSFNRNEC
Важкий ланцюг 10273 mIgG кролика	79	QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFSLSS YGMSWVRQAP GKGLEWIGII SSSGSTYYAS WAKGRFTISK TSTTVDLKIA SPTTEDTATY FCARDHIYRY DDYGDYPTYY GMDPWGPGTL VTVSSAKTTP PSVYPLAPGS AAQTNMVTG GCLVKGYFPE PVTVTWNSGS LSSGVHTFPA VLQSDLYTLS SSTVPSSTW PSETVTCNVA HPASSTKVDK KIVPRDCGCK PCICTVPEVS SVFIFPPKPK DVLITLTPK VTCVVDISK DDPEVQFSWF VDDVEVHTAQ TQPREEQFNS TFRSVSELP MHQDWLNGKE FKCRVNSAAF PAPIEKTISK TKGRPKAPQV YTIPTPKQEQM AKDKVSLTCTM ITDFFPEDIT VEWQWNGQPA ENYKNTQPI DTDGSYFVYS KLVNQKSNWE AGNTFTCSVL HEGLHNHHE KLSHSPGK
Нуклеотид легкого ланцюга 10273 кролячого mIgG	80	gcagtcgtgctgactcagacaccatcacctatgtctgcagctgtggaggcacagtcaccatc agttgccagtcagtcagagtggtataataataacgacttagcctggatcagcagaaccag ggcagcctcctaagctctgactacagggcatccactctggcatctgggtcccgctcggttc agcggcagtggtatctgggacacagtcactctcacatcagcggcgctgagtgacgatgct gccactactactgtctagcgggtatgatgatgatgttgatactatactctcgcgaggaggacc gaggtggtggtcaaacgtacggatgctgcaccaactgtatccatctccaccatccagtgagc agtaacatctggagggtcctcagtcgtgtcttctgaacaacttaccccaagacatcaatg tcaagtggaaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtctgtaacagttggactgatcagg acagcaaaagactgcacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccgaaggacgagatga acgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttaccattgtcaagag ctcaacagggaatgagtg
Нуклеотид важкого ланцюга 10273 кролячого mIgG	81	cagtcggtggaggagtcggtgggtgcctggtcacgcctgggacaccctgacactcacctg cacagtccttgattctccctcagtagctatggaatgagctgggtccgaggtccagggaag gggctggaatggatcggaattattagtagtagtgtagcacatactacgcgagctggcgaaa ggccgattcaccatctccaagacctcgaccacggtggatctgaaatcgccagtcggacaac cgaggacacggccacctattctgtgccagagatcacattataggtacgatgactatggtgatt accctactactacggcatggacccctggggccaggcaccctggtcaccgtctcgagtgcca aaacgacacccccatctgtctatccactggccctggatctgtgccccaaactaactccatgtg acctgggatgcctggtaagggtatttccctgagccagtgacagtgacctggaactctggat ccctgtccagcggtgtgcacacctccagctgtcctgcagtcgtgacctctacactctgagcagct cagtgactgtccctccagcactggccagcgagaccgtcacctgcaacgttgccaccgg gccagcagcacaaggtggacaagaaaattgtgccagggtgtgtgtaagccttgata tgtacagtcccagaagatcatctgtcttcatctcccccaagccaaaggtgtgtcaccatt actctgactcctaaggtcagctgtgtgtgtgtagacatcagaaggtatgccagggtccagtt cagctggttttagatgatgtggaggtgcacacagctcagacgaacccggaggagcagt tcaacagcacttccgctcagtcagtgaaactcccatcatgcaccaggactggctcaatggcaa ggagttcaaatgcagggtcaacagtcagcttccctgccccatcgagaaaaccatctccaa aaccaaaggcagaccgaagggtccacaggtgtacaccattccactcccaaggagcagatg gccaaggataaagtcagtcgtacgtcatgataacagacttctccctgaagacattactgtgga gtggcagtggaatggcagccagcgagaaactacaagaactcagcccatcatggtgacac agatggctcttactctgtctacagcaagctcaatgtgcagaagagcaactgggaggcaggaa atacttccactgtctgtgtacatgaggccctgcacaaccaccatactgagaagagcctctcc cactctcctggtaaa
Нуклеотид легкого ланцюга 10236 кролячого mIgG	82	AYDMTQTPAS VEVAVGGTVT IKCQASQSI SWLAWYQQKP GQPPKLLIYL ASTLASGVSS RFGKSGSGTQ FTLTISGVEC ADAATYYCQ GYTNSNIINT FGGGTEVVVK RTDAAPTVSI FPPSSEQLTS GGASVVCFLN NFYPKDINV WKIDGSRQN GVLNSWTDQD SKDCTYSMSS TLTLTKDEYE RHNSYTCEAT HKTSTSPIVK SFNRNEC
Нуклеотид важкого ланцюга 10236 кролячого mIgG	83	QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFPLSN YAMSWVRQAP GKGLEWIGDI YPSDIIDYAS WAKGRFTISQ TSTTVELKIT GPTTEDTATY FCARDNNDYG LDIWGPGLTV TVSSAKTTPP SVYPLAPGSA AQTNMVTLG CLVKGYFPEP VVTWNSGSL

		SSGVHTFPAV LQSDLYTLSS SVTVPSSTWP SETVTCNVAH PASSTKVDKK IPRDCGCKP CICTVPEVSS VFIFPPKPKD VLTITLTPKV TCVVVDISKD DPEVQFSWFV DDVEVHTAQT QPREEQFNST FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAFP APIEKTISK KGRPKAPQVY TIPPPKEQMA KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQPAE NYKNTQPIMD TDGSYFVYSK LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHHTK SLSHSPGK
Нуклеотид легкого ланцюга 10236 кролячого mIgG	84	gcctatgatatgaccagactccagcctctgtggaggtagctgtggaggcacagtcaccatc aagtgccaggccagtcagagcattagcagttggttagcctggtatcagcagaaaccagggtca gcctccaagctcctgatctatctggcatccactctggcatctgggtctcatcgcggttcaaagg cagtggtatctgggacacagttcactctaccatcagcgcggtggagtggtccgatgtgccact tactactgtcaacagggttataactaataatattattaatacttctggcgaggaggaccagggtg gtggtcaaacgtacggatgtgtgcaccaactgtatccatcttccaccatccagtgagcagttaac atctggagggtgcctcagtcgtgtgtcttgaacaactctaccccaagacatcaatgtcaagtg gaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgctctgaacagttggactgatcaggacagca aagactgcacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggacagtagtaaacgaca taacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttaccattgtcaagagctcaac aggaatgagtg
Нуклеотид важкого ланцюга 10236 кролячого mIgG	85	cagtcgggtggaggagtcgggggtcgctggtcacgcctgggacacccctgacactcacctg caccgtctctgggtccccctcagtaattatgcaatgagctgggtccgccagggtccagggaag gggtcggatggatcggagacattatcctagtgtatcatagactacgcgagctgggcaaaa ggccgattcaccatctcccaaacctcgaccacggtggagctgaaaatcacgggtccgacaac cgaggacacggccacctattctgtgcccagagacaacaatgactatggtctggacatctgggg cccaggcacccctgtcacgtctcagtgccaaaacgacacccccatctgtctactccactggc ccctggtatctgtgcccactaactccatggtgaccctgggatcgctgggtcaaggctatttcc ctgagccagtgacagtgacctggaactctggatccctgtccagcggtgtcacacacttccagc tgtctcagtcgtacactctacactctgagcagctcagtgactgtccctccagcacctggcca gcgagaccgtcacctgcaacgttgcccacccggccagcagcaccaagggtggacaagaaaa ttgtgccagggtatgtgtgttaagccttgcatatgtacagtcacagaagatcatctgtctcatc tcccccaaaagcccaaggatgtgtctaccattactctgactcctaaggctacgtgtgtgtgtag acatcagcaaggatgatcccgaggtccagttcagctggtttgatagatgtgtgaggtgcacac agctcagacgcaaccccgaggagcagttcaacagcacttccgctcagtcagtgaaacttcc catcatgcaccaggactggctcaatggcaaggagttcaaatgcagggtcaacagtgacagttt ccctgccccatcgagaaaaccatctccaaaacaaaggcagaccgaagggtccacaggt gtacaccattccacctcccaaggagcagatggccaaggataaagtcagtcgtacgtcatgat aacagacttctccctgaagacattactgtgagtggcagtggaatgggcagccagcgaga actacaagaactcagcccatcatggacacagatgggtcttactctgtctacagcaagctcaa tgtgcagaagagcaactgggagggcaggaaatacttccactctctgtgttatcatagggcctg cacaaccaccatactgagaagagcctctccactctctgtgtaaatgactcagtgctcttgga gcctctgtgctacaggactctgacacctacttccacccctccctgtataaa
Антиген- зв'язуючий фрагмент легкого ланцюга 10236	86	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISWLAWYQQKPGQPPK LLIYLASTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISGVECADAAATYYCQQGY TNSNIINTFGGGTEVVVKRTPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVAN KYFPDVTVTWEVDGTTQTGTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTST QYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC
Нуклеотид антиген- зв'язуючого фрагменту легкого ланцюга 10236	87	gcctatgatatgaccagactccagcctctgtggaggtagctgtggaggcacagtcaccatc aagtgccaggccagtcagagcattagcagttggttagcctggtatcagcagaaaccagggtca gcctccaagctcctgatctatctggcatccactctggcatctgggtctcatcgcggttcaaagg cagtggtatctgggacacagttcactctaccatcagcgcggtggagtggtccgatgtgccact tactactgtcaacagggttataactaataatattattaatacttctggcgaggaggaccagggtg gtggtcaaacgtacggatgtgcactactgtcctcatcttccaccagctgtgtatcaggtggc aactggaacagtcaccatcgtgtgtggcgaataataacttcccgatgtcacccgtcacctggg agggtgagtgaccacccaacaactggcatcgagaacagtaaaacaccgcagaattctgc agattgtactacaacctcagcagcactctgacactgaccagcacacagtacaacagccaca aagagtacacctgaaggtagccaggggcacgacctcagtcgtccagagcttcaataggggt gactgt
Антиген- зв'язуючий фрагмент важкого ланцюга 10236	88	QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFPLSNYAMSWVRQAPGKGLE WIGDIYPSDIIDYASWAKGRFTISQTSTTVELKITGPTTEDTATYFCA RDNDYGLDIWGPGLTVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVT LGCLVKGYLPEPVTVWNSGTLTNGVTRTFPSVRQSSGLYSLSSV SVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKP
Нуклеотид антиген- зв'язуючого фрагменту важкого ланцюга 10236	89	cagtcgggtggaggagtcgggggtcgctggtcacgcctgggacacccctgacactcacctg caccgtctctgggtccccctcagtaattatgcaatgagctgggtccgccagggtccagggaag gggtcggatggatcggagacattatcctagtgtatcatagactacgcgagctgggcaaaa ggccgattcaccatctcccaaacctcgaccacggtggagctgaaaatcacgggtccgacaac cgaggacacggccacctattctgtgcccagagacaacaatgactatggtctggacatctgggg ccaggcacccctgtcacgtctcagtggtggcaacctaaaggctccatagcttccactggcc ccctgctgcggggacacaccagctccagggtgaccctgggtgctgtcgaagggtcacctc

		ccggagccagtgaccgtgacctggaactcgggcaccctaccaatggggtagcaccttccc gtccgtccggcagtcctcaggccttactcgtgagcagcgtggtgagcgtgacctcaagcag ccagcccgtcacctgcaacgtggcccaccagccaccaacaccaaagtggacaagaccgtt gcgcctctgacatgcagcaagccc
Антиген- зв'язуючий фрагмент легкого ланцюга 10273	90	AVVLTQTPSPMSAAVGGTITISCQSSQSVYNNNDLAWYQKPGQ PPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCL GGYDDVDVDTYTFGGGTEVVVKRTPVAPTIVLIFPPAADQVATGTVTI VCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTL TLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC
Нуклеотид антиген- зв'язуючого фрагменту легкого ланцюга 10273	91	gcagtcgtgctgactcagacaccatcacccatgtctgcagctgtgggaggcacagtcaccatc agttgccagtcagtcagagtggttataataaacgacttagcctggtatcagcagaaaaccag ggcagcctcctaagctctgactacagggcatccactctggcatctggggctccgctcgcggttc agcggcagtggtatctgggacacagttcactctcaccatcagcggcgtgcagctgtgacgatgct gccacttactactgtctaggcgggtatgatgatgatgttgatactatacttccggcgaggggacc gagggtggtgtaaacgtacgccagttgcacactgtcctcatctcccaccagctgctgatca ggtggcaactggaacagtcaccatcgtgtgtgtggcgaataaatacttcccgatgtcaccgtca cctgggaggtggatggcaccacccaaacaactggcatcgagaacagtaaaacaccgcgaga attctgcagattgtacctacaacctcagcagcactctgacactgacacagtagcacagtagaca gccacaaagagtacacctgcaaggtgaccagggcacgacctcagtcgtccagagcttcaat aggggtgactgt
Антиген- зв'язуючий фрагмент важкого ланцюга 10273	92	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSYGMSWVRQAPGKGLE WIGIISSSGSTYYASWAKGRFTISKSTTTVDLKIASPTTEDTATYFCA RDHIYRYDDYGDYPTYGMDPWGPGTLTVTVSSGQPKAPSVFPLAP CCGDTPSSVTLVGLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFSPVRQ SSGLYSLSSVTVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKP
Нуклеотид антиген- зв'язуючого фрагменту важкого ланцюга 10273	93	cagtcggtggaggagtcgggggtcgctggtcacgcctgggacacccctgacactcacctg cacagctctggaattctccctcagtagctatggaatgagctgggtccgccagggtccagggaag gggtcggaatggatcggaattattagtagtagtgtagcacatactacgcgagctggggcga ggccgattcaccatctccaagacctgaccacggtgatctgaaatcgccagtcggacaac cgaggacacggccacctattctgtgcagagatcacattataggtacgatgactatggtgatt accctacactacagggcatggaccctggggccaggcacccctggtcaccgtctcagtggtggc aacctaaggctccatcagcttcccactggcccctgctcgggggacacaccagctccacgg tgacctgggtgcctgggtcaaggctacctcccgagccagtgacctgacctggaactcgg gcacctcaccaatgggtgacgcaccttcccgtccgtccggcagtcctcaggcctctactcgt gagcagcgtggtgagcgtgacctcaagcagccagccgtcacctgcaacgtggccaccaca gccaccaacaccaaagtggacaagaccgttgcgcctcgacatgcagcaagccc
Важкий ланцюг домену 5 людського LEKTI	94	EVQLLESGLVLPQGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGL EWIGIHWASGTTFYATWAKGRFTISRDNSSGGGSGGGGSREIVKLC SQYQNQAANGILFCTRENDPIRGPDGKMHGNLCSMCQAYFQAEN EEKKKAEARARSGGGGGGSKNTVYLQMNLSLCTAVVYCAR TVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCHHHHHHHHHH H
Легкий ланцюг домену 5 людського LEKTI	95	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQKPGKAP KLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGG YSSISDTTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Химерний легкий ланцюг кролика/ людини (hCK S171C) 10236	96	AYDMTQTPASVEVAVGGTITIKQASQSISSWLAWYQKPGQP LLIYLASTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISGVECAADAATYYCQGY TNSNIINTFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Химерний важкий ланцюг кролика/ людини 10236	97	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFPLSNYAMSWVRQAPGKGLE WIGDIYPSDIIDYASWAKGRFTISQTSTTVELKITGPTTEDTATYFCA RDNDYGLDIWGPGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTITCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNYHTQKSLSLSLGK
LEKTI-D5-BTM Fc-фрагменту	98	EIVKLCSTYQYQNQAANGILFCTRENDPIRGPDGKMHGNLCSMCQAY FQAENEEKKKAEARARNLEENLYFQGVDDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

		NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
LEKTI-D8-BTM Fc-фрагменту	99	EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNKCAMCAS VFKLEEEEEKNDKEEKGVAEKVEENLYFQGVDDKKEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Нуклеотид легкого ланцюга 10236 gL5 Мінус RS	100	gcgatgacatgactcagagcccgctccagcctgtccgctcgtggagatcgctgactatca cgtgtcaggcctcacaatccattagctcctggctggcctgtgaccagcagaagccagggaag gctccgaagctgctgatctacctggcctccaccctgctccggcgctgcttcacggttttaagg atccggctcgggaaccgacttcaccctcaccatctcgtcgtccaaaccgaggacttcgcaac ctactactgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaacaccttcgggtggcggaacta aggtcgaatcaagcgtacgggtggcgcctccctcgtgttcattctccaccctccgacgagca gctgaagtccggcaccgctccgctgctgtgctgaacaactctaccctccgagggcgaacaa gggtcagtggaagggtggacaacgcctgcagtcggcaactccagggaatccgtaccgagag caggactccaaggacagcacctactcctgtcctccaccctgacctgtccaagggcgactac gagaagcacaaggtgtacgctgcgaagtgaccaccaggcgctgtccagccccgtgacca agtcctcaaccggggcgagtgc
Нуклеотид легкого ланцюга 10236 gL7 Плюс RS	101	gcgatgacatgactcagagcccgctccagcctgtccgctcgtggagatcgctgactatc acgtgtcaggcctcacaatccattagctcctggctggcctgtgaccagcagaagccagggaag ggctccgaagctgctgatctacctggcctccaccctgctccggcgctgcttcacggtttctgga tccggctcgggaaccgacttcaccctcaccatctcgtcgtccaaaccgaggacttcgcaacct actactgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaacaccttcgggtggcggaactaag gtcgaatcaagcgtacgggtggcgcctccctcgtgttcattctccaccctccgacgagcagct gaagtccggcaccgctccgctgctgtgctgctgaacaactctaccctccgagggccaaggt gcagtggaaagggtgacaacgcctgcagtcggcaactccagggaatccgtaccgagcag gactccaaggacagcacctactcctgtcctccaccctgacctgtccaagggcgactacgag aagcacaaggtgtacgctgcgaagtgaccaccaggcgctgtccagccccgtgaccaagt cctcaaccggggcgagtgc
Нуклеотид легкого ланцюга 10236 gL8 Плюс RS	102	gcgatgacatgactcagagcccgctccagcctgtccgctcgtggagatcgctgactatca cgtgtcaggcctcacaatccattagctcctggctggcctgtgaccagcagaagccagggaag gctccgaagctgctgatctacctggcctccaccctgctccggcgctgcttcacggtttctggat ccggctcgggaaccgacttcaccctcaccatctcgtcgtccaaaccgaggacttcgcaacct actactgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaacaccttcgggtggcggaactaag gtcgaatcaagcgtacgggtggcgcctccctcgtgttcattctccaccctccgacgagcagct gaagtccggcaccgctccgctgctgtgctgctgaacaactctaccctccgagggccaaggt gcagtggaaagggtgacaacgcctgcagtcggcaactccagggaatccgtaccgagcag gactccaaggacagcacctactcctgtcctccaccctgacctgtccaagggcgactacgag aagcacaaggtgtacgctgcgaagtgaccaccaggcgctgtccagccccgtgaccaagt cctcaaccggggcgagtgc
Нуклеотид легкого ланцюга 10236 gL6 Плюс RS	103	gcgatgacatgactcagagcccgctccagcctgtccgctcgtggagatcgctgactatca cgtgtcgggcctcacaatccattagctcctggctggcctgtgaccagcagaagccagggaag gctccgaagctgctgatctacctggcctccaccctgctccggcgctgcttcacggtttctggat ccggctcgggaaccgacttcaccctcaccatctcgtcgtccaaaccgaggacttcgcaacct actactgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaacaccttcgggtggcggaactaag gtcgaatcaagcgtacgggtggcgcctccctcgtgttcattctccaccctccgacgagcagct gaagtccggcaccgctccgctgctgtgctgctgaacaactctaccctccgagggccaaggt gcagtggaaagggtgacaacgcctgcagtcggcaactccagggaatccgtaccgagcag gactccaaggacagcacctactcctgtcctccaccctgacctgtccaagggcgactacgag aagcacaaggtgtacgctgcgaagtgaccaccaggcgctgtccagccccgtgaccaagt cctcaaccggggcgagtgc
Нуклеотид легкого ланцюга 10236 gL6 Q24K Плюс RS	104	gcgatgacatgactcagagcccgctccagcctgtccgctcgtggagatcgctgactatca cgtgtaaggcctcacaatccattagctcctggctggcctgtgaccagcagaagccagggaag gctccgaagctgctgatctacctggcctccaccctgctccggcgctgcttcacggtttctggat ccggctcgggaaccgacttcaccctcaccatctcgtcgtccaaaccgaggacttcgcaacct actactgccaacaggggtataccaacagcaacatcatcaaacaccttcgggtggcggaactaag gtcgaatcaagcgtacgggtggcgcctccctcgtgttcattctccaccctccgacgagcagct gaagtccggcaccgctccgctgctgtgctgctgaacaactctaccctccgagggccaaggt gcagtggaaagggtgacaacgcctgcagtcggcaactccagggaatccgtaccgagcag gactccaaggacagcacctactcctgtcctccaccctgacctgtccaagggcgactacgag aagcacaaggtgtacgctgcgaagtgaccaccaggcgctgtccagccccgtgaccaagt cctcaaccggggcgagtgc

Далі винахід буде додатково описаний на прикладах з урахуванням варіантів, зображених на супровідних малюнках.

Приклади

Приклад 1: Клонування, експресія та очищення білків калікреїну та доменів лімфоепітеліального інгібітора типу Kazal (LEKTI)

Оптимізована нуклеотидна послідовність, що кодує білок відповідно до SEQ ID NO: 51, клонований у власному експресійному векторі ссавців, використовуючи сайти HindIII/EcoRI, створюючи вектор, що кодує білок KLK5 людини без міток.

Послідовності KLK5 миші та яванської мавпи (супо) аналогічним чином клонувались, щоб забезпечити генерацію активних форм білків, що містять послідовність SEQ ID NO: 59 та 60.

Домен 5 (D5) та домен 8 (D8) людського LEKTI (Uniprot Q9NQ38), що містить залишки 292-353 і 490-558 (відповідно до нумерації Uniprot), були клоновані та експресовані з метою їх використання в якості еталонних білків у аналізах *in vitro*.

Злиті білки Fc-фрагменту кролячого KLK5, домени 5 та 8 LEKTI 5 експресували шляхом тимчасової трансфекції за допомогою системи експресії Expi293™ (Life Technologies™) відповідно до протоколу виробника. Під час експресії KLK5 автоматично активується з утворенням активного KLK5 (включає послідовність SEQ ID NO: 53 або залишки I67-S293 SEQ ID NO: 51) у супернатанті. Клітини збирали через 5 днів після трансфекції, а супернатанти негайно використовували для очищення. Супернатанти, що містять активний KLK5 людини (або миші чи яванської макаки), розводили чотириохратно буфером А (50 мМ Трис при pH 7,0, 50 мМ NaCl) та завантажували у хроматографічну колонку HiTrap з сильним катіонним обміном для очищення білка з високою роздільною здатністю. Зв'язані білки елюювали сольовим градієнтом, отриманим у загальній кількості 10 об'ємів колонки, використовуючи буфер А (50 мМ Трис, pH 7,0, 50 мМ NaCl) та буфер В (50 мМ Трис, pH 7,0, 1 М NaCl). Фракції, що містять очищений активний KLK5 людини (або миші чи яванської макаки), об'єднували, концентрували та додатково очищали ексклюзією хроматографією у колонці S200 26/60, яка врівноважувалась буфером, що складався з 20 мМ трис, 150 мМ NaCl, 5 % гліцерину при pH 7.2. Аналіз ДНС-ПААГ показав, що білки глікозилювались під час експресії. Аналіз за допомогою мас-спектрометрії дав очікувану молекулярну масу. Супернатанти, що містять кролячий Fc- злитий білок LEKTI D5 людини (відповідно до SEQ ID NO: 54), спочатку піддавали афінній хроматографії на основі протеїну А. Супернатанти завантажували на 5 мл хроматографічну колонку HiTrap™ Protein А. Зв'язані білки елюювали 1М буфером лимонної кислоти при pH 2,0, а фракції нейтралізували 2М Трис-гідохлоридом при pH 8,5. Фракції, що містять Fc-злитий білок домену 5 LEKTI кролика об'єднували, концентрували та додатково очищали ексклюзією хроматографією з використанням колонки S200 26/60, яка врівноважувалась фосфатно-сольовим буферним розчином. Потім фракції, що містять очищений злитий білок кролячого Fc домену 5 LEKTI людини, об'єднували та концентрували. Кролячий Fc- злитий білок домену 8 LEKTI (відповідно до SEQ ID NO: 61) подібним чином очищали з супернатантів трансфікованої клітинної культури.

Зливу молекулу Fab-фрагменту домену 5 LEKTI (відповідно до SEQ ID NO: 94 і 95) експресували та очищали методом катіонообмінної хроматографії. Нуклеотидна послідовність домену 5 LEKTI, фланкована на 5'- та 3'-кінцях послідовностями, що кодують лінкери Gly4Ser, інтегрувалась в каркас 3 послідовності важкого ланцюга Fab-фрагменту, специфічного для альбуміну (як описано в публікації WO2020011868, на яку є посилання у цьому документі). Мітка, що кодує послідовність 10x His, також була розміщена на 3'-кінці важкого ланцюга Fab-фрагменту. Зливу послідовність важкого ланцюга Fab-фрагменту домену 5 LEKTI оптимізували для експресії в клітинах ссавців, клонували у власний вектор експресії та котрансфікували відповідним легким ланцюгом, також оптимізованим для експресії ссавців, у клітинах CHO SXE. Трансфіковані клітини культивували у вентильованій колбі при температурі 32 °C протягом 13 днів. Супернатант збирали, концентрували та буфер, у якому був розчинений супернатант, замінювали на 20 мМ Трис, 50 мМ NaCl, pH 7,0 перед завантаженням у вискозоефективну хроматографічну колонку SP Sepharose. Зв'язані білки елюювали сольовим градієнтом, отриманим у загальній кількості 10 об'ємів колонки, використовуючи буфер А (50 мМ Трис, pH 7,0, 50 мМ NaCl) та буфер В (50 мМ Трис, pH 7,0, 1 М NaCl). Фракції, що містять злитий білок Fab-фрагменту домену 5 LEKTI, об'єднували та додатково очищали за допомогою ексклюзією хроматографії з використанням колонки S200, урівноваженої фосфатно-сольовим буферним розчином при pH 7,4. Відповідні фракції були об'єднані.

Приклад 2: Утворення антитіл шляхом імунізації KLK5

Самок новозеландських білих кроликів (>2 кг) імунізували підшкірно 100 мкг 0,4 мг/мл активного KLK5 людини та активного KLK7 людини (експресованого, як визначено у прикладі 1), змішаного з еквівалентним об'ємом повного ад'юванта Фрейнда (Sigma™). Тваринам вводились стимулюючі ін'єкції з інтервалами в 21 день. Ін'єкції складалися з 100 мкг того самого імуногену, змішаного з еквівалентним об'ємом неповного ад'юванта Фрейнда (Sigma™). Процес припинявся через 14 днів після останнього стимулювання, коли суспензії окремих клітин селезінки, кісткового мозку та мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC) готували та заморожували в 10 % диметилсульфоксиді (DMSO) у ембріональній телячій сироватці (FCS) при температурі -80 °C.

Культури В-клітин готували за допомогою методу, описаного у статті Тікля та ін., 2015 J Biomol Screen: 20(4), 492-497. Коротко, клітини лімфатичних вузлів, спленоцити або мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) імунізованих тварин культивували з щільністю 2000 клітин на лунку на 96-лункових культуральних планшетах із штрих-кодом у середовищі RPMI 1640 (Gibco™) 200 мкл/лунку, доповненого 10 % ембріональною телячою сироваткою (Sigma Aldrich™), 2 % розчином ГЕПЕС (Sigma Aldrich™), 2 % розчином L-глутаміну (Gibco™), 1 % розчином пеніциліну/стрептоміцину (Gibco™), 0,2 % антибіотиком Normocin (Invivogen™), 0,1 % β-меркаптоетанолу (Gibco™) і з використанням клітини-фідера, що експресує CD40L та IL-2, у присутності або за відсутності супернатанту, що стимулює В-клітини (BSS). Супернатант для стимуляції В-клітини отримують шляхом культивування мононуклеарних клітин периферичної крові у присутності мітогенних агентів форбол-12-мірістат-13-ацетату (PMA) і фітогемогліутініну-L (PHA-L) протягом 6 днів перед збором супернатанту. Планшети

інкубували шість днів при температурі 37 °C іта 5 % CO₂. Культури створювались з використанням В-клітин від усіх імунізованих тварин. Загалом скринінгу піддавались приблизно 1 × 10⁹ В-клітин.

Через шість днів супернатанти перевіряли на зв'язування з людським KLK5 (отриманим, таким ж методом, що викладений у прикладі 1) шляхом аналізу зв'язування на основі мультиплексної гомогенної флуоресценції з використанням кульок стрептавідину Sol-R2 (TTP Labtech™), покритих біотинільованим людським KLK5 як джерелом цільового антигену та гранул стрептавідину Sol-R4 (TTP Labtech™), покритих спорідненим KLK7 для визначення селективності та специфічності. Набір реагентів для маркування антитіл Lightning-Link Rapid Biotin Type B (Expedeon™) використовувався для біотинілювання білків із використанням 5-кратного молярного надлишку білка порівняно з протоколом постачальника, щоб уникнути повної модифікації всіх залишків лізину. Загалом 10 мкл супернатанту з 96-лункових культуральних планшетів із штрих-кодом переносили за допомогою пристрою для обробки рідини Agilent Bravo у 384-лункові планшети з чорними стінками зі штрих-кодом, які містили кульки Sol-R, покриті біотинільованими KLK, як зазначено вище, та ФІТЦ, кон'югованого специфічним до Fc-фрагменту антитілом кози до імуноглобуліну кролика, (Jackson ImmunoResearch™). Через 1 годину інкубації планшети аналізували на приладі для підрахунку клітин mirrorball (TTP-Labtech™).

Після первинного скринінгу супернатанти, у яких спостерігався зв'язок з KLK5, консолідували на 96-лункових планшетах зі штрих-кодом за допомогою автоматизованої системи Beckman Coulter BiomekNXP™, а В-клітини в культуральних планшетах заморожували при температурі -80 °C. Спочатку консолідовані супернатанти повторно досліджували для підтвердження зв'язування з KLK5 людини за допомогою технології флуориметричного мікрооб'ємного аналізу (FMAT). Для цього 10 мкл надосадової рідини переносили в чорні планшети Грейнера зі штрих-кодом. 50 мкл/планшет з 10 мкм суперавідину (Bangs Beads™) покривали людським біотинільованим KLK5, змішаним з козячим антигеном до імуноглобуліну кролика Alexa-647™ (Jackson ImmunoResearch™). Потім додавали супернатант та планшети аналізували за допомогою системи для підрахунку клітин Cellular Detection System 8200 виробництва компанії Applied Biosystems™.

Ряд антитіл було відібрано для зв'язування з KLK5 та згодом досліджено на предмет їх здатності інгібувати KLK5 та їх специфічності щодо KLK5 порівняно з іншими калікреїнами.

Приклад 3: Ідентифікація інгібіторних антитіл KLK5

З метою виявлення антитіл, здатних специфічно пригнічувати активність KLK5 серед протеаз та інгібіторів протеаз, присутніх у супернатанті В-клітин комплексу, було розроблено скринінговий аналіз. 384 лунковий планшет чорного кольору Nunc Maxisorp (Sigma Aldrich™) покривали F(ab')₂ Fc-фрагментом козячого антитіла до кролячого імуноглобуліну G (Jackson ImmunoResearch™) у концентрації 10 мкг/мл у карбонатному буфері та залишали на ніч при температурі 4 °C. Планшети промивали 3 рази на пристрої для промивки планшетів Biotek™, використовуючи фосфатно-сольовий буферний розчин/0,1 % буфер Tween-20 та блокували фосфатно-сольовим буферним розчином/1 % альбуміном бичачої сироватки протягом 1 години при кімнатній температурі у кількості 20 мкл/лунка. В-клітинні супернатанти додавали до планшетів разом з 25 мкл 1 нМ злитого білка Fc-фрагмента домену 5 LEKT1 кролика, що додається у контрольні лунки у якості позитивного контролю для інгібування та аналітичного буфера А (50 мМ Трис, 150 мМ хлорид натрію, 0,05 % (в об'ємному відношенні) буферу Tween-20, рН 7,6), який додається до окремого набору контрольних лунок у якості негативного контролю для інгібування. Планшети інкубували протягом ночі при кімнатній температурі, а потім тричі промивали на промивному пристрої Biotek™ використовуючи фосфатно-сольовий буферний розчин/0,1 % буфер Tween-20. 10 мкл 50 пМ людського KLK5 в аналітичному буфері А додавали в кожен лунку та планшети інкубували протягом ночі при кімнатній температурі, щоб забезпечити повну асоціацію. Субстрат Boc-VPR-AMC (Cambridge Research Biochemicals™) у буфері для аналізу А додавали до лунок до кінцевої концентрації 600 мкМ і флуоресценцію (λ_{ex}380 нм λ_{em}430 нм) визначали через 4 години за допомогою пристрою для аналізу планшетів PHERAStar FSX (BMG Labtech™).

Дані аналізували для визначення відсотка інгібування активності KLK5 за допомогою наступного рівняння:

$$\% \text{інгібування} = 100 \cdot \left(1 - \frac{\text{Тест} - \text{Позитивний}}{\text{Негативний} - \text{Позитивний}} \right)$$

де термін "Тест" означає значення флуоресценції тестового антитіла, термін "Позитивний" означає середнє значення флуоресценції позитивного контролю для лунок інгібування, а термін "Негативний" означає середнє значення флуоресценції негативного контролю для лунок інгібування.

Супернатанти, які показали >40 % інгібування, вважалися попаданнями. Це становило приблизно 4 % від усіх перевірених супернатантів. Ці антитіла відібрались для відновлення варіабельної області.

Щоб ідентифікувати специфічні клітини, що секретують антитіла, щоб забезпечити відновлення генів варіабельної області антитіла з гетерогенної популяції активованих В-клітин, необхідно було виконати етап деконволюції. Використовували метод флуоресцентних точок (Кларго та ні., 2014 р.). Клітини, що секретують антитіла, статично інкубували при температурі 37 °C протягом 1 години в присутності кульок стрептавідину (New England Biolabs™), покритих біотинільованим людським KLK5 і кон'югатом стрептавідин-флуоресцеїн-ізотіоціанатом, специфічним до Fc-фрагменту кролика (Jackson ImmunoResearch™). Потім клітини, що секретували антиген-специфічні антитіла, ідентифікували за флуоресцентним ореолом навколо них. Кілька цих індивідуальних В-клітинних клонів, ідентифікованих за допомогою мікроскопа Olympus, потім відібрали за допомогою мікроманіпулятора Eppendorf™ та переміщали в пробірку для ПЛР. кДНК з окремих клітин отримували за допомогою стандартної ЗТ-ПЛР, а подальшу ПЛР варіабельних послідовностей імуноглобулінів для важких і легких ланцюгів проводили з використанням праймерів, специфічних для гена імуноглобуліну з подальшим проведенням двораундної ПЛР, що включає сайти перекритих векторів, що дозволяють здійснювати пряме клонування змінної області у векторі експресії ссавців кролячого імуноглобуліну G (важкий ланцюг) або каппа-ланцюгу кролячого імуноглобуліну (легкий ланцюг). Конструкції важкого та легкого ланцюгів були спільно

трансфіковані в клітини ExpiHEK-293 за допомогою набору ExpiFectamine™ (Life Technologies™) та рекомбінантного антитіла, експресованого у 125 мл колбі виробництва Erlenmeyer™ об'ємом 30 мл. Після 5-7 днів культивування супернатанти збирали, а антитіла очищали за допомогою афінного захоплення білка А за допомогою чистої хроматографічної системи АКТА. 1 мл хроматографічної колонки HiTrap MabSelect™ SuRe™ (GE Healthcare) приєднували до системи та врівноважували фосфатно-сольовим буферним розчином при pH 7,4 перед нанесенням супернатанту клітинної культури на колонку зі швидкістю 0,25 мл/хв. Потім колонку промивали фосфатно-сольовим буферним розчином при pH 7,4, зв'язаний матеріал елюювали цитратом натрію при pH 3,4 та нейтралізували відповідним об'ємом 2М трис-гідрохлоридом з pH 8,5. Елюйовані фракції замінювали фосфатно-сольовим буферним розчином (Sigma), pH 7,4 та пропускали через фільтр 0,22 мкм. Кінцевий очищений матеріал аналізували за допомогою сканеру A280 методом ультраефективної рідинної хроматографії SE-UPLC (метод VEN200) та визначали наявність ендотоксину за допомогою системи PTSTM Endosafe®.

У цьому аналізі кролячі антитіла 10236 і 10273 продемонстрували потужне інгібування та були відібрані для подальшого опису.

Приклад 4: Ідентифікація KLK5 специфічних інгібіторних антитіл

Очищені кролячі антитіла 10236 та 10273 піддавалися скринінгу з метою підтвердження їх інгібіторної активності проти KLK5 та визначення специфічності для KLK5 використовуючи інші панелі членів сімейства калікреїну людини, включаючи KLK2, KLK4 і KLK7 разом з KLK5 і KLK7 миші та яванської макаки. Для кожного антитіла готували 10-точкову серію розведень у діапазоні від 600 нМ до 20 нМ. 5 мкл переносили в чорні 384-лункові планшети для аналізу (Corning™, кат. № 3575) за допомогою системи Beckman Coulter FXTM та системи Multidrop. 15 мкл активних рекомбінантних білків калікреїну людини додавали до відповідних лунок для досягнення наступних кінцевих концентрацій аналізу: 60 нМ KLK5, 250 нМ KLK7, 500 нМ KLK2, 30 нМ KLK4, 30 нМ KLK5 яванської макаки, 500 нМ KLK7 яванської макаки, 30 нМ KLK5 миші або 10 нМ мишачого буфера в аналізі А (50 мМ Трис, 150 мМ хлориду натрію, 200 мкМ ЕДТК, 0,05 % (у об'ємному вираженні) полісорбату Tween-20, pH 7,6). В якості контролю в лунки додавали лише 20 мкл буфера для аналізу А (без білка KLK) для 0 % активності. Fc-фрагмент домену 5 кролячого LEKTI використовували у якості позитивного контролю для інгібування (тестування проводили в тому ж діапазоні концентрацій, що і при тестуванні антитіл). 15 мкл відповідних активних білків калікреїну людини додавали до 5 мкл аналітичного буфера А для отримання 100 % еталонної активності. Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом ночі перед додаванням наступних пептидних субстратів за допомогою диспансеру Multidrop: Boc-VPR-AMC (Cambridge Research Biochemicals™) для людського KLK5 (300 мкМ), людського KLK2 (30 мкМ), мишачого KLK5 (300 мкМ) та KLK5 яванської макаки (450 мкМ); KHLF-AMC (Cambridge Research Biochemicals™) для KLK7 людини та яванської макаки (90 мкМ і 150 мкМ відповідно), субстрат PFR-AMC (R&D Systems™) для KLK4 людини (200 мкМ) та пептидний субстрат Mca-RPKPVE-Nval-WRK(Dnp)-NH2 (R&D Systems™) для мишачого KLK7 (150 мкМ). Зразки інкубували протягом 4 годин та аналізували за допомогою планшетного аналізатора Pherastar FSX (BMG Labtech™) при фотолюмінесценції λ_{ex}380 нм та λ_{em}430 нм для флюорогенного пептидного субстрату Boc-VPR-AMC, PFR-AMC та KHLF-AMC, а також при λ_{ex}320 нм та λ_{em}400 нм для субстрату Mca-RPKPVE-Nval-WRK(Dnp)-NH2. Дані аналізувались з метою визначення відсотка інгібування, як описано в прикладі 3. Дані наносили на графік з урахуванням концентрації досліджуваного антитіла та 4-параметричну сигмоподібну криву для визначення концентрації напівмаксимального інгібування IC₅₀ (Genedata Screener™).

На додаток до кролячого антитіла 10236, у рамках цього вимірювання, полінуклеотиді послідовності кролячих варіабельних областей антитіл 10236 та 10273 клонувались на модифікованій версії каппа-ланцюгу мишачого імуноглобуліну С, що містить мутацію S171C, щоб відтворити додатковий дисульфідний зв'язок, виявлений у легкому каппа-ланцюзі кролика та відсутній у константних областях миші (послідовність SEQ ID NO: 80 і 81 для антитіла кролика 10273 mIgG та послідовність SEQ ID NO: 84 і 85 (або нуклеотиди 1-1314 з послідовністю SEQ ID NO: 85) для антитіла кролика 10236 mIgG). Таким чином були отримані антитіла, що містять послідовність SEQ ID NO: 82 і 83 для кролячого антитіла 10236 до mIgG та послідовність SEQ ID NO: 78 і 79 для кролячого антитіла 10273 до mIgG.

Кролячі антитіла 10236 і 10237 до mIgGs продемонстрували потужне інгібування людського KLK5 без інгібуючої активності (тобто нижче порогу 40 % відповідно до критеріїв відбору в прикладі 2) стосовно інших протестованих родин протеаз людського походження (людські KLK2, 4 і 7). Також було продемонстровано потужне інгібування KLK5 яванської макаки, але не KLK7 яванської макаки. Інгібуючу активності до KLK5 або KLK7 миші не виявлено. Концентрації напівмаксимального інгібування (IC₅₀) кролячих антитіл 10236, 10273 та кролячого Fc-фрагменту LEKTI D5 наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

	KLK5 людини	KLK2 людини	KLK4 людини	KLK7 людини	KLK5 яванської макаки	KLK7 яванської макаки	KLK5 миші	KLK7 миші
Дескриптор антитіла	IC50 (M)							
10236 mIgG	2.40E-10	NI	NI	NI	3.30E-11	NI	NI	NI
10236 IgG кролика	1.74E-10	NI	NI	NI	2.76E-11	NI	NI	NI
10273 mIgG	3.48E-11	NI	NI	NI	3.01E-10	NI	NI	NI
Fc-фрагмент домену 5	1.03E-10	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

LEKTI								
-------	--	--	--	--	--	--	--	--

NI = відсутність інгібування; Hu = людина; Cy = яванська макака; Mu = миша; n/a = не визначено

Приклад 5: Визначення афінності антитіл до KLK5

Кінетику зв'язування молекул IgG миші з KLK5 людини оцінювали методом поверхневого плазмонного резонансу (Biacore T200, (GE Life SciencesTM) при температурі 25 °C.

Fc-специфічне антитіло до мишачого IgG (Jackson ImmunoResearch) було іммобілізовано на сенсорному чіпі CM5 шляхом хімічного зв'язування амінів до рівня приблизно 7000 віднос. одиниць. Кожен цикл аналізу складався із захоплення молекул антитіла KLK5 IgG поверхнею Fc-фрагмента, ін'єкції аналіту KLK5 (приготованого на місці) протягом 300 с при 30 мкл/хв з подальшою дисоціацією впродовж 600 с. Наприкінці кожного циклу поверхню регенерували зі швидкістю 10 мкл/хв шляхом введення 50 mM соляної кислоти впродовж 60 секунд, подальшого введення 5 mM гідроксиду натрію впродовж 30 секунд та остаточного введення 50 mM соляної кислоти впродовж 60 секунд. Людський KLK5 титрували при 20 nM- 0,25 nM (4 × 3-кратні серійні розведення) у проточному буфері HBS-EP+ (4-(2-гідроксіетил)-1-піперазин етансульфонова кислота) (GE Healthcare), доведеному NaCl до кінцевої концентрації у 300 mM. Контрольні ін'єкції буферу були включені для видалення шуму та дрейфу.

Кінетичні параметри визначали за допомогою моделі зв'язування 1:1 за допомогою програмного забезпечення Biacore T200 Evaluation.

Афінність кролячих антитіл 10236 та 10273 наведена в таблиці 3.

Таблиця 3

Антитіла кролика/миші	ka (Ms ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (pM)
10236	3.00E+06	5.17E-04	172.3
10273	1.14E+06	1.84E-04	160.0

Приклад 6: Характеристика антитіла 10236

Зв'язування LEKTI з KLK5 у присутності антитіла 10236

Були проведені тести поверхневого плазмонного резонансу (ППР), щоб визначити, чи конкурує антитіло 10236 з білком LEKTI D5 за зв'язування з KLK5 людини. Ці аналізи дозволили порівняти афінність злиття антиген-зв'язуючого фрагмента LEKTI D5 окремо для білка KLK5 з людським KLK5 у комплексі з антитілом 10236.

Кінетичні вимірювання для зв'язування злитого білка антиген-зв'язуючого білка домену 5 LEKTI з KLK5 людини здійснювались за допомогою ППР-системи Biacore T200 (GE Life SciencesTM). Щоб підготувати поверхню, чіпи CM5 (GE Life SciencesTM) спочатку активували 5-хвилинною ін'єкцією (30 мкл/хв) суміші 1-Етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодііміду/N-Гідроксисукциніміду (GE Life SciencesTM), а потім ін'єкцією 100 мкг злитого антиген-зв'язуючого фрагмента у 1 мл домену 5 LEKTI (UCB) в ацетатному буфері, pH 5,0 (GE Life SciencesTM) для досягнення 80 умовних одиниць іммобілізованого злиття Fab-фрагменту домену 5 LEKTI на поверхні чіпа. Нарешті, для дезактивації поверхні використовували ін'єкцію 1 M етаноламіну гідрохлориду-гідрохлориду натрію при pH 8,5. Зростаючі концентрації KLK5 людини від 0,32 до 32 nM у буфері HBS-EP (GE Life SciencesTM) потім вводили в одноцикловому кінетичному режимі. Значення, отримані в результаті ін'єкцій лише буфера, віднімали від значень, отриманих під час введення KLK5, а кінетику визначали шляхом підгонки до моделі зв'язування 1:1 у програмі Biacore (GE Life SciencesTM).

Щоб визначити, чи людський LEKTI здатний зв'язуватись з людським KLK5, коли останній зв'язаний з кролячим антитілом 10236, поверхні для захоплення антитіла були підготовлені з використанням поліклонального Fc-фрагменту антитіла кози до імуноглобуліна кролика та Ab 10236, захопленого, як описано в прикладі 4. 20 nM людського KLK5 вводилось доки поверхня не досягала насичення. Потім вводили злитий білок Fab-фрагменту домену 5 LEKTI (отриманий, як описано в прикладі 1) у концентраціях від 30 pM до 100 nM. Значення, отримані від ін'єкцій лише буфера, спочатку віднімали від значень, отриманих для аналіта, перед підгонкою до кінетичної моделі зв'язування 1:1 у програмі BiacoreTM (GE Life SciencesTM).

З метою порівняння злитий білок Fab-фрагменту домену 5 LEKTI D5 Fab іммобілізувався на поверхні чіпа перед аналізом взаємодії з KLK5 людини. Злитий білок Fab LEKTI D5 людини був здатний зв'язуватися з KLK5 людини, коли останній вже перебував у комплексі з кролячим антитілом 10236 з афінністю 120 nM (Таблиця 4A).

Хоча афінність людського LEKTI до людського KLK5 за відсутності кролячого антитіла 10236 вища (40 pM), цей аналіз демонструє, що шляхом зв'язування людського KLK5 у присутності або відсутності людського LEKTI кроляче антитіло 10236 може забезпечити додаткову інгібіторну активність по відношенню до KLK5 людини.

Таблиця 4A

	ka (Ms ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (M)
Тільки KLK5 людини	5.70E+05	2.30E-05	4.00E-11
Антитіло 10236+KLK5 людини	5.90E+04	7.30E-03	1.20E-07

Утворення комплексу LEKTI-KLK5-антитіло 10236

KLK5 продукувався в клітинах HEK293 у якості секретованого білка з N-кінцевою розщепленою TEV-протеазою міткою 8xHis. Білок спочатку очищали від підготовленої середовища за допомогою афінної хроматографії Ni²⁺. Фракції з колонки Ni²⁺, що містить KLK5, об'єднували та розщеплювали TEV-протеазою для видалення мітки His, потім проводили другий етап афінності з використанням Ni для видалення TEV-протеази, дозволяючи розщепленому KLK5 протікати через колонку. Фракцію з другої колонки Ni²⁺, концентрували та пропускали через

колонку для ексклюзійної хроматографії у присутності 50 мМ Трис рН 7, 50 мМ хлориду натрію, 1 мМ ЕДТК, 5 % гліцерину. Фракції KLK5, отримані під час ексклюзійної хроматографії розмірів об'єднували та концентрували приблизно до 10 мг/мл та зберігали при температурі -80 °C.

домен 5 LEKTI (LEKTI D5 Fc) з послідовністю SEQ ID NO: 98 та домен 8 LEKTI (LEKTI D8 Fc) з послідовністю SEQ ID NO: 99 продукувалися в клітинах HEK293 у якості секретованих білків С-кінцевої розщепленої TEV-протеазою Fc-міткою. Ці білки очищали пропусканням підготовленого середовища через кульки протеїну А. Зв'язаний білок елюювали 0,1 М лимонною кислотою, рН 2,0, а фракції нейтралізували додаванням 2 М трис-НСІ, рН 8,5. Фракції з колонки протеїну А, що містять або домен 5 LEKTI, або домен 8, об'єднували, а Fc-мітку видаляли TEV-протеазою, щоб отримати LEKTI D5 або LEKTI D8. Розщеплений білок концентрували до ~15 мг/мл з метою проведення ексклюзійної хроматографії. Ексклюзійну хроматографію проводили з використанням фосфатно-сольового буферного розчину, рН 7,2. Фракції, що містять LEKTI, об'єднували та концентрували до ~10 мг/мл та зберігали в замороженому стані при температурі -80 °C.

Кроляче Fab-антитіло 10236 експресувалося в клітинах HEK293 як секретований білок. Експресивні конструкції, що містять SEQ ID NO: 87 і 89, були спільно трансфіковані в молярному співвідношенні 1:1. Секретований Fab-фрагмент антитіла (що містить послідовність SEQ ID NO: 86 і 88) очищали шляхом пропускання підготовленого середовища через кульки протеїну G та елюювання 0,1 М гліцином, рН 2,7. Фракції нейтралізували додаванням 2М Трис-соляної кислоти, рН8,5. Білок діалізували в фосфатно-сольовому буферному розчині, рН 7,2, потім концентрували до ~ 10 мг/мл та зберігали в замороженому вигляді при температурі -80 °C.

Комплекси KLK5, LEKTI D5 або LEKTI D8 та кролячого Fab-антитіла 10236 створювали шляхом спочатку інкубації 25 мкМ KLK5 з 25 мкМ LEKTI D5 або LEKTI D8 протягом 60 хвилин на льоду, потім додавали 25 мкМ кролячого Fab-антитіла 10236 та продовжували інкубацію ще 60 хвилин на льоду. Суміш вводили в ексклюзійну колонку Superdex 200®, врівноважену фосфатно-сольовим розчином при рН 7,2, яка послідовно використовувалась у ВЕРХ. Пікові фракції збирали для аналізу методом ДСН-ПААГ-електрофорезу. На малюнках 1А та 1В показано хроматограми ексклюзійної хроматографії за розміром окремо для KLK5 людини (суцільний слід, крайній праворуч), кролячого Fab-антитіла 10236 (пунктирна лінія), подвійного комплексу KLK людини + LEKTI D5 або D8 (малюнок 1А або 1В відповідно, довга риска), та потрійний комплекс KLK5+LEKTI D5 або D8 + кроляче Fab-антитіло 10236 (рис. 3А або 3В відповідно, коротка риска, крайній ліворуч).

Молекулярна маса (MW) компонентів кожного піку підтверджувалась методом ДСН-ПААГ-електрофорезу, як показано на малюнку 2.

Загалом, комплекси між KLK5, LEKTI D5 або LEKTI D8 та кролячим Fab-антитілом 10236 легко утворюються шляхом змішування людського KLK5 з кожним LEKTI-фрагментом окремо у співвідношенні 1:1:1, а потім інкубації подвійних комплексів з кролячим Fab-антитілом 10236. Подвійні та потрійні комплекси аналізувались методом ексклюзійної хроматографії за розміром чи методом ДСН-ПААГ-електрофорезу пікових фракцій. Отримані результати свідчать про те, що комплекси були стабільними та придатними для виділення/очищення від інших видів.

Приклад 7: Кристалізація комплексу KLK5/Fab-антитіло 10236

Людський KLK5 експресували тимчасовою трансфекцією за допомогою системи експресії Expi293™ (Life Technologies™) відповідно до протоколу виробника з додаванням кіфунензину (Sigma®) у кінцевій концентрації 5 мМ. Кіфунензин є потужним інгібітором ферменту манозидази І і в основному використовується в культурі клітин для отримання глікопротеїнів з високим вмістом манози.

Під час експресії KLK5 білок автоматично активується з утворенням активного білка KLK5 (залишки І67-S293 (нумерація у бібліотеці UniProt Q9Y337) з послідовністю SEQ ID NO: 53) у насадковій рідині. Клітини збирали через 5 днів після трансфекції, а супернатанти негайно використовували для очищення. Супернатанти, що містять активний людський KLK5, розбавляли в 4 рази буфером А (50 мМ Трис рН 7,0, 50 мМ хлориду натрію) та завантажували в катіонообмінну колонку HiTrap SP HP. Зв'язані білки елюювали сольовим градієнтом, отриманим у загальній кількості 10 об'ємів колонки, використовуючи буфер А (50 мМ Трис, рН 7,0, 50 мМ хлориду натрію) та буфер В (50 мМ Трис, рН 7,0, 1 М хлориду натрію). Фракції, що містять очищений активний людський KLK5, об'єднували, концентрували та додатково очищали методом ексклюзійної хроматографії на колонці S200 26/60, яка була врівноважена 20 мМ Трис, 150 мМ хлориду натрію, при рН 7,2.

KLK5 аналізувався методом ДНС-ПААГ та переміщався у положення на гелі з очікуваною молекулярною масою (MW) глікозильованого білка з високим вмістом манози ~ 35-38 кДа (рис. 3).

Білок KLK5 людини потім обробляли білком ендоглікозидази Н (Endo Н) у співвідношенні 1:100 та інкубували при температурі 4 °C протягом ночі з утворенням гомогенного деглікозильованого білка KLK5 для структурних досліджень. Ендоглікозидаза Н (Ендо Н) — це рекомбінантна глікозидаза, що є клоном бактерії *Streptomyces plicatus* та надекспресована в *E. coli*. Ендоглікозидаза Н відщеплює ядро хітобіози з високим вмістом манози та обмежену кількість гібридних олігосахаридів від N-пов'язаних глікопротеїнів. Вона не розщеплює складні глікани. Ферментативне розщеплення відбувається між двома залишками N-ацетилглюкозаміну в діацетилхітобіозному ядрі олігосахариду, залишаючи один залишок N-ацетилглюкозаміну на аспарагіні. Цей етап виконувався, щоб переконатися у тому, що гомогенний людський KLK5 доступний для кристалографічних досліджень. KLK5 був охарактеризований за допомогою ДНС-ПААГ (рис. 3) та переміщався у положення на гелі, що відповідає очікуваній молекулярній масі (MW) деглікозильованого білка ~ 25 кДа.

Fab-фрагмент кролячого антитіла 10236 експресували методом, що описаний в прикладі 6. Fab-фрагмент кролячого антитіла 10236 (що містить послідовність SEQ ID NO: 86 і 88) експресували, експресували методом, що описаний в прикладі 6. Коротше кажучи, експресивні конструкції, що містять послідовність SEQ ID NO: 87 та 89, спільно трансфікувались в молярному співвідношенні 1:1. Fab-фрагмент кролячого антитіла 10236 очищали шляхом пропускання кондиціонованого середовища через кульки протеїну G та елюювання 0,1 М гліцином, рН

2,7. Фракції нейтралізували додаванням 2М Трис-НСІ, рН8,5. Відповідні окремі білки діалізували в ФСБ, рН 7,2, концентрували до ~ 10 мг/мл та зберігали в замороженому стані при температурі -80 °С.

Виготовлялась суміш людського KLK5/ Fab-фрагменту кролячого антитіла 10236 у молярному співвідношенні 1,5:1. Суміш інкубувалась при температурі 4 °С протягом ночі та очищалась методом ексклюзійної хроматографії (20 мМ Трис, 150 мМ NaCl, буфер для елюції рН 7,2). Утворений комплекс виділяли і концентрували до ~10,0 мг/мл перед кристалізацією.

Умови кристалізації для комплексу KLK5 людини/ Fab-фрагменту кролячого антитіла 10236 визначались за допомогою кількох екранів для кристалізації. Ідентифікація поводитись у форматі сидячої каплі, використовуючи 96-лункові 2-крапельні планшети для кристалізації MRC Swissci надані компанією Molecular Dimensions, кат. № MD11-00-100). Спочатку резервуари заповнювали 75 мкл кожного кристалізаційного розчину за допомогою системи обробки рідин Microlab STAR (Hamilton). Потім 300 нл комплексу людського KLK5/кролячого Fab антитіла 10236 та 300 нл резервуарних розчинів розподіляли між лунками кристалізаційних планшетів за допомогою рідинного маніпулятора Mosquito (TTP LabTech). Монокристал був отриманий в положенні 88 (лунка H4) протеїнового комплексу ProComplex Suite виробництва Qiagen). Це положення містить 1,4 М малонату натрію. Кристали на короткий час переносили в краплю, що містить 1,4 М малонат натрію та 25 % гліцерину. Кристал швидко заморожували в рідкому азоті, а дані дифракції збирали у каналі випромінення I03 (Diamond Light Source, Великобританія). Дані індексували та заносили за допомогою програми XDS (Кабш, В. XDS. Acta Cryst. D66, 125-132 (2010)), з подальшим масштабуванням за допомогою програми AIMLESS (Еванс П.Р., Муршудов Г.Н. Наскільки достовірні мої данні та яка розподільча здатність). Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2013;69 (частина 7):1204–1214). Структура комплексу людського KLK5/ антиген-зв'язуючого фрагменту кролячого антитіла 10236 визначалась шляхом молекулярної заміни за допомогою програми Phaser (Маккой, А.Дж., Гроссе-Кунстлев, Р.В., Адамс, П.Д., Вінн, М.Д., Стороні, Л.К. та Рід, Р.Джей. кристалізаційна програма Phaser. Journal of Applied Crystallography (2007). 40, 658-674) у програмному комплексі Phenix (Адамс П.Д., Афонін П.В. Бункозці Г. та ін. Програма Phenix для автоматизованого визначення макромолекулярних структур. Методи. 2011; 55 (1):94–106). У цій процедурі структури KLK5 та антиген-зв'язуючого фрагменту антитіла 10236, що спостерігаються в нашій кристалічній структурі KLK5 в комплексі з антиген-зв'язуючим фрагментом кролячого антитілами 10273 і 10236, використовувались як моделі молекулярної заміни. Кристалізаційну об'єктно-орієнтовану програму Coot (П. Емслі; Б. Локамп; В. Г. Скотт; Коутан (2010). "Особливості та розробка Coot". Acta Crystallographica. D66: 486–501) та phenix.refine (автоматизоване уточнення кристалізаційної структури за допомогою програми phenix.refine. П.В. Афонін, Р. В. Гроссе-Кунстлев, Н. Еколс, Дж. Дж. Хедд, Н.В. Моріарті, М. Мустякімов, Т.С. Тервільгер, А. Уржумцев, П.Х. Зварт та П.Д. Адамс Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 68, 352-67 (2012)) використовувались в наступних циклах ручного доопрацювання та уточнення моделі.

Таблиця 4В показує статистику вдосконалення на момент першого опису винаходу.

Таблиця 4В

Данні	
Розподільча здатність (Å)	123.01-2.70 (2.83-2.70)
Просторова група	I 2 3
Параметри комірки	
a=b = c (Å)	137.96
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90.00
R _{merge} (%)	5.70 (75.4)
R _{meas} (%)	5.80 (77.4)
R _{pim}	1.30 (16.7)
Середня інтенсивність I/ σ (I)	48.5 (6.6)
Повнота	100.0 (100.0)
Кількість унікальних відображень	24174 (3190)
Множинність	40.8 (41.5)
В-фактор Вільсона (Å ²)	77.528
Статистика за іншими параметрами	
Кількість атомів білка/розчинника	4826/12
R роб./вільний (%)	21.19/25.8
Кількість відображень у "вільному" наборі	3302
Середньоквадратичне відхилення від ідеальних значень	
Зв'язки (Å)	0.004
Кути (°)	0.764
Середній білковий фактор B (Å ²)	89.06

У кристалічній асиметричній структурі спостерігали єдиний комплекс антитіла 10236 людини KLK5/ антиген-зв'язуючого фрагменту кролячого антитіла. На рисунку 4В показано, що сайт зв'язування антитіла з KLK5 відрізняється від сайту зв'язування субстрату. Система аналізу NCONT у програмному комплексі CCP4 використовувалась для визначення епітопу на KLK5, що визначається за молекулою Fab 10236. Нумерація амінокислот KLK5 включає номер Q9Y337 у базі даних UnitProtKB та стандартну нумерацію протеаз на основі хімотрипсинугену в дужках.

Епітоп KLK5 людини, зв'язаний з антиген-зв'язуючим фрагментом кролячого антитіла 10236 на контактній відстані 4 Å, складається із залишків Arg87 (36), Ala107 (56), Arg110 (59), Lys111 (60), Lys112 (61), Val113 (62), Val137 (86), Lys138 (87), Ser139 (88), Ile140 (89), Pro141 (90), His142 (91), Pro143 (92), Tyr145 (94), Ser146 (95), His147 (96) з послідовністю SEQ ID NO: 51, тоді як цифри в дужках відповідають номенклатурі протеаз. Сайт зв'язування більш детально показаний на малюнку 4A.

Щоб візуалізувати сайт зв'язування Fab10236 по відношенню до активного сайту KLK5, описана у цьому документі структура KLK5-Fab10236 накладалась на структуру KLK5 із зв'язаним лейпептином в активному сайті (2PSX) (Рисунок 4B). Накладення показує, що Fab10236 не зв'язується в KLK5 в ядрі активного сайту, як визначено положенням лейпептину (рисунок 4B), однак легкий ланцюг Fab10236 утворює контакт із 99-петлею, яка формує частину щілини активного сайту на KLK5. Представлену тут структуру KLK5-Fab10236 порівняли з раніше опублікованими структурами KLK5, такими як PDB ID 2PSX і 2PSY. Кристалічна структура 2PSX демонструє, що KLK5 зв'язаний з пептидним інгібітором протеази лейпептином у його активному сайті, тоді як кристалічна структура 2PSY показує KLK5, зв'язаний з лейпептином, а також іоном цинку, який примикає до активного сайту. Відомо, що цинк інгібує KLK5 неконкурентним способом. Під час порівняння структур 2PSX та 2PSY було виявлено, що цинк впливає на активність протеази, спричиняючи зрушення в структурі петлі 99-петлі, що супроводжується значними позиційними змінами в бічних ланцюгах His147(96) і His150(99). Рух 99-петлі основного ланцюга показано на структурному накладенні (Рис. 4C, білий без цинку а чорний з цинком), а також рухи бічного ланцюга гістидину, зокрема зміщення His147(99) із зовнішнього положення за відсутності цинку до внутрішнього положення, коли цинк зв'язаний (рис. 4C, пунктирні стрілки вказують на рух бічного ланцюга гістидину).

Накладення структури KLK5-Fab10236 на структуру лейпептину KLK без цинку (2PSX) демонструє основні рухи 99-петлі та рух бічного ланцюга His147(96) та His150(99) (На рисунку 4D детально показана 99-петля та бічні ланцюги гістидину – чорний колір – це структура KLK5-Fab10236, а білий колір – структура KLK5-лейпептину без цинку).

Після зв'язування Fab10236 з KLK5, ген His147(96), розташований у 99-петлі, не приймає структуру, яка раніше спостерігалася в кристалічній структурі 2PSX, оскільки це призведе до просторових конфліктів із легким ланцюгом Fab-фрагменту (пунктирний квадрат, рис. 4D). Щоб пристосуватись до зв'язування з Fab10236, 99-петля приймає іншу структуру з геном His147(96), коливаючись із зовнішнього у внутрішнє положення (подібно до того, що спостерігається під час зв'язування цинку; Рисунок 4D, пунктирна стрілка, що вказує на рух His147(96)). Одночасно бічний ланцюг His150(99) зміщується до кишені S2, де він може блокувати зв'язування субстрату. Як показано на малюнку 4D, кишеня S2 зайнята змодельованим лейпептином, а зіткнення між бічним ланцюгом His150(99) і лейпептином виділено білим пунктирним колом.

Приклад 8: Кристалізація комплексу KLK5/Fab-фрагмент кролячого антитіла/Fab-фрагмент кролячого антитіла 10273

Людський KLK5 експресували таким ж чином, що наведений у прикладі 7, за винятком того, що після завантаження супернатанту в катіонообмінну колонку HiTrap SP HP зв'язані білки елюювали градієнтом буфера В (50 мМ Трис, pH 7,0, 1 М NaCl) у 10 ти кратному об'ємі колонки. Подальше очищення, обробку ендоглікозидазою та аналітичну характеристику проводили методом, визначеним у прикладі 7.

Кроляче Fab-фрагмент кролячого антитіла 10236 експресували, як визначено у прикладі 6. Fab-фрагмент кролячого антитіла 10273 (включає SEQ ID NO: 90 і 92) клонувався методом, визначеним для кролячого Fab-фрагменту кролячого антитіла 10236. Коротше кажучи, експресивні конструкції, що містять послідовність SEQ ID NO: 91 і 93, спільно трансформувались у молярному співвідношенні 1:1. Секретовані білки очищали шляхом пропускання кондиціонованого середовища через кульки протеїну G та елюювання 0,1 М гліцином, pH 2,7. Фракції нейтралізували додаванням 2М Трис-HCl, pH8,5. Білок діалізували в фосфатно-сольовому буферному розчині, pH 7,2, потім концентрували до ~ 10 мг/мл і зберігали в замороженому вигляді при температурі -80 °C.

Комплекс людського KLK5/ Fab-фрагменту кролячого антитіла 10273/ Fab-фрагменту кролячого антитіла 10236 у співвідношенні 1:1,5:1,5 виготовлявся, інкубувався при температурі 4 °C протягом ночі та очищався за допомогою ексклюзійної хроматографії (20мМ Трис, 150мМ NaCl, pH 7,2 буфер для елюції). Один пік, що містив комплекс, концентрували до ~10,8 мг/мл перед кристалізацією.

Умови кристалізації для комплексу людського KLK5/ Fab-фрагменту кролячого антитіла 10273/ Fab-фрагменту кролячого антитіла 10236 визначались за допомогою кількох екранів для кристалізації. Ідентифікація поводитись у форматі сидячої каплі, використовуючи 96-лункові 2-крапельні планшети для кристалізації MRC Swisssi надані компанією Molecular Dimensions, кат. № MD11-00-100). Спочатку резервуари заповнювали 75 мкл кожного кристалізаційного розчину за допомогою системи обробки рідин MicroLab STAR (Hamilton).

Потім 300 нл комплексу людського KLK5/Fab-фрагменту кролячого антитіла 10273/ Fab-фрагменту кролячого антитіла 10236 та 300 нл резервуарних розчинів розподіляли між лунками кристалізаційних планшетів за допомогою рідинного маніпулятора Mosquito (TTP LabTech).

Монокристал був отриманий у положенні 16 (лунка B4) на екрані MIDAS+HT-96 (Molecular Dimensions, кат. № MD1–107). Це положення містить 45 % пропоксилату пентаеритриту (5/4), 0,2 М NaCl та 0,1 М моногідрату 2-морфоліноетансульфонової кислоти (MES) pH 6,0. Дані дифракції збирали у каналі випромінювання I03 (Diamond Light Source, Великобританія). Дані індексували та заносили за допомогою програми XDS (Кабуш, В. XDS. Acta Cryst. D66, 125-132 (2010)), з подальшим масштабуванням за допомогою програми AIMLESS (Еванс П.Р., Муршудов Г.Н. Наскільки достовірні мої данні та яка розподільча здатність). Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2013;69 (частина7):1204–1214). Структура комплексу людського KLK5/кролячого Fab-антитіла 10236 визначалась шляхом молекулярної заміни за допомогою програми Phaser (Маккой, А.Дж., Гроссе-Кунстлев, Р.В., Адамс, П.Д., Вінн, М.Д., Стороні, Л.К. та Рід, Р.Джей. кристалографічна програма Phaser. Journal of Applied Crystallography (2007). 40, 658-674) у програмному комплексі Phenix (Адамс П.Д., Афонін П.В. Бункозчи Г. та ін. Програма Phenix для автоматизованого визначення макромолекулярних структур. Методи. 2011; 55 (1):94–106). У цій процедурі

структуру KLK5 2PSX (Дебела М., Геттіг П., Маглолен В., Хубер Р., Шехтер Н.М., Бодє В. Структурна основа інгібування цинку калікреїном людської тканини 5. J Mol Biol., 2 листопада, 2007 р.;373(4):1017-31) та запатентовану модель Fab-фрагменту використовували як шаблони молекулярної заміни.

Програма Coot (П. Емслі; Б. Локамп; В. Г. Скотт; Коутан (2010). "Особливості та розробка Coot. Acta Crystallographica. D66: 486–501) та phenix.refine (автоматизоване уточнення кристалографічної структури за допомогою програми phenix.refine. П.В. Афонін, Р. В. Гроссе-Кунстлеве, Н. Еколс, Дж. Дж. Хедд, Н.В. Моріарті, М. Мустякімов, Т.С. Тервільгер, А. Уржумцев, П.Х. Зварт та П.Д. Адамс, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 68, 352-67 (2012)) використовувались в наступних циклах ручного доопрацювання та уточнення моделі для отримання допустимого значення R-фактору (Rwork, Rfree) та статистичних даних Рамачандрана (з використанням Molprobity Уільямс та ін.(2018) MolProbity: більш та кращі данні для покращеної перевірки повноатомної структури. Protein Science 27: 293-315)).

Комплекс KLK5 людини/кролячого Fab-антитіла 10273/кролячого Fab-антитіла 10236 спостерігали в кристалічній асиметричній структурі. Система NCONT у програмному комплексі CCP4 використовувалась для визначення епітопів на KLK5, що визначались за молекулами Fab10273 і Fab10236. Нумерація амінокислот KLK5 заснована на записі Q9Y337 у базі даних UnitProtKB зі стандартною нумерацією протеаз на основі хімотрипсинугену в дужках. В таблиці 4С вказана уточнена статистика на момент першого опису винаходу.

Таблиця 4С

Данні	
Розподільча здатність (Å)	87.77-2.45 (2.51-2.45)
Просторова група	I 1 2 1
Параметри комірки	
a, b, c (Å)	76.97, 93.19, 261.27
β (°)	91.00
Rmerge (%)	4.10 (52.9)
Rmeas (%)	5.70 (72.4)
Rpim	4.00 (49.2)
Середня інтенсивність I/ σ (I)	13.3 (1.9)
Повнота	99.3 (99.9)
Кількість унікальних відображень	67522 (4551)
Множинність	3.5 (3.4)
В-фактор Вільсона (Å ²)	62.535
Статистика за іншими параметрами	
Кількість атомів білка/розчинника	7924/84
R роб./вільний (%)	22.89/27.68
Кількість відображень у "вільному" наборі	3302
Середньоквадратичне відхилення від ідеальних значень	
Зв'язки (Å)	0.011
Кути (°)	1.158
Середній білковий фактор B (Å ²)	69.33

На контактній відстані 4 Å епітоп KLK5 людини, зв'язаний з Fab-фрагменту кролячого антитіла 10236, складається із залишків Arg87 (36), Ala107 (56), Arg110 (59), Lys111 (60), Val112 (61), Val113 (62), Val137 (86), Lys138 (87), Ser139 (88), Ile140 (89), Pro141 (90), His142 (91), Pro143 (92), Tyr145 (94), Ser146 (95) та His147 (96) з послідовністю SEQ ID NO: 51, тоді як цифрами в дужках позначена номенклатура протеаз. Місце зв'язування більш детально показано на малюнку 4D.

Як показано на малюнку 5, антитіла 10236 і 10273 мають дуже чіткі сайти зв'язування, які не перекриваються, і зв'язують різні епітопи на KLK5 людини.

Приклад 8: Гуманізація та характеристика антитіла 10236

Гуманізація антитіла Ab 10236

Кроляче антитіло 10236 гуманізували шляхом прищеплення CDR-ділянок з V-областей кролика на каркасах варіабельних областей антитіла зародкової лінії людини. Щоб відновити активність антитіл, ряд каркасних залишків з варіабельних областей кролика також залишали в гуманізованій послідовності. Ці залишки відбирались за протоколом, викладеним у роботі Адаїра та ін. (1991) (Гуманізовані антитіла. WO91/09967). Вирівнювання послідовностей варіабельної області (донорської) антитіла кролика з послідовностями варіабельної області зародкової лінії (акцепторна) людини показано на малюнках 6 та 7 разом із розробленими гуманізованими послідовностями. Ділянки, що визначають комплементарність (CDR), приєднані від донорської до акцепторної послідовностей, визначені Кабатом (Кабат та ін., 1987 р), за винятком ділянки CDR-H1, до якої застосовується комбіноване визначення Чозія/Кабат (див. Адаїр та ін., 1991 р. Гуманізовані антитіла). WO91/09967).

Для антитіла 10236 людська варіабельна область IGKV1-6 плюс JK4 J-область (IMGT, <http://www.imgt.org/>) була обрана у якості акцептора для CDR-ділянок легкого ланцюга. Каркасні залишки в гуманізованих трансплантатах легкого ланцюга 10236 усі походять із гена зародкової лінії людини, за винятком одного або кількох залишків із групи, що включає залишки 2, 3 та 63, де були збережені донорні залишки представлені тирозином (Y2), аспарагіновою кислотою (D3) та лізином (K63) з послідовністю SEQ ID NO: 15 (рисунок 6).

Збереження донорських залишків Y2 і D3 відіграло важливу роль для забезпечення максимальної афінності зв'язування з KLK-5 людини.

Людська варіабельна область IGHV4-4 плюс J-область JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) використовувались у якості акцептору для CDR-ділянки важкого ланцюга антитіла 10236. Як і багато кролячих антитіл, ген варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла 10236 коротше, ніж обраний акцептор людини. При вирівнюванні з акцепторною послідовністю людини в каркасі 1 варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла 10236 був відсутній N-кінцевий залишок, який зберігається в гуманізованому антитілі (рис. 7). Каркас 3 варіабельної ділянки важкого ланцюга кролячого антитіла 10236 також не має двох залишків (75 і 76) у петлі між ланцюгами бета-структур D та E: у гуманізованих трансплантатах проміжок заповнено відповідними залишками (лізін 75, K75; аспарагін 76, N76) вибраної людської акцепторної послідовності (рис. 7) або у якості альтернативного варіанту лізином та треоніном (лізін 75, K75; треонін 76, T76). Каркасні залишки в гуманізованих трансплантатах важкого ланцюга антитіла 10236 усі походять із послідовності гена зародкової лінії людини, за винятком одного або кількох залишків із групи, що включає залишки 67, 71, 73 та 78, де залишалися такі донорські залишки, як фенілаланін (F67), глутамін (Q71), серин (S73) та валін (V78) з послідовністю SEQ ID NO: 39. Збереження донорських залишків Q71, S73 і V78 було важливим для забезпечення максимальної афінності зв'язування з KLK-5 людини. Залишок глутаміну в положенні 1 каркаса людини був замінений на глутамінову кислоту (E1), щоб забезпечити експресію та очищення однорідного продукту: повідомляється про перетворення глутаміну в піроглутамат на N-кінці антитіла та фрагментів антитіла. Теоретична ізоелектрична точка гуманізованих антитіл 10236 становить від ~6,3 до 6,6. Щоб полегшити видалення домішок за допомогою іонообмінної хроматографії під час подальшої обробки, ізоелектрична точка була збільшена за рахунок мутації залишку 24 у ділянці CDRL1 трансплантованого gL6 з глутаміну (Q) на залишок аргініну (R) або лізину (K).

Гуманізовані трансплантати тестували за допомогою кролячих/людських антитіл 10236, щоб оцінити, чи вплинули процедури гуманізації на їх спорідненість. Кроляче/людське антитіло 10236 було клоновано на модифікованій версії людського С-каппа-вектора, що містить мутацію S171C, щоб відтворити додатковий дисульфідний зв'язок, виявлений у варіабельних ділянках легких каппа-ланцюгів, відсутніх у константних областях людини, у результаті створення кролячого/людського антитіла 1023 з послідовністю SEQ ID NO: 96 та 97.

Вимірювання афінності гуманізованих трансплантатів Ab 10236.

Специфічне Fc-антитіло проти людського IgG (Jackson ImmunoResearch) було іммобілізовано на сенсорній матриці CM5 за допомогою хімічного зв'язування амінів до рівня приблизно 6000 відносних одиниць. Кожен цикл аналізу складався із захоплення молекул KLK5 антитіла IgG поверхню Fc-фрагмента, ін'єкції аналізу KLK5 (приготованого на місці) протягом 180 с при 30 мкл/хв з подальшою дисоціацією впродовж 600 с. Наприкінці кожного циклу поверхню регенерували зі швидкістю 10 мкл/хв шляхом введення 50 mM соляної кислоти впродовж 60 секунд, подальшого введення 5 mM гідроксиду натрію впродовж 30 секунд та остаточного введення 50 mM соляної кислоти впродовж 60 секунд. Людський KLK5 титрували при 20 nM- 0,08 nM (5 × 3-кратні серійні розведення) для супернатанту в потоковому буфері HBS-EP+ (GE Healthcare®), доданому до кінцевої концентрації 300 mM NaCl. Контрольні ін'єкції буферу були включені для видалення шуму та дрейфу.

Кінетичні параметри визначали за допомогою моделі зв'язування 1:1 за допомогою програмного забезпечення Biacore T200 Evaluation (версія 3.0). Досліди проводили при температурі 25 °C.

Химерні антитіла кролика/людини аналізували на початку та в кінці аналізу. Отримані результати показали високу точність. Високоякісні данні були отримані по всіх зразках, як визначено в таблиці 5.

Таблиця 5

Антитіло 10236	Донорські залишки легкого ланцюга	Мутації легкого ланцюга	Донорські залишки важкого ланцюга	Константа асоціації (1/Mc)	Константа дисоціації (1/c)	Рівноважна константа дисоціації (nM)
Химерне антитіло кролика/людини 10236	-		-	2.69E+06	4.51E-04	167.9
Химерне антитіло кролика/людини 10236	-		-	2.70E+06	44.09E-04	151.7
Химерне антитіло кролика/людини 10236*				3.00E+06	5.17E-04	172.3
gL5 gH9	Y2, D3, K63		Q71, S73, T76, V78	1.92E+06	9.29E-04	484.5
gL5 gH10	Y2, D3, K63		S73, T76, V78	1.97E+06	1.07E-03	545.6
gL5 gH11	Y2, D3, K63		Q71, T76, V78	1.69E+06	8.11E-04	480.6
gL5 gH12	Y2, D3, K63		Q71, S73, V78	2.03E+06	6.69E-04	330.6
gL6 gH9	Y2, D3		Q71, S73, T76, V78	1.91E+06	9.10E-04	475.2
gL6 gH10	Y2, D3		S73, T76, V78	1.93E+06	1.05E-03	541.5
gL6 gH11	Y2, D3		Q71, T76, V78	1.69E+06	8.02E-04	475.4
gL6 gH12	Y2, D3		Q71, S73, V78	2.04E+06	6.60E-04	323.9
gL6 gH12 ^s	Y2, D3		Q71, S73, V78			299

gL6 Q24R gH12	Y2, D3	Q24R	Q71, S73, V78	2.01E+06	6.69E-04	333.4
gL6 Q24K gH12	Y2, D3	Q24K	Q71, S73, V78	2.04E+06	6.87E-04	336.5

* як описано в прикладі 4 і таблиці 3; \$: середнє значення за 2 прогони (Таблиця 15).

Як показано в Таблиці 5, трансплантат 10236gL6gH12, з мутаціями Q24R/K або без них, зберігав високу афінність до людського KLK5.

Аналіз гуманізованих антитіл

Селективність КЛК5

Було проведено ряд досліджень, щоб переконатися, що гуманізація кролячого антитіла 10236 не змінила селективність KLK5 порівняно з іншими калікреїнами, та не зменшила афінність або інгібіторну активність.

Потім очищені антитіла перевіряли для підтвердження їхньої інгібіторної активності проти KLK5 відповідно до методів, описаних у прикладі 4. Антитіла тестували на 10-точковій серії розведень із діапазоном від 600 нМ до 20 пМ. За допомогою системи Beckman Coulter FXTM та системи Multidrop, 5 мкл кожного антитіла переносили на чорні 384-лункові планшети для аналізу (Corning™, кат. № 3575) та 15 мкл вибраних активних рекомбінантних ферментів калікреїну в буфері для аналізу А (150 мМ хлориду натрію, 50 мМ). Трис, 200 мкМ ЭДТК, 0,05 % (об./об.) полісорбату Tween-20, рН 7,6 додавали у відповідні лунки для забезпечення наступних кінцевих концентрацій аналізу: 60 пМ людського KLK5 (UCB), 250 пМ KLK7 (UCB), 500 пМ KLK2 (R&D Systems™), 30 пМ KLK4 (UCB), 30 пМ супо KLK5 (UCB), 500 пМ KLK7 яванської макаки, 30 пМ мишачого KLK5 (UCB) та 5 нМ мишачого KLK7 (UCB). Ферменти, отримані від UCB, вказані в дужках та підготовлювались методом, описаним у прикладі 1. Джерело комерційно доступних ферментів зазначено в дужках.

В якості контролю в лунки додавали лише 20 мкл аналітичного буфера А (без білка KLK) для 0 % активності. Fc-фрагмент домену 5 кролячого LEKTI (отриманий від UCB, яка зазначено вище) використовували у якості еталону для інгібування активності. 5 мкл Fc-фрагменту домену 5 кролячого LEKTI у тому ж діапазоні концентрацій, що використовувався для антитіла 10236, додавали до 15 мкл ферментів калікреїну. 15 мкл відповідних активних білків калікреїну людини додавали до 5 мкл аналітичного буфера А для отримання 100 % еталонної активності. Наступні пептидні субстрати додавали за допомогою диспансеру Multidrop: Boc-VPR-AMC (Cambridge Research Biochemicals™) для людського KLK5 (300 мкМ), людського KLK2 (30 мкМ), мишачого KLK5 (300 мкМ) та KLK5 яванської макаки (450 мкМ); KHLF-AMC (Cambridge Research Biochemicals™) для KLK7 людини та яванської макаки (90 мкМ і 150 мкМ відповідно), PFR-AMC (R&D Systems™) для KLK4 людини (200 мкМ) та пептидний субстрат Mca-RPKPVE-Nval-WRK(Dnp)-NH2 (R&D Systems™) для мишачого KLK7 (150 мкМ).

Зразки інкубували протягом 4 годин та аналізували за допомогою планшетного аналізатора Pherastar FSX (BMG Labtech™) при фотолюмінесценції 380 нм та 430 нм для флюороогенного пептидного субстрату Boc-VPR-AMC, PFR-AMC та KHLF-AMC, а також при 320 нм і 400 нм для субстрату Mca-RPKPVE-Nval-WRK(Dnp)-NH2. Дані аналізувались з метою визначення відсотка інгібування, як описано в прикладі 3. Дані наносили на графік з урахуванням концентрації досліджуваного антитіла та 4-параметричну сигмоподібну криву для визначення концентрації напівмаксимального інгібування (IC50) (Genedata Screener™).

Гуманізовані трансплантати Ab 10236 зберігали специфічну інгібіторну активність для KLK5 та демонстрували незначне інгібування інших протестованих членів родини KLK або взагалі не інгібували його. Ab 10236 gL6gH12 є потужним інгібітором KLK5 людини та яванської макаки (Таблиця 6 кожне значення визначалось окремо), зберігаючи таку ж саму ефективність, що і вихідне негуманізоване антитіло. Жодної активності (тобто нижче 40 % порогу відповідно до критеріїв відбору в прикладі 2) не було виявлено щодо KLK2, 4 та 7 людини, KLK7 яванської макаки, KLK5 миші або KLK7 миші (Рисунок 8).

Таблиця 6

	Концентрація напівмаксимального інгібування KLK5 людини	Концентрація напівмаксимального інгібування KLK5 яванської макаки
Ab10236gL6gH12	7.65E-10	1.05E-10
	1.42E-10	4.77E-10
	6.63E-10	1.30E-10
	5.86E-10	8.24E-11
	1.03E-10	
Fc-фрагмент LEKTI D5 кролика	7.44E-11	
		n/a

n/a = не визначено

Зв'язування LEKTI з KLK5 у присутності гуманізованого антитіла 10236

Експерименти з використанням поверхневого плазмонного резонансу (SPR), як описано в Прикладі 5, проводились для визначення афінності LEKTI до KLK5 у комплексі з гуманізованим антитілом 10236 gL6gH12, який створювався для батьківського кролячого антитіла 10236.

При цьому використовувались експериментальні умови, описані в прикладі 5, за винятком того, що була підготовлена поверхня матриці для Fc-фрагменту людського антитіла. Отримані результати викладені у таблиці 6.

Подібно до батьківського кролячого антитіла 10236, злитий білок Fab-фрагменту LEKTI D5 був здатний зв'язуватися з KLK5, який уже перебуває в комплексі з антитілом 10236 gL6gH12, але має нижчу афінність, ніж окремо людський KLK5 (Таблиця 7, 540 нМ проти 40 пМ).

Таблиця 7

	ka (Ms ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (M)
Людський KLK5	5.70E+05	2.30E-05	4.00E-11
10236 gL6gH12 + людський KLK5	2.90E+04	1.60E-03	5.40E-07

Клітинний аналіз KLK5-PAR2

Було продемонстровано, що KLK5 активує активовані протеазами рецептори-2 (PAR2) на поверхні кератиноцитів (К. Ойкономопулу та ін. Клітинна сигналізація за допомогою калікреїну: активовані протеїназою рецептори (PAR). *Biol Chem*, 387 (2006), стор. 817-824). Це призводить до каскаду запальних реакцій, спричинених ядерним фактором-KB (NFkB), і вивільнення відповідних цитокінів, таких як тимусний стромальний лімфоцитин (ТСЛП).

Оскільки PAR2 є сполученням з G/Gs-білком рецептором (GPCR), активація призводить до сигналізації фосфоліпази та генерації інозитолмонофосфату (IP-1). Контроль активації ендогенного PAR2, що експресується на кератиноцитах HaCat під впливом KLK5, здійснювався шляхом виявлення праймеру IP1 за допомогою набору реагентів для аналізу від компанії Cisbio.

Злиті клітини HaCat збирали та висівали на планшеті 384 Fluoblock (CorningTM) у кількості 10 000 клітин на лунку та культивували в середовищі DMEM (середовище Ігла, модифіковане за способом Дульбекко) + 10 % фосфатно-буферного розчину + 2мМ L-глутаміну + пеніциліну/стрептоміцину (Life TechnologiesTM) при температурі 37 °C, 5 % CO₂ протягом ночі, після чого їх обробляли згідно з протоколом аналізу IP-One Gq (CisbioTM). Антитіла (антитіло 10236 gL6gH12 і негативний людський IgG4 A33), що підлягали аналізу, послідовно розводили в однократному стимуляційному буфері В (набір для аналізу IP-One Gq, CisbioTM) від максимальної концентрації 2 мкМ та інкубували протягом 1 години при температурі 37°C у присутності 200 нМ людського KLK5. Суміш антитіла/KLK5 додавали у клітину HaCat та інозитол-1-фосфат (IP1) виявляли згідно з протоколом аналізу IP-One Gq шляхом вимірювання рівня флуоресценції при 665 нМ і 620 нМ за допомогою спектрофотометру Synergy Neo.

Антитіло 10236 gL6gH12 було здатне майже повністю інгібувати вивільнений IP1 з клітин HaCat, оброблених KLK5 (рисунком 9), демонструючи подібне максимальне інгібування IP1 до білка Fc-антитіла LEKTI D5 кролика.

Механізм дії антитіла 10236

Були проведені експерименти для визначення механізму дії інгібіторних антитіл. Неконкурентні інгібітори ферментів знижують активність ферменту, але здатні однаково добре зв'язуватись з ферментом як у присутності, так і за відсутності субстрату. Інгібітор та субстрат здатні зв'язувати фермент одночасно, але при цьому не утворюють продукт, в результаті чого комплекс фермент-субстрат-інгібітор здатний розділитися лише на комплекси фермент-субстрат або фермент-інгібітор. У випадку неконкурентних інгібіторів, збільшення концентрації субстрату не впливає на швидкість інгібування.

Антитіло 10236 gL6gH12 або білок Fc LEKTI D5 кролика готували в аналітичному буфері (150 мМ NaCl, 50 мМ Трис, 200 мкМ ЕДТК, 0,05 % (об./об.) буферу Tween-20, рН 7,6) при 300, 30 або 3-кратній концентрації напівмаксимального інгібування для KLK5 людини. 10 мкл антитіла 10236 gL6gH1 переносили у 384-лунковий чорний планшет з низькими краями (Corning[®]). 10 мкл 5-точкового серійного розведення 30 мМ – 300 мкМ субстрату Вос-VPR-AMC (Cambridge Research BiochemicalsTM) додавали в планшет. Спектрофотометр Pherastar FSX (BMG LabtechTM) використовувався для одночасного запуску реакції шляхом введення 10 мкл 1,8 нМ KLK5 людини (Вос-VPR-AMC < 1 мМ) або 180 пМ KLK5 (Вос-VPR-AMC > 1 мМ) та контролю флуоресценції (lex380 нм лем430 нм) кожні 30 секунд. Кінцеві реакції містили антитіло 10236 gL6gH12 або білок Fc LEKTI D5 кролика із 100, 10 та 1-кратною концентрацією напівмаксимального інгібування (IC₅₀) для людського KLK5, серійним розведенням пептидного субстрату Вос-VPR-AMC у межах між 10 мМ та 100 мкМ та 60 або 600 пМ для людського KLK5. Антитіло замінялось аналітичним буфером для визначення неінгібованого контролю, а фермент замінявся буфером для встановлення фонового контролю.

Дані аналізували шляхом віднімання фонові флуоресценції в кожній часовій точці та побудови графіка флуоресценції по відношенню до часу. Отримані данні підставлялись у наступне рівняння (GraphPad Prism[®], програма GraphPad):

$$y = v_s \cdot x + \left(\frac{v_i - v_s}{k_{obs}} \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot x}) \right)$$

Ця формула дозволяє визначити k_{obs} , ступінь інгібування в залежності від часу, де v_i - початкова швидкість реакції, а v_s — кінцева швидкість. Значення k_{obs} наносились на графік залежно від концентрації субстрату для визначення механізму інгібування.

Швидкість інгібування людського KLK5 антитілом 10236 gL6gH12 (Фігура 10А) та кролячим антитілом 10236 (Рисунок 10В) не змінюється зі збільшенням концентрації субстрату, демонструючи, що антитіло 10236 gL6gH12 є неконкурентним інгібітором людського KLK5. Навпаки, Fc-білок LEKTI D5 кролика демонструє зниження швидкості інгібування зі збільшенням концентрації субстрату, що свідчить про те, що він є конкурентним інгібітором KLK5 людини.

Приклад 9: Дослідження системи оцінки стану шкіри in vitro

Система оцінки повної товщини шкіри людини in vitro EpiDermFT (MatTekTM; Моразейн, Шін та ін. "Експресія калікреїну та обробка кателіцидином незалежно контролюються в кератиноцитах за вмістом кальцію, вітаміну D(3) та ретиноевої кислоти". *Journal of investigative dermatology* том 130,5 (2010): 1297-306. doi:10.1038/jid.2009.435) використовувалась для демонстрації функціонального ефекту антитіла 10236 gL6gH12 IgG4P на KLK5 людини.

Кальципотріол MC903, аналог вітаміну D3, використовувався для лікування шкіри *in vitro*, оскільки він індукує фенотип, схожий на atopічний дерматит *in vivo* (Найду, Кармелла та ін. "Еозинофіли визначають потовщення шкіри та зневоднення в моделі atopічного дерматиту MC903". *Journal of investigative dermatology*, том 138, 12 (2018): 2606-2616. doi:10.1016/j.jid.2018.06.168).

Відновлену шкірну тканину повної товщини EpiDermFT™ врівноважували в середовищі для аналізу EFT-400-ASY (MatTek Corporation™) при температурі 37 °C та 5 % CO₂ протягом ночі. У день 0 середовище видаляли з лунк та замінювали 2,5 мл середовища EFT-400-ASY. Тканини обробляли місцево 25 мкл лише середовища, кальципотріолу MC903 (Tocris Bioscience®), розведеного у середовищі EFT-400-ASY для отримання кінцевої концентрації 2 нмоль; кальципотріолу MC903, розведеного у середовищі (2 нмоль) плюс або 10 мкг/мл антитіла 10236 gL6gH12 IgG4P або ізотопного контролю hlgG4P (вироблений місцево). Планшети інкубували при температурі 37 °C та 5 % CO₂. Базове середовище замінювали щодня та поверхнево наносили кожен день.

Експеримент було припинено на 4 день.

Тканини вилучались з транвелів (Costar Snapwell™), розділялись навпіл за допомогою скальпеля на стерильній чашці Петрі та поміщались в матрицю для заливання тканин ОКТ (Cellpath™) з метою підготовки до гістологічного аналізу. Ділянки 6 мкм відрізались та фарбувались для оцінки архітектурної цілісності за допомогою гематоксиліну та еозину, KLK5 виявлявся за допомогою імунофлуоресценції та оцінки активності протеази шляхом зимографічного аналізу у реальних умовах.

Для імунофлуоресцентного фарбування KLK5 зрізи сушили на повітрі протягом 10 хвилин при кімнатній температурі, промивали 0,1 % буфером Tween 20 у фосфатно-сольовому буферному розчині 3 рази та один раз безпосередньо фосфатно-сольовим буферним розчином. Потім зрізи блокували 5 % антисироваткою великої рогатої худоби у ФСБ протягом 10 хвилин. Зрізи обводили ручкою для імуногістохімічного фарбування та інкубували з мишачим антитілом проти huKLK5 (Abcam®) при 10 мкг/мл протягом 1 години при температурі 37 °C у зволоженій камері. Після інкубації антитіл зрізи знову промивали та фіксували в 4 % ПФА протягом 10 хвилин. Потім зрізи інкубували з вторинним антитілом кози до IgG миші Alexa 546 (Life Technologies®) протягом 1 години при температурі 37 °C у зволоженій камері. Зрізи промивали та заливали середовищем, що містить 4,6-діамідіно-2-феніліндол дигідрохлорид (Vector Labs™). Флуоресцентні зображення були отримані на сканері Zeiss Axio при 20-кратному збільшенні.

З метою проведення зимографії *in situ* зрізи сушили на повітрі протягом 10 хвилин при кімнатній температурі, один раз промивали 2 % буфером tween у ФСБ та 3 рази безпосередньо ФСБ. Потім зрізи інкубували з флуоресцентним субстратом казеїн-BODIPY-FL (Invitrogen®) при 10 мкг/мл протягом 3 годин при температурі 37 °C у зволоженій камері. Зрізи промивали 3 рази у ФСБ та заливали середовищем, що містить 4,6-діамідіно-2-феніліндол дигідрохлорид (Vector Labs™). Флуоресцентні зображення отримувались за допомогою сканера Zeiss Axio Scan при 20-кратному збільшенні.

Порівняння архітектури тканини після обробки MC903 у присутності та за відсутності антитіла 10236 gL6gH12 IgG4P демонструє, що інгібування KLK може запобігти руйнуванню рогового шару на моделі шкіри людини (рис. 11).

Незважаючи на те, що експресія KLK5 не була змінена, активність серинової протеази була знижена в шкірах, оброблених антитілом 10236 gL6gH12 IgG4P (дані не наведені).

Приклад 10: Зимографія *in situ* у зразках atopічного дерматиту

Панч-біопсія шкіри (Національна біослужба Росії) пацієнтів із помірним та важким atopічним дерматитом проводилась з метою оцінки інгібіторного ефекту антитіл проти KLK5. Зразки шкіри, що піддавались біопсії (4 мм), заливались матричним розчином для тканин ОКТ (Cellpath™) та зберігались при температурі -80 °C. Зрізи тканини вирізали (6 мкм) та використовували для зимографічного аналізу *in situ*, як описано у прикладі 9, використовуючи замість флуоресцентного субстрату казеїну-BODIPY-FL субстрат з погашеної флуоресценцією [5-FAM]-FVNRSYPP-Лис(Дабцил)-амід при кінцевій концентрації аналізу 20 мкм. Розщеплення субстрату в зрізах тканин призводить до флуоресценції, яка відображається на флуоресцентних зображеннях, отриманих за допомогою скану Zeiss Axio Scan™ при 20-кратному збільшенні.

Дані показують, що попередня інкубація зрізів тканини з atopічним дерматитом з антитілом 10236 gL6gH12 IgG4P може знизити рівень активності серинової протеази порівняно зі зразками що не оброблялись інгібітором (рисунк 12), що підтверджується суттєвим зменшенням білої плями у роговому шарі (верхній шар епідермісу) та зернистому шарі (безпосередньо під роговим шаром).

Приклад 11: Біофізична характеристика гуманізованих антитіл

Біофізичні властивості 10236 gL6gH12 (такі як ізотипи IgG4P та IgG1) визначались з метою оцінки проявляючої здатності. Це включає термостабільність (T_m), ізоелектричну точку, гідрофобність, розчинність (тест на осадження ПЕГ) та оцінку самовзаємодії (схильності до агрегації) методом спектроскопії самовзаємодії наночастинок з афінним захопленням.

Крім того, мутантне антитіло 10236 gL6N94D gH12 тестувалось для оцінки хімічної стабільності, тобто схильності до дезамідування мотиву Asn(94) серину (з послідовністю SEQ ID NO: 15) у ділянці CDR3 легкого ланцюга (Таблиця 8)

Таблиця 8

IgG4P	Дескриптор
	10236 gL6gH12
	10236 gL6-N94DgH12
IgG1	10236 gL6gH12

Характеристика за допомогою мас-спектрометрії

Ідентичність антитіл 10236 IgG1 та IgG4P була підтверджена вимірюванням маси інтактних важких і легких ланцюгів методом PX-МС за допомогою системи Waters ACQUITY UPLC з мас-спектрометром Xevo® G2 Q-ToF. Зразки (~5 мкг) оброблялись 5 мМ трис(2-карбоксиметил) фосфіну (TCEP) у 150 мМ ацетату амонію при температурі 37 °С протягом 40 хвилин. Для рідинної хроматографії використовувалась колонка Waters BioResolve™ RP mAb Polyphenyl, 450 Å, 2,7 мкм, що витримувалась при температурі 80 °С, урівноважувалась 95 % розчинником А (вода/0,02 % трифтороцтової кислоти (ТФК)/0,08 % мурашиної кислоти) та 5 % розчинником В (95 % ацетонітрилу / 5 % води/0,02 % ТФК/0,08 % мурашиної кислоти) зі швидкістю потоку 0,6 мл/хв. Білки елювали з градієнтом від 5 % до 50 % розчинника В протягом 8,8 хвилин, після чого промивали 95 % розчинником В і повторно врівноважували. УФ-дані отримували при 280 нм. Умови мас-спектрометрії: Іонний режим: іонізація позитивними іонами, режим роздільної здатності, діапазон мас: 400-5000 м/заряд та зовнішнє калібрування з використанням іодину натрію. Дані були проаналізовані за допомогою програми Waters MassLynx™ та програми MaxEnt.

Під час мас-спектрометрії не спостерігалось жодної різниці між очікуваною та спостережуваною молекулярною масою (Таблиця 9).

Таблиця 9

Опис антитіла		Легкий ланцюг (Da)			Важкий ланцюг (Da)		
		Очікувана	Виявлена	Різниця	Очікувана	Виявлена	Різниця
hIgG4P	10236gL6gH12	23476,1	23475,4	-0,7	49792,7	49793,6	0,9
hIgG1	10236gL6gH12	23474,6	23476,1	-1,5	49947,2	49948	-0,8

Вимірювання термічної стабільності (T_m).

Температуру плавлення (T_m) або температуру в середині розгортання визначали методом аналізу теплового зсуву.

Для цього аналізу використовувався флуоресцентний помаранчевий барвник SYPRO®, який дозволяв контролювати процес розгортання білка шляхом зв'язування з гідрофобними ділянками, які оголюються при підвищенні температури. Реакційна суміш містила 5 мкл забарвника на основі білкового гелю 30x SYPRO® Orange Protein Gel Stain (ThermoFisher science, S6651), розведеного до 5000 кратної концентрації тестовим буфером. 45 мкл зразка у концентрації 0,2 мг/мл у ФСБ, рН 7,4, або 50 мМ ацетату натрію, 125 мМ хлориду натрію, рН 5,0, додавали до барвника та змішували (є звичайною буферною сумішшю попереднього приготування). 10 мкл цього розчину розділяли на чотири частини на 384-лунковому планшеті для ПЦР, використовуючи систему ПЛР у реальному часі QuantStudio 7 (ThermoFisher™). Нагрівач системи ПЛР встановлювали на 20°C та підвищували температуру до 99°C зі швидкістю 1,1°C/хв. Прилад із зарядовим зв'язком відстежував зміни флуоресценції в лунках. Зростання інтенсивності флуоресценції наносилось на графік, точку (точки) перегину кривої використовували для визначення середніх температур (T_m). Дані наведені в таблиці 10.

Два переходи з розгортанням білка спостерігалися у 10236gL6gH12 (IgG4P). Перший можна віднести до домену CH2, а другий можна віднести до середньої температури плавлення домену розгортання Fab-фрагменту та домену CH3. У молекулі IgG1 спостерігався один домен розгортання, пов'язаний із середнім значенням T_m доменів CH2 та Fab. Отримані результати відповідають даним, наведеними у літературних джерелах (Гарбер Е. Демерест С.Джей. Biochem Biophys Res Commun. квітень, 2007 р.;355(3):751-7).

Таблиця 10

Опис антитіла		ФСБ рН 7.4				
		Домен Fab фрагменту T _m (°C)	СВ	T _m (°C) домену CH2	СВ	T _m (°C) домену CH3
hIgG4P	10236 gL6gH12	74	0.0	66.3	0.1	Не вимірюється
hIgG1	10236 gL6gH12	71.5	0.9	Покривається доменом Fab-фрагменту		Не вимірюється

Експериментальне вимірювання ізоелектричної точки (pI).

Для експериментального визначення ізоелектричної точки використовувалась система капілярного ізоелектричного фокусування (cIEF) iCE3™ (ProteinSimple). Зразки готували шляхом змішування наступним чином: 30 мкл зразка (із матричного розчину 1 мг/мл у воді для ВЕРХ), 35 мкл 1 % розчину метилцелюлози (ProteinSimple, 101876), 4 мкл фармалітів рН 3-10 (ProteinSimple, 042-848), 0,5 мкл 4,65, 0,5 мкл 9,77 синтетичних маркерів ізоелектричної точки (ProteinSimple, 102223 і 102219) і 12,5 мкл 8 М розчину сечовини (Sigma Aldrich®). Для доведення кінцевого об'єму до 100 мкл використовували воду для ВЕРХ. Зразки фокусували протягом 1 хвилини при 1,5 кВ, потім 5 хвилин при 3 кВ. Зображення капіляра на довжині 280 нм створювали за допомогою програми Protein Simple. Отримані електрофорограми аналізували за допомогою програми iCE3 та визначали значення ізоелектричної точки (лінійний зв'язок між маркерами ізоелектричної точки). Дані зведені в таблиці 11.

Було встановлено, що значення ізоелектричної точки 10236gL6gH12 (hIgG4P) є нижчим, ніж у відповідної молекули IgG1. Можна передбачити, що не буде проблем із проявленням/ продукуванням будь-якої молекули, а значення ізоелектричної точки буде вищим, ніж у буферів, які зазвичай використовуються у цьому складі (~рН 5).

Таблиця 11

Опис антитіла		Ізоелектрична точка
IgG4P	10236 gL6gH12	6.7
IgG1	10236 gL6gH12	7.5

Хроматографія з гідрофобною взаємодією (ХГВ)

Під час хроматографії з гідрофобною взаємодією (ХГВ) молекули розділяються в порядку збільшення гідрофобності. Молекули зв'язуються з гідрофобною нерухомою фазою в присутності високих концентрацій полярних солей та десорбуються в рухоми фазу, коли концентрація солі зменшується. Чим довший час утримання, тим більша гідрофобність.

Два ізотипи (IgG4P та IgG1) 10236 gL6gH12 при 2 мг/мл розбавляли 1,6 М сульфатом амонію та ФСБ (рН 7,4) у пропорції 1:2. 10 мкг (10 мкл) зразка вводили в колонку Dionex ProPac™ HIC-10 (100 мм x 4,6 мм), послідовно з'єднаною з системою для бінарної ВЕРХ Agilent 1200 з флуоресцентним детектором. Розділення контролювали на основі власної флуоресценції (довжини хвилі збудження та випромінювання, 280 нм і 340 нм =). Використовуючи буфер А (0,8 М сульфат амонію 100 мМ фосфат рН 7,4) та буфер В (100 мМ фосфат рН 7,4) зразок аналізували шляхом градієнтного елюювання наступним чином: (i) 2 хвилини витримка при 0 % В, (ii) лінійний градієнт від 0 до 100 % В за 30 хвилин (0,8 мл/хвилину) (iii) колонку промивали 100 % В протягом 2 хвилин та повторно врівноважували в 0 % В протягом 10 хвилин перед наступним введенням зразка. Температуру колонки підтримували на рівні 20 °С. Час утримання (у хвилинах) наведений в таблиці 12.

Таблиця 12

Опис антитіла		Час утримання основного піку (хв.)
IgG4P	10236gL6gH12	12.8
IgG1	10236 gL6gH12	11.0

Існувала невелика різниця в часі утримання між двома молекулами. 10236 gL6gH12 (IgG4P) показав трохи більшу гідрофобність, ніж відповідний формат IgG1. Очікується, що обидві молекули матимуть середню схильність до агрегації на основі результатів інших комерційних антитіл. (Джейн та інші "Біофізичні властивості ландшафту антитіл на клінічній стадії" Proc Natl Acad Sci U S A. 31 січня 2017 року;114(5):944-949. doi: 10.1073/pnas.1616408114. Epub 2017 Jan 17).

Вимірювання розчинності за допомогою вимірювання поліетиленгліколю (ПЕГ).

Розуміння колоїдної стабільності (розчинності) можна отримати, вивчивши ефект осадження поліетиленгліколю (ПЕГ). ПЕГ використовували для зменшення розчинності білка кількісно визначеним способом шляхом підвищення концентрації ПЕГ (мас./об.) та вимірювання кількості білка, що залишився в розчині. Цей аналіз служить для імітації ефекту розчинності високої концентрації без використання звичайних методів концентрації.

Базові 40 % розчини ПЕГ 3350 (Merck, 202444) (мас./об.) готували в ФСБ, рН 7,4, 50 мМ ацетату натрію, 125 мМ хлориду натрію рН 5,0 (звичайні буфери для зберігання попереднього складу) і 50 мМ гістидину, 250 мМ проліну рН 5,5 (звичайний буфер для препарату). Послідовне титрування виконувалось роботизованою системою для обробки рідини Assist Plus (INTEGRA, 4505), що дозволяло отримувати ПЕГ 3350 у діапазоні від 40 % до 15,4 %. Щоб мінімізувати нерівноважне осадження, підготовка зразка включала змішування розчинів білка та ПЕГ у об'ємному відношенні 1:1. 35 мкл зразкових розчинів ПЕГ 3350 додавали у 96-лунковий планшета для ПЛР (від A1 до H1) роботом для роботи з рідиною. 35 мкл розчину зразка 2 мг/мл додавали до матричних розчинів ПЕГ з метою отримання тестової концентрації 1 мг/мл. Цей розчин змішували автоматичним повільним повторним піпетуванням та інкубували при температурі 37 °С протягом 0,5 години для повторного розчинення будь-яких нерівноважних агрегатів. Потім зразки інкубували при температурі 20°C протягом 24 годин. Планшет із зразком потім центрифугували при 4000 x g протягом 1 години при температурі 20 °С. 50 мкл супернатанту переносилось у 96-лунковий прозорий мікропланшет серії UV-Star®, тип лунки half area (Greiner, 675801). Концентрацію білка визначали за допомогою УФ-спектрофотометрії при 280 нм з використанням мікропланшетного аналізатору FLUOstar®Omega з (BMG LABTECH). Отримані значення наносились на графік за допомогою програми Graphpad prism версії 7.04, середня оцінка ПЕГ (PEGmdpnt) визначалась на основі середньої точки сигмоїдальної залежності доза-відповідь (змінний нахил).

Дані наведено в таблиці 13. Чим вище середня точка ПЕГ (%), тим більша ймовірність стабільності/розчинності високої концентрації.

Між двома ізотипами спостерігалися відмінності залежно від стану буферу. У ФСБ рН 7,4 10236gL6gH12 (IgG4P) продемонструвало більшу розчинність, ніж 10236gL6gH12 (IgG1); тоді як у 50мМ ацетату натрію, 125мМ хлориду натрію рН 5 спостерігалася протилежна ситуація. Розчинність 10236gL6gH12 (IgG4P) можна покращити, використовуючи більш типовий буфер, тобто 50 мМ гістидину, 250 мМ проліну, рН 5,5.

Таблиця 13

Опис антитіла		Середня очка ПЕГ (%)		
		ФСБ рН 7.4	50мМ ацетату натрію, 125мМ хлориду натрію рН 5	50 мМ гістидину, 250 мМ проліну рН 5,5
IgG4P	10236gL6gH12	10.5	10.4	11.5

IgG1	10236gL6gH12	9.9	11.3	Не виконано
------	--------------	-----	------	-------------

Оцінка самовзаємодії за допомогою АЗ-ССН (спектроскопія самовзаємодії наночастинок з афінним захопленням).

Аналіз методом АЗ-ССН (Ліу Ю. MAbs. березень-квітень 2014;6(2):483-92) проводився для оцінки проявності 10236gL6gH12 шляхом визначення схильності до самовзаємодії та, отже, отримання інформації про потенційну стабільність агрегації. Цей аналіз проводився з використанням ФСБ pH 7,4.

Буфер, в якому було розчинене антитіло кози до Fc γ -специфічного антитіла людини (Jackson ImmunoResearch), замінювався 20 мМ ацетату натрію, pH 4,3, розведеним до 0,4 мг/мл та 50 мкл додавались до 450 мкл цитратно-стабілізованих наночастинок золота розміром 20 нм (TedPella, США) та залишались на ніч при кімнатній температурі. Кон'юговані наночастинки блокували 55 мкл ПЕГ-тіолу протягом 1 години, центрифугували при 21000 x g протягом 6 хвилин, супернатант видаляли та ресуспендували в 20 мМ ацетату натрію, pH 4,3 до кінцевого об'єму у 150 мкл.

10236gL6gH12 (IgG4P та IgG1) розводили до 22 мкг/мл у ФСБ, pH 7,4 (200 мкл) та додавали до рівного об'єму цільного неспецифічного IgG (Jackson ImmunoResearch), перемішували та 72 мкл переносили у 96-лунковий планшет. До кожної лунки додавали 8 мкл наночастинок (n=4). Абсорбцію визначали на аналізаторі планшетів BMG на довжині хвилі 500-600 нм, будували криві Лоренца (RShiny) та лише ФСБ віднімали зі зразків, щоб отримати $\Delta\lambda_{max}$. Дані отримані у таблиці 14.

Обидва ізотипи 10236gL6gH12 як IgG4P та IgG1 показали низькі рівні λ_{max} та $\Delta\lambda_{max}$ (на фоні ФСБ), що свідчить про низьку схильність до самовзаємодії та низький ризик агрегації у ФСБ pH 7,4

Таблиця 14

Опис антитіла		λ_{max}	$\Delta\lambda_{max}$
IgG4P	10236 gL6gH12	531.37	1.88
IgG1	10236 gL6gH12	530.27	1.17

Стрес-дослідження у прискорених умовах для оцінки схильності до дезамідування на Asn(94) (ділянка CDR3 легкого ланцюга)

Мотив дезамідування Asn(94)Ser присутній у ділянці CDR3 легкого ланцюга 10236gL6gH12. Схильність/швидкість дезамідування неможливо передбачити, оскільки це залежить від первинної послідовності та тривимірної структури, а також властивостей розчину (Р. К. Стефенсон та С. Кларк (1989 р.); К. Діполд та ін. (2012 р.); Жасмін Ф. Сідоу та ін. (2014 р.); Н. Е. Робінсон та ін. (2004 р.). Тому було проведено стрес-дослідження, щоб визначити схильність до дезамідування 10236 gL6gH12 за Asn(94). Це дослідження поведилось лише на 10236gL6gH12 (IgG4P). Швидкість дезамідування вважалась однаковою для IgG1, оскільки мотив дезамідування присутній у варіабельній області.

Також визначався базовий рівень дезамідування (зразок, що не піддавався стресовим умовам). Низькі рівні вказують на низьку чутливість до дезамідування, але вони можуть змінюватися в залежності від різних партій/умов.

Буфер, у якому було розчинене антитіло 10236 gL6gH12 (IgG4P), замінювався буфером (i), який призводив до дезамінування залишків Asn(N) (Трис pH 8,0 / 125 мМ NaCl при температурі 37 °C) та (ii) контрольним буфером (ацетат, pH 5,0 / 125 мМ NaCl при температурі 37 °C). Кінцева концентрація зразка в кожному з буферів становила 5,9 мг/мл при pH 8,0 та 6,6 мг/мл при pH 5,0. Потім зразок розділяли на дві аліквоти, одну з яких зберігали при температурі 4 °C, а іншу — при температурі 37 °C протягом 2 тижнів. Аліквоту відбирали негайно (T0) через 2 тижні та зберігали при температурі -20 °C.

Базове дезамінування здійснювалось шляхом аналізу основного зразка, який зберігався в ФСБ pH 7,4 при температурі -20 °C.

Усі зразки розморожували та аналізували шляхом складання пептидних карт методом мас-спектрометрії (МС) наступним чином:

Зразки білків, що підлягають стресу, відновлювались трис-2-карбоксиетилфосфіном та алкілувались хлороцтовою кислотою в буфері трис-HCl pH 8,0, що містить 0,1 % мас./об. детергенту RapigestTM. Додавали суміш трипсин/ендопротеїнази LysC (1:50 мас./мас.) та зразки розщеплювали протягом 1 години при температурі 37°C, потім додавали хімотрипсин (1:50 мас./мас.) та розщеплення продовжували протягом ночі при кімнатній температурі. Протеоліз зупиняли додаванням мурашиної кислоти до 1 % об./об., а зразки розбавляли до 0,5 мг/мл перед центрифугуванням для видалення осаду RapigestTM. Отримані пептидні пули відокремлювали та аналізували на колонці Waters BEH C18, підключеній до мас-спектрометра Thermo Fusion, в якому використовується іонна пастка та технологія фрагментації CID (Викликана зіткненнями дисоціація).

Дані PX-МС аналізували за допомогою програмного забезпечення Thermo XcaliburTM і PeptideFINDERTM.

Основний рівень дезамідування в KLK5 10236 L-CDR3 становив 0,7 % при Asn94 (розраховано за допомогою програми PeptideFINDERTM). Дезамідування зросло максимум на 10 % для зразка, інкубованого при температурі 37 °C у буфері Трис pH8,0 протягом 2 тижнів (рисунком 13).

Схильність до дезамідування була низькою, і її можна було контролювати шляхом мінімізації використання буферів з високим pH під час виробництва, зберігання та формулювання.

Визначення афінності повністю дезамідованого продукту: 10236 gL6-N94DgH12 (мутація несинонімічних заміщень на несинонімічний сайт (NS) у синонімічні заміщення на синонімічний сайт (DS) на ділянці CDR3 легкого ланцюга)

Легкий ланцюг 10236gL6g3 піддавався мутації з метою заміни Asn 94 на Asp (Asn94Asp) для створення сурогатної молекули для повністю дезамідованого продукту 10236gL6gH12.

Кінетику зв'язування обох антитіл 10236gL6gH12 та 10236gL6-N94DgH12 з KLK5 людини оцінювали методом поверхневого плазмонного резонансу (Biacore T200, GE Life Sciences™) при температурі 25 °C з метою оцінки впливу 100 % дезамідування.

Специфічне Fc-антитіло проти людського IgG (Jackson ImmunoResearch) було іммобілізовано на сенсорній матриці CM5 за допомогою хімічного зв'язування амінів до рівня приблизно у 6000 відносних одиниць. Кожен цикл аналізу включав захоплення молекул антитіла KLK5 IgG поверхнею Fc-фрагменту, введення аналіту KLK5 (приготованого на місці) протягом 300 с при 30 мкл/хв з подальшою дисоціацією впродовж 600 с. Наприкінці кожного циклу поверхню регенерували зі швидкістю потоку 10 мкл/хв з введенням 50 mM HCl впродовж 60 секунд, 5 mM NaOH впродовж 30 секунд та остаточним введенням 50 mM HCl впродовж 60 секунд. KLK5 людини титрували на довжині 20 нМ - 0,03 нМ (6 × 3-кратних серійних розведень) у проточному буфері HBS-EP+ (GE Healthcare), доданому до кінцевої концентрації 300 mM NaCl. Контрольні ін'єкції буферу застосовувались для видалення шуму та дрейфу.

Кінетичні параметри визначали за допомогою моделі зв'язування 1:1 за допомогою програмного забезпечення Biacore T200 Evaluation(версія 3.0).

Дані наведені у таблиці 15.

Дві реплікації антитіла 10236gL6gH12 використовувались для демонстрації експериментальної відтворюваності. Мутація Asn94Asp у ділянці CDR3 легкого ланцюга зменшила афінність до KLK5 у 4,5 рази.

Таким чином, інтенсивне дезамідування може вплинути на ефективність 10236gL6gH12, якщо умови виробництва, зберігання та формулювання не контролюються. Результати стрес-випробування у прискорених умовах показали низьку схильність до дезамідування залишку Asn94 і, отже, знизився ризик для молекули.

Таблиця 15

Опис антитіла	Константа асоціації (1/Mc)	Константа дисоціації (1/c)	Рівноважна константа дисоціації (nM)
10236gL6gH12 прогін 1 [§]	2.26E+06	7.11E-04	314.3
10236gL6gH12 прогін 2 [§]	2.33E+06	6.58E-04	283.0
10236gL6N94DgH12	3.89E+06	4.86E-03	1249.2

[§] середнє значення для прогону 1 та 2=299 nM

Оцінка в'язкості при різних концентраціях для антитіла 10236 gL6gH12 (hlgG4P)

Низька в'язкість при високій концентрації антитілу є важливою під час підшкірного введення терапевтичних молекул. В'язкість при зростаючих концентраціях антитіла 10236 gL6gH12 у загальному буфері попереднього приготування, 50 mM гістидину/250 mM проліну pH 5,5, вимірювали, щоб дослідити параметри в'язкості.

Дослідження проводили шляхом (i) початкової концентрації зразків і (ii) вимірювання в'язкості, як описано нижче.

(i) Концентрація

Загалом 23 мл антитіла 10236 gL6gH12 (hlgG4P) концентрували за допомогою відцентрового фільтра Vivaspin® 20 MWCO 30kD (Z14637, Sigma-Aldrich) при 4000 x g та температурі 20 °C, щоб об'єм концентрату становив приблизно 950 мкл. Розчин концентрату відновлювали та кінцеву концентрацію антитіла 10236 gL6gH12 (hlgG4P) визначали шляхом вимірювання поглинання в УФ-діапазоні на довжині хвилі 280 нм з урахуванням коефіцієнта екстинкції 1,46 мл/(мг см) за допомогою спектрофотометру NanoDrop™ 1000. Було визначено, що концентрований зразок становив 185 мг/мл (середнє значення трьох примірників), що давало 84 % відновлення теоретичної концентрації. Втрати були в межах очікуваного діапазону для цього методу.

Потім зразок антитіла розбавляли 50 mM гістидину, 250 mM проліну, pH 5,5, щоб отримати діапазон концентрацій, придатних для вимірювання в'язкості. Концентрації розведеного зразка визначались шляхом вимірюванням поглинання в УФ-спектрі на довжині хвилі 280 нм та становили 159,8 мг/мл, 63,6 мг/мл і 33,2 мг/мл.

(ii) Вимірювання в'язкості

В'язкість при кожній концентрації вимірювали за допомогою віскозиметру Discovery Hybrid Rheometer-1 (DHR-1, TA Instruments) з пластиною Пельтьє та системою рідинного охолодження для контролю температури та 20-мм паралельною пластиною з нержавіючої сталі для вимірювання. Зразок (80 мкл) у різних концнктраціях (33,2 мг/мл, 63,6 мг/мл і 159,8 мг/мл,) розміщували у центрі пластини Пельтьє, та в'язкість (мПа·с або cП) вимірювалась методом розгортки при постійній витраті та при температурі 20 °C із змінними швидкостями зсуву від 2,87918 до 287,918 s⁻¹. Виміряну в'язкість усереднювали, коли значення в кожній точці швидкості зсуву були постійними (SD ±5 %). В'язкість 10236 gL6gH12 (IgG4P) при різних концентраціях наведена у таблиці 16.

Тенденція до зростання спостерігалася для антитіла 10236 gL6gH12 (hlgG4P) між концентрацією та коефіцієнтом в'язкості. В'язкість зростала з 2,8 до 6,4 cП у діапазоні концентрацій від 33,2 мг/мл до 159,8 мг/мл. Усі ці зразки продемонстрували постійний коефіцієнт в'язкості (мінливість менше 5 %) при різних швидкостях зсуву. Дослідження показало, що антитіло 10236 gL6gH12 (hlgG4P) демонструє низьку в'язкість при високій концентрації (~150 мг/мл) у 50 mM гістидину/250 mM проліну pH 5,5, і тому його можна вважати придатним для підшкірного введення.

Таблиця 16

Концентрація (мг/мл)	Середня в'язкість (сП)	Стандартне відхилення (сП)	% середньоквадратичного відхилення
33.2	2.8	0.08	2.99
63.6	3.6	0.08	2.29
159.8	6.4	0.16	2.54

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> UCB Biopharma SRL

<120> АНТИТІЛА ДО KLK5

<130> PF0196-WO

<150> GB2001447.8

<151> 2020-02-03

<160> 104

<170> Програма PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ділянка CDR-L1

<400> 1

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ДІЛЯНКА CDR-L2

<400> 2

Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 3

<211> 12

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ДІЛЯНКА CDR-L3

<400> 3

Gln Gln Gly Tyr Thr Asn Ser Asn Ile Ile Asn Thr

1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ДІЛЯНКА CDR-H1

<400> 4

Gly Phe Pro Leu Ser Asn Tyr Ala Met Ser

1 5 10

<210> 5

<211> 16

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ДІЛЯНКА CDR-H2

<400> 5

Asp Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

1 5 10 15

<210> 6

<211> 9

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ДІЛЯНКА CDR-H3

<400> 6

Asp Asn Asn Asp Tyr Gly Leu Asp Ile

1 5

<210> 7

<211> 110

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> варіабельний легкий ланцюг антитіла кролика

<400> 7

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys

65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Asn Ser Asn

85 90 95

Ile Ile Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 8

<211> 336

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид варіабельного легкого ланцюга кролика

<400> 8

gcctatgata tgacccagac tccagcctct gtggaggttag ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagc agttgggttag cctggtatca gcagaaacca 120

ggtcagcctc ccaagctcct gatctatctg gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg 180

cggttcaaag gcagtggatc tgggacacag ttcactctca ccatcagcgg cgtggagtgt 240

gccgatgctg ccacttacta ctgtcaacag ggttatacta atagtaatat tattaatact 300

ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa cgtacg 336

<210> 9

<211> 114

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельний важкий ланцюг кролика

<400> 9

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

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

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

Asp Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

Gly Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Asn
85 90 95

Asn Asp Tyr Gly Leu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 10

<211> 342

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид варіабельного важкого ланцюга кролика

<400> 10

cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccct gacactcacc 60

tgcaccgtct ctgggttccc cctcagtaat tatgcaatga gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatggat cggagacatt taccctagt atcatataga ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctcccaa acctcgacca cgggtggagct gaaaatcacg 240

ggtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gagacaacaa tgactatggt 300

ctggacatct ggggccagg caccctggtc accgtctcga gt 342

<210> 11

<211> 110

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> варіабельний легкий ланцюг антитіла 10236 gL5

<400> 11

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Asn Ser Asn

85 90 95

Ile Ile Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 12

<211> 336

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид варіабельного легкого ланцюга антитіла 10236 gL5

<400> 12

gcctacgaca tgactcagtc cccatcctcc ctgtccgcat ccgtggggga tagagtcacc 60

atcacctgtc aagccagcca gtcaattagc tcgtggctgg cctggatatca gcagaagccg 120
 ggaaaggctc ccaagttgct gatctacctg gcctcaacgc tcgcgtcggg agtgcctagc 180
 cgctttaagg gttccggatc tggcaccgac ttcactctca ccatttcgag ccttcaaccg 240
 gaggacttcg ccacttacta ctgccagcag ggttacacca actccaacat catcaacacc 300
 ttcggcggag ggaccaaagt ggaaatcaag cgtacg 336

<210> 13

<211> 217

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223>Легкий ланцюг антитіла 10236 gL5

<400> 13

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Asn Ser Asn
 85 90 95

Ile Ile Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 14

<211> 657

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид легкого ланцюга антитіла 10236 gL5

<400> 14

gcctacgaca tgactcagtc cccatcctcc ctgtccgcat ccgtggggga tagagtcacc 60

atcacctgtc aagccagcca gtcaattagc tcgtggctgg cctggtatca gcagaagccg 120

ggaaaggctc ccaagttgct gatctacctg gcctcaacgc tcgcgtcggg agtgcctagc 180

cgctttaagg gttccggatc tggcaccgac ttcactctca ccatttcgag ccttcaaccg 240
 gaggacttcg ccacttacta ctgccagcag gggttacacca actccaacat catcaacacc 300
 ttcggcggag ggaccaaagt ggaaatcaag cgtacgcgta cgggtggccgc tcctccgtg 360
 ttcatcttcc caccctccga cgagcagctg aagtccggca ccgcctccgt cgtgtgcctg 420
 ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgcctgcag 480
 tccggcaact cccaggaatc cgtcaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg 540
 tcctccacc tgaccctgtc caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgcgaa 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagtcct tcaaccgggg cgagtgc 657

<210> 15

<211> 110

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> варіабельний легкий ланцюг антитіла 10236 gL6

<400> 15

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Asn Ser Asn
85 90 95

Ile Ile Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 16

<211> 330

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид варіабельного легкого ланцюга антитіла 10236 gL6

<400> 16

gcctacgaca tgactcagtc cccatcctcc ctgtccgcat ccgtggggga tagagtcacc 60

atcacctgtc aagccagcca gtcaattagc tcgtggctgg cctggatatca gcagaagccg 120

ggaaaggctc ccaagttgct gatctacctg gcctcaacgc tcgcgtcggg agtgcctagc 180

cgcttttccg gttccggatc tggcaccgac ttactctca ccatttcgag cttcaaccg 240

gaggacttcg ccacttacta ctgccagcag ggttacacca actccaacat catcaacacc 300

ttcggcggag ggaccaaagt ggaaatcaag 330

<210> 17

<211> 217

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Легкий ланцюг антитіла 10236 gL6

<400> 17

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Asn Ser Asn

85

90

95

Ile Ile Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

100

105

110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

115

120

125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro

130

135

140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly

145

150

155

160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

165

170

175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His

180

185

190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val

195

200

205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 18

<211> 651

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид легкого ланцюга антитіла 10236 gL6

<400> 18

gcctacgaca tgactcagtc cccatcctcc ctgtccgcat ccgtggggga tagagtcacc 60

atcacctgtc aagccagcca gtcaattagc tcgtggctgg cctggatatca gcagaagccg 120

ggaaaggctc ccaagttgct gatctacctg gcctcaacgc tcgcgtcggg agtgcctagc 180

cgcttttccg gttccggatc tggcaccgac ttactctca ccatttcgag cttcaaccg 240

gaggacttcg ccacttacta ctgccagcag ggttacacca actccaacat catcaacacc 300

ttcggcggag ggaccaaagt ggaaatcaag cgtacggtgg ccgtccctc cgtgttcac 360

ttccaccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgcct ccgtcgtgtg cctgctgaac 420

aacttctacc ccgcgaggc caaggtgcag tggaagggtg acaacgcct gcagtccggc 480

aactcccagg aatccgtcac cgagcaggac tccaaggaca gcacctactc cctgtcctcc 540

accctgacct tgtccaaggc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg cgaagtgacc 600

caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag tccttcaacc ggggcgagtg c 651

<210> 19

<211> 110

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> варіабельний легкий ланцюг антитіла 10236 gL7

<400> 19

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Asn Ser Asn
85 90 95

Ile Ile Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 20

<211> 330

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> 10236 gL7 VL nucl.

<400> 20

gcgatcgaca tgactcagag cccgtccagc ctgtccgcgt ccgtgggaga tcgctgact 60

atcacgtgtc aggctcaca atccattagc tcctggctgg cctggtacca gcagaagcca 120

gggaaggctc cgaagctgct gatctacctg gcctccaccc ttgcctccgg cgtgccttca 180

cggttttctg gatccggctc gggaaccgac ttcaccctca ccatctcgtc gctccaaccc 240

gaggacttcg caacctacta ctgccaaacag gggatatacca acagcaacat catcaacacc 300

ttcgggtggcg gaactaaggt cgaaatcaag 330

<210> 21

<211> 217

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Легкий ланцюг антитіла 10236 gL7

<400> 21

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Asn Ser Asn
85 90 95

Ile Ile Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 22

<211> 645

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид легкого ланцюга антитіла 10236 gL7

<400> 22

gcgatcgaca tgactcagag cccgtccagc ctgtccgcgt ccgtgggaga tcgctgact 60

atcacgtgtc aggccacaca atccattagc tcctggctgg cctggtacca gcagaagcca 120

gggaaggctc cgaagctgct gatctacctg gcctccaccc ttgcctccgg cgtgccttca 180

cggttttctg gatccggctc gggaaccgac ttcaccctca ccatctcgtc gctccaaccc 240

gaggacttcg caacctacta ctgccaacag gggatatcca acagcaacat catcaacacc 300

ttcgggtggcg gaactaaggt cgaaatcaag gtggccgctc cctccgtgtt catcttcca 360

ccctccgacg agcagctgaa gtccggcacc gcctccgtcg tgtgcctgct gaacaacttc 420

tacccccgcg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaacg ccctgcagtc cggcaactcc 480

caggaatccg tcaccgagca ggactccaag gacagcacct actccctgtc ctccaccctg 540

accctgtcca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gacccaccag 600

ggcctgtcca gcccgtgac caagtccttc aaccggggcg agtgc 645

<210> 23

<211> 110

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> варіабельний легкий ланцюг антитіла 10236 gL8

<400> 23

Ala Tyr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Asn Ser Asn
85 90 95

Ile Ile Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 24

<211> 330

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид варіабельного легкого ланцюга антитіла 10236 gL8

<400> 24

gcgtatcaga tgactcagag cccgtccagc ctgtccgctg ccgtgggaga tcgctgact 60

atcacgtgtc aggcctcaca atccattagc tcctggctgg cctggtacca gcagaagcca 120

gggaaggctc cgaagctgct gatctacctg gcctccaccc ttgcctccgg cgtgccttca 180

cggttttctg gatccggctc gggaaccgac ttcaccctca ccatctcgct gctccaaccc 240

gaggacttcg caacctacta ctgccaacag gggatatacca acagcaacat catcaacacc 300

ttcgggtggcg gaactaaggt cgaatcaag 330

<210> 25

<211> 217

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Легкий ланцюг антитіла 10236 gL8

<400> 25

Ala Tyr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Asn Ser Asn
85 90 95

Ile Ile Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 26

<211> 645

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид варіабельного легкого ланцюга антитіла 10236 gL8

<400> 26

```
gcgtatcaga tgactcagag cccgtccagc ctgtccgcgt ccgtgggaga tcgcgtgact    60
atcacgtgtc aggccctaca atccattagc tcctggctgg cctggtacca gcagaagcca    120
gggaaggctc cgaagctgct gatctacctg gcctccaccc ttgcctccgg cgtgccttca    180
cgggtttctg gatccggctc gggaaccgac ttcaccctca ccatctcgtc gctccaaccc    240
gaggacttcg caacctacta ctgccaacag gggatatcca acagcaacat catcaacacc    300
ttcgggtggcg gaactaaggt cgaaatcaag gtggccgctc cctccgtgtt catcttcca    360
ccctccgacg agcagctgaa gtccggcacc gcctccgtcg tgtgcctgct gaacaacttc    420
tacccccgcg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaacg ccctgcagtc cggcaactcc    480
caggaatccg tcaccgagca ggactccaag gacagcacct actccctgtc ctccaccctg    540
accctgtcca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gaccaccag    600
ggcctgtcca gcccgtgac caagtccttc aaccggggcg agtgc                    645
```

<210> 27

<211> 117

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> варіабельний важкий ланцюг антитіла 10236 gH9

<400> 27

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

```
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Pro Leu Ser Asn Tyr
```

20 25 30

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

Gly Asp Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28

<211> 351

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид варіабельного важкого ланцюга антитіла 10236 gH9

<400> 28

gaagtgcagc tgcaagagtc aggaccgggc ttggtcaagc ccagcggaac cctgtccctg 60

acttgtgccg tgtcgggggt cccgctgtcg aactacgcga tgcctgggt cagacagcct 120

cccggaaagg gccttgaatg gatcggcgac atctacccaa gcgacattat tgattacgca 180

tcctgggccca agggacgcgt gaccatctcc caggactctt ccaagaccca agtgtccctc 240

aagctgtcca gcgtgaccgc tgccgacact gccgtgtact attgcgcgcg ggataacaac 300

gactacgggc tggacatctg gggccagggt accctcgtga ctgtctcgag c

351

<210> 29

<211> 444

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг антитіла 10236 gH9

<400> 29

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Pro Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Gln Asp Ser Ser Lys Thr Gln Val Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Asn Asn Asp Tyr Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 30

<211> 1332

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид важкого ланцюга антитіла 10236 gH9

<400> 30

gaagtgcagc tgcaagagtc aggaccgggc ttggtcaagc ccagcggaac cctgtccctg 60

acttgtgccg tgtcgggggt cccgctgtcg aactacgcga tgcctgggt cagacagcct 120

cccggaagg gccttgaatg gatcggcgac atctaccaa gcgacattat tgattacgca 180
 tcctgggcca agggacgcgt gaccatctcc caggactctt ccaagaccca agtgtccctc 240
 aagctgtcca gcgtgaccgc tgccgacact gccgtgtact attgcgcgcg ggataacaac 300
 gactacgggc tggacatctg gggccagggt accctcgtga ctgtctcgag cgcttctaca 360
 aagggccctt ccgtgttccc tctggccctt tgctcccgtt ccacctccga gtctaccgcc 420
 gctctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgacagtgtc ctggaactct 480
 ggccgcctga cctccggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcaagtctc cggcctgtac 540
 tccctgtctt ccgtcgtgac cgtgccctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacacctgt 600
 aacgtggacc acaagccctc caacaccaag gtggacaagc ggggtggaatc taagtacggc 660
 cctccctgcc cccctgccc tgcccctgaa ttctgggcg gaccttccgt gttcctgttc 720
 ccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc tcccggacct ccgaagtgc ctgcgtggtg 780
 gtggacgtgt cccaggaaga tcccagggtc cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa 840
 gtgcacaatg ccaagaccaa gccagagag gaacagtca actccaccta ccgggtggtg 900
 tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtaca gtgcaagggtg 960
 tccaacaagg gcctgccctc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc 1020
 cgcgagcccc aggtgtacac cctgcccctt agccaggaag agatgaccaa gaaccagggtg 1080
 tccctgacct gtctgtgcaa gggcttctac ccctccgaca ttgccgtgga atgggagtcc 1140
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccctg tgctggacag cgacggctcc 1200
 ttcttctgt actctcggtt gaccgtggac aagtcccgtt ggcaggaagg caacgtcttc 1260
 tcctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca ccagaagtc cctgtccctg 1320
 agcctgggca ag 1332

<210> 31

<211> 117

<212> БИЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид варіабельного важкого ланцюга антитіла 10236 gH10

<400> 31

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Pro Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys Thr Gln Val Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Asn Asn Asp Tyr Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 351

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид варіабельного важкого ланцюга антитіла 10236 gH10

<400> 32

gaagtcgagc tgcaagagtc aggaccgggc ttggtcaagc ccagcggaac cctgtccctg 60

acttgtgccg tgcgggggtt cccgctgtcg aactacgca tgcctgggt cagacagcct 120

cccggaaagg gccttgaatg gatcggcgac atctaccaa gcgacattat tgattacgca 180

tcctgggcca agggacgcgt gaccatctcc gtggactctt ccaagaccca agtgtccctc 240

aagctgtcca gcgtgaccgc tgccgacact gccgtgtact attgcgcgcg ggataacaac 300

gactacgggc tggacatctg gggccagggt accctcgtga ctgtctcgag c 351

<210> 33

<211> 444

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг антитіла 10236 gH10

<400> 33

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Pro Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys Thr Gln Val Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

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

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 34

<211> 1332

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид важкого ланцюга антитіла 10236 gH10

<400> 34

```
gaagtgcagc tgcaagagtc aggaccgggc ttggtcaagc ccagcggaac cctgtccctg    60
acttgtgccg tgcgggggtt cccgctgtcg aactacgcga tgcctgggt cagacagcct    120
cccgaaagg gccttgaatg gatcggcgac atctaccaa gcgacattat tgattacgca    180
tcctgggcca agggacgct gaccatctcc gtggactctt ccaagaccca agtgtccctc    240
aagctgtcca gcgtgaccgc tgccgacct gccgtgtact attgcgcgcg ggataacaac    300
gactacgggc tggacatctg gggccagggt accctcgtga ctgtctcgag cgcttctaca    360
aaggggcccct ccgtgttccc tctggcccct tgctcccggt ccacctccga gtctaccgcc    420
gctctgggct gcctggtaaa ggactacttc cccgagcccg tgacagtgtc ctggaactct    480
ggcgccctga cctccggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtcctc cggcctgtac    540
tccctgtcct ccgtcgtgac cgtgccctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacacctgt    600
aacgtggacc acaagccctc caacaccaag gtggacaagc ggggtggaatc taagtacggc    660
cctccctgcc ccccctgcc tgcccctgaa tttctgggcg gaccttccgt gttcctgttc    720
ccccaagc ccaaggacac cctgatgac tcccggaccc ccgaagtac ctgcgtggtg    780
gtggacgtgt ccaggaaga tcccagggtc cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa    840
gtgcacaatg ccaagacca gcccagagag gaacagtca actccaccta ccgggtggtg    900
tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaagggtg    960
tccaacaagg gcctgccctc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc   1020
cgcgagcccc aggtgtacac cctgcccct agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg   1080
tccctgacct gtctggtaaa gggcttctac ccctccgaca ttgccgtgga atgggagtcc   1140
```

aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccctg tgctggacag cgacggctcc 1200

ttcttctgt actctcggct gaccgtggac aagtcctggt ggcaggaagg caacgtcttc 1260

tcctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca ccagaagtc cctgtccctg 1320

agcctgggca ag 1332

<210> 35

<211> 117

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид варіабельного важкого ланцюга антитіла 10236 gH11

<400> 35

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Pro Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Gln Asp Lys Ser Lys Thr Gln Val Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Asn Asn Asp Tyr Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 36

<211> 351

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид варіабельного важкого ланцюга 10236 gH11.

<400> 36

gaagtgcagc tgcaagagtc aggaccgggc ttggtcaagc ccagcggaac cctgtccctg 60

acttgtgccg tgcgggggtt cccgctgtcg aactacgca tgcctgggt cagacagcct 120

cccggaaagg gccttgaatg gatcggcgac atctaccaa gcgacattat tgattacgca 180

tcctgggcca agggacgcgt gaccatctcc caggacaagt ccaagacca agtgtccctc 240

aagctgtcca gcgtgaccgc tgccgacact gccgtgtact attgcgcgcg ggataacaac 300

gactacgggc tggacatctg gggccagggt accctcgtga ctgtctcag c 351

<210> 37

<211> 444

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг антитіла 10236 hG11

<400> 37

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Pro Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu

405

410

415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420

425

430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435

440

<210> 38

<211> 1332

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид важкого ланцюга антитіла 10236 gH11

<400> 38

gaagtgcagc tgcaagagtc aggaccgggc ttggtcaagc ccagcggaac cctgtccctg 60

acttgtgccg tgcgggggtt cccgctgtcg aactacgcga tgcctgggt cagacagcct 120

cccggaaagg gccttgaatg gatcggcgac atctaccaa gcgacattat tgattacgca 180

tcctgggcca agggacgcgt gaccatctcc caggacaagt ccaagacca agtgtccctc 240

aagctgtcca gcgtgaccgc tgccgacct gccgtgtact attgcgcgcg ggataacaac 300

gactacgggc tggacatctg gggccagggt accctcgtga ctgtctcgag cgcttctaca 360

aaggggcccct ccgtgttccc tctggcccct tgctcccgtt ccacctccga gtctaccgcc 420

gctctgggct gcctgggtcaa ggactacttc ccgagcccg tgacagtgtc ctggaactct 480

ggcgccctga cctccggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtcctc cggcctgtac 540

tcctgtctc ccgtcgtgac cgtgccctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacacctgt 600

aacgtggacc acaagccctc caacaccaag gtggacaagc ggggtggaatc taagtacggc 660

cctccctgcc cccctgccc tgcccctgaa ttctgggcg gaccttccgt gttcctgttc 720

ccccaaagc ccaaggacac cctgatgac tcccggaccc ccgaagtgac ctgcgtggtg 780

gtggacgtgt cccaggaaga tcccagggtc cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa 840

gtgcacaatg ccaagaccaa gcccagagag gaacagtta actccaccta ccgggtggtg 900

tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaagggtg 960

tccaacaagg gcctgccctc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc 1020

cgcgagcccc aggtgtacac cctgcccct agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg 1080

tcctgacct gtctgtgtaa gggcttctac ccctccgaca ttgccgtgga atgggagtcc 1140

aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccctg tgctggacag cgacggctcc 1200

ttcttctgt actctcggct gaccgtggac aagtcccggt ggcaggaagg caacgtcttc 1260

tcctgtccg tgatgcacga ggcctgcac aaccactaca ccagaagtc cctgtccctg 1320

agcctgggca ag 1332

<210> 39

<211> 117

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> варіабельний важкий ланцюг антитіла 10236 gH12

<400> 39

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

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

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

Gly	Asp	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ile	Asp	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys
	50		55				60								

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 40

<211> 351

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид важкого ланцюга антитіла 10236 gH12

<400> 40

gaggtgcagc ttcaggaatc cggacccggt ctggtcaagc cgagcggaac cctgtcactg 60

acttgccgcg tgctcgggctt cccctgtcc aattacgcca tgtcatgggt ccggcaacca 120

cctgggaaag ggttgagtg gattggcgac atctaccga gcgacatcat tgattacgcc 180

tcgtgggcca agggtagagt gaccatcagc caggactcct ccaagaacca agtgtcgtg 240

aagctctcct ccgtgaccgc agccgatacc gctgtgtact attgtgccg cgacaacaac 300

gactacggcc tggatatctg gggacaggga accctctga ctgtctcgag c 351

<210> 41

<211> 444

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг антитіла 10236 gH12

<400> 41

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

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

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

Gly Asp Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 42

<211> 1332

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид важкого ланцюга 10236 gH12

<400> 42

gaggtgcagc ttcaggaatc cggacccggt ctggtcaagc cgagcggaac cctgtcactg 60

acttgcgcgg tgtcgggctt cccctgtcc aattacgcca tgtcatgggt ccggcaacca 120

cctgggaaag ggttgagtg gattggcgac atctaccga gcgacatcat tgattacgcc 180

tcgtgggcca agggtagagt gaccatcagc caggactcct ccaagaacca agtgtcgctg 240

aagctctcct ccgtgaccgc agccgatacc gctgtgtact attgtgccg cgacaacaac 300

gactacggcc tggatatctg gggacagga accctcgtga ctgtctcgag cgcttctaca 360

aagggccct ccgtgttccc tctggcccct tgctccggt ccacctccga gtctaccgcc 420

gctctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgacagtgtc ctggaactct 480
ggcgccctga cctccggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgacgtcctc cggcctgtac 540
tccctgtcct ccgtcgtgac cgtgccctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacacctgt 600
aacgtggacc acaagccctc caacaccaag gtggacaagc ggggtggaatc taagtacggc 660
cctccctgcc cccctgccc tgcccctgaa ttctgggcg gaccttccgt gttcctgttc 720
ccccaaagc ccaaggacac cctgatgac tcccggaccc ccgaagtac ctgcgtggtg 780
gtggacgtgt cccaggaaga tcccgaggtc cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa 840
gtgcacaatg ccaagaccaa gcccagagag gaacagtta actccaccta ccgggtggtg 900
tccgtgtcga ccgtgtgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaaggtg 960
tccaacaagg gcctgccctc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggcaa gggccagccc 1020
cgcgagcccc aggtgtacac cctgcccct agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg 1080
tcctgacct gtctggtcaa gggcttctac ccctccgaca ttgccgtgga atgggagtcc 1140
aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccctg tgctggacag cgacggctcc 1200
ttcttctgt actctcggct gaccgtggac aagtcccggt ggcaggaagg caacgtcttc 1260
tcctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca ccagaagtc cctgtccctg 1320
agcctgggca ag 1332

<210> 43

<211> 117

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> варіабельний важкий ланцюг 10236 gH14

<400> 43

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly

1 5 10 15

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

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

Gly Asp Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44

<211> 351

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид варіабельного важкого ланцюга 10236 gH14

<400> 44

gaagtgcagc tgcaagagtc aggaccgggc ttggtcaagc ccagcggaac cctgtccctg 60

acttgtgccg tgcgggggtt cccgctgtcg aactacgcga tgtcctgggt cagacagcct 120

cccggaaagg gccttgaatg gatcggcgac atctacccaa gcgacattat tgattacgca 180

tcctgggccca agggacgctt caccatctcc caggactctt ccaagaacca agtgtccctc 240

aagctgtcca gcgtgaccgc tgccgacact gccgtgtact attgcgcgcg ggataacaac 300

gactacgggc tggacatctg gggccagggt accctcgtga ctgtctcgag c 351

<210> 45

<211> 444

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг 10236 gH14

<400> 45

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

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

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

Gly Asp Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 46

<211> 1332

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид важкого ланцюга 10236 gH14

<400> 46

gaagtgcagc tgcaagagtc aggaccgggc ttggtcaagc ccagcggaac cctgtcctg 60

acttgtgccg tgtcgggggt cccgtgtcg aactacgca tgtctgggt cagacagcct 120
 cccggaaagg gccttgaatg gatcggcgac atctaccaa gcgacattat tgattacgca 180
 tcctgggccca agggacgctt caccatctcc caggactctt ccaagaacca agtgtcctc 240
 aagctgtcca gcgtgaccgc tgccgacact gccgtgtact attgcgcgcg ggataacaac 300
 gactacgggc tggacatctg gggccagggt accctcgtga ctgtctcgag cgcttctaca 360
 aaggggcccct ccgtgttccc tctggcccct tgctcccggt ccacctcca gtctaccgcc 420
 gctctgggct gcctggtaaa ggactacttc cccgagcccg tgacagtgtc ctggaactct 480
 ggcgccctga cctccggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtcctc cggcctgtac 540
 tccctgtcct ccgtcgtgac cgtgccctcc tccagcctgg gcaccaagac ctacacctgt 600
 aacgtggacc acaagccctc caacaccaag gtggacaagc ggggtggaatc taagtacggc 660
 cctccctgcc cccctgccg tgcccctgaa ttctgggcg gaccttccgt gttcctgttc 720
 ccccaaagc ccaaggacac cctgatgac tccggagccc ccgaagtac ctgcgtgggtg 780
 gtggacgtgt cccaggaaga tccgaggtc cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa 840
 gtgcacaatg ccaagaccaa gccagagag gaacagtca actccaccta ccgggtgggtg 900
 tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaagggtg 960
 tccaacaagg gcctgccctc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc 1020
 cgcgagcccc aggtgtacac cctggcccct agccaggaag agatgaccaa gaaccagggtg 1080
 tcctgacct gtctgtgtaa gggcttctac ccctccgaca ttgccgtgga atgggagtcc 1140
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc cccccctg tgctggacag cgacggctcc 1200
 ttcttctgt actctggct gaccgtggac aagtcccggt ggcaggaagg caacgtcttc 1260
 tcctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca ccagaagtc cctgtccctg 1320
 agcctgggca ag 1332

<211> 107

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Акцепторний каркас людської зародкової послідовності IGKV1-6 JK4

<400> 47

Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp

20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 48

<211> 321

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид акцепторного каркасу людської зародкової послідовності IGKV1-6 JK4

<400> 48

gccatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tacaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatttg caacttatta ctgtctacaa gattacaatt accctctcac ttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 49

<211> 113

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Акцепторний каркас людської зародкової послідовності IGHV4-4 JH4

<400> 49

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

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

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

Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

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

Ser

<210> 50

<211> 339

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид акцепторного каркасу людської зародкової послідовності IGHV4-4 JH5

<400> 50

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctcggggac cctgtccctc 60

acctgcgtg tctctggtgg ctccatcagc agtagtaact ggtggagtg ggtccgccag 120

ccccagga aggggctgga gtggattggg gaaatctatc atagtgggag caccaactac 180

aaccgtccc tcaagagtcg agtcaccata tcagtagaca agtccaagaa ccagttctcc 240

ctgaagctga gctctgtgac cgccgcggac acggccgtgt attactgtgc gagatacttt 300

gactactggg gccaaaggaac cctggtcacc gtctcctca 339

<210> 51

<211> 293

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Людський KLK5 (повної довжини з сигнальною послідовністю)

<400> 51

Met Ala Thr Ala Arg Pro Pro Trp Met Trp Val Leu Cys Ala Leu Ile

1 5 10 15

Thr Ala Leu Leu Leu Gly Val Thr Glu His Val Leu Ala Asn Asn Asp

20

25

30

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

35

40

45

Asp Leu Gly Ala Gly Ala Gly Glu Asp Ala Arg Ser Asp Asp Ser Ser

50

55

60

Ser Arg Ile Ile Asn Gly Ser Asp Cys Asp Met His Thr Gln Pro Trp

65

70

75

80

Gln Ala Ala Leu Leu Leu Arg Pro Asn Gln Leu Tyr Cys Gly Ala Val

85

90

95

Leu Val His Pro Gln Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Lys

100

105

110

Val Phe Arg Val Arg Leu Gly His Tyr Ser Leu Ser Pro Val Tyr Glu

115

120

125

Ser Gly Gln Gln Met Phe Gln Gly Val Lys Ser Ile Pro His Pro Gly

130

135

140

Tyr Ser His Pro Gly His Ser Asn Asp Leu Met Leu Ile Lys Leu Asn

145

150

155

160

Arg Arg Ile Arg Pro Thr Lys Asp Val Arg Pro Ile Asn Val Ser Ser

165

170

175

His Cys Pro Ser Ala Gly Thr Lys Cys Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr

180

185

190

Thr Lys Ser Pro Gln Val His Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn

195

200

205

Ile Ser Val Leu Ser Gln Lys Arg Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Arg Gln
210 215 220

Ile Asp Asp Thr Met Phe Cys Ala Gly Asp Lys Ala Gly Arg Asp Ser
225 230 235 240

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln
245 250 255

Gly Leu Val Ser Trp Gly Asp Tyr Pro Cys Ala Arg Pro Asn Arg Pro
260 265 270

Gly Val Tyr Thr Asn Leu Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Gln Glu Thr
275 280 285

Ile Gln Ala Asn Ser
290

<210> 52

<211> 271

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Проформа людського KLK5

<400> 52

Val Thr Glu His Val Leu Ala Asn Asn Asp Val Ser Cys Asp His Pro
1 5 10 15

Ser Asn Thr Val Pro Ser Gly Ser Asn Gln Asp Leu Gly Ala Gly Ala
20 25 30

Gly Glu Asp Ala Arg Ser Asp Asp Ser Ser Ser Arg Ile Ile Asn Gly
35 40 45

Ser Asp Cys Asp Met His Thr Gln Pro Trp Gln Ala Ala Leu Leu Leu
50 55 60

Arg Pro Asn Gln Leu Tyr Cys Gly Ala Val Leu Val His Pro Gln Trp
65 70 75 80

Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Lys Val Phe Arg Val Arg Leu
85 90 95

Gly His Tyr Ser Leu Ser Pro Val Tyr Glu Ser Gly Gln Gln Met Phe
100 105 110

Gln Gly Val Lys Ser Ile Pro His Pro Gly Tyr Ser His Pro Gly His
115 120 125

Ser Asn Asp Leu Met Leu Ile Lys Leu Asn Arg Arg Ile Arg Pro Thr
130 135 140

Lys Asp Val Arg Pro Ile Asn Val Ser Ser His Cys Pro Ser Ala Gly
145 150 155 160

Thr Lys Cys Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Lys Ser Pro Gln Val
165 170 175

His Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn Ile Ser Val Leu Ser Gln
180 185 190

Lys Arg Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Arg Gln Ile Asp Asp Thr Met Phe
195 200 205

Cys Ala Gly Asp Lys Ala Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly
210 215 220

Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly

225 230 235 240

Asp Tyr Pro Cys Ala Arg Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asn Leu
 245 250 255

Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Gln Glu Thr Ile Gln Ala Asn Ser
 260 265 270

<210> 53

<211> 227

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Активний людський KLK5

<400> 53

Ile Ile Asn Gly Ser Asp Cys Asp Met His Thr Gln Pro Trp Gln Ala
1 5 10 15

Ala Leu Leu Leu Arg Pro Asn Gln Leu Tyr Cys Gly Ala Val Leu Val
 20 25 30

His Pro Gln Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Lys Val Phe
 35 40 45

Arg Val Arg Leu Gly His Tyr Ser Leu Ser Pro Val Tyr Glu Ser Gly
 50 55 60

Gln Gln Met Phe Gln Gly Val Lys Ser Ile Pro His Pro Gly Tyr Ser
65 70 75 80

His Pro Gly His Ser Asn Asp Leu Met Leu Ile Lys Leu Asn Arg Arg
 85 90 95

Ile Arg Pro Thr Lys Asp Val Arg Pro Ile Asn Val Ser Ser His Cys

100 105 110

Pro Ser Ala Gly Thr Lys Cys Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Lys
115 120 125

Ser Pro Gln Val His Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn Ile Ser
130 135 140

Val Leu Ser Gln Lys Arg Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Arg Gln Ile Asp
145 150 155 160

Asp Thr Met Phe Cys Ala Gly Asp Lys Ala Gly Arg Asp Ser Cys Gln
165 170 175

Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln Gly Leu
180 185 190

Val Ser Trp Gly Asp Tyr Pro Cys Ala Arg Pro Asn Arg Pro Gly Val
195 200 205

Tyr Thr Asn Leu Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Gln Glu Thr Ile Gln
210 215 220

Ala Asn Ser
225

<210> 54

<211> 295

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Fc-фрагмент LEKTI D5 кролика

<400> 54

Glu Ile Val Lys Leu Cys Ser Gln Tyr Gln Asn Gln Ala Lys Asn Gly

1 5 10 15

Ile Leu Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Arg Gly Pro Asp Gly
20 25 30

Lys Met His Gly Asn Leu Cys Ser Met Cys Gln Ala Tyr Phe Gln Ala
35 40 45

Glu Asn Glu Glu Lys Lys Lys Ala Glu Ala Arg Ala Arg Asn Leu Glu
50 55 60

Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro
65 70 75 80

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
85 90 95

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
100 105 110

Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn
115 120 125

Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe
130 135 140

Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Gln Asp
145 150 155 160

Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu
165 170 175

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu
180 185 190

Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser
195 200 205

Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
210 215 220

Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys
225 230 235 240

Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser
245 250 255

Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr
260 265 270

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
275 280 285

Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
290 295

<210> 55

<211> 231

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Проформа людського KLK7

<400> 55

Glu Glu Ala Gln Gly Asp Lys Ile Ile Asp Gly Ala Pro Cys Ala Arg
1 5 10 15

Gly Ser His Pro Trp Gln Val Ala Leu Leu Ser Gly Asn Gln Leu His
20 25 30

Cys Gly Gly Val Leu Val Asn Glu Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His
35 40 45

Cys Lys Met Asn Glu Tyr Thr Val His Leu Gly Ser Asp Thr Leu Gly
50 55 60

Asp Arg Arg Ala Gln Arg Ile Lys Ala Ser Lys Ser Phe Arg His Pro
65 70 75 80

Gly Tyr Ser Thr Gln Thr His Val Asn Asp Leu Met Leu Val Lys Leu
85 90 95

Asn Ser Gln Ala Arg Leu Ser Ser Met Val Lys Lys Val Arg Leu Pro
100 105 110

Ser Arg Cys Glu Pro Pro Gly Thr Thr Cys Thr Val Ser Gly Trp Gly
115 120 125

Thr Thr Thr Ser Pro Asp Val Thr Phe Pro Ser Asp Leu Met Cys Val
130 135 140

Asp Val Lys Leu Ile Ser Pro Gln Asp Cys Thr Lys Val Tyr Lys Asp
145 150 155 160

Leu Leu Glu Asn Ser Met Leu Cys Ala Gly Ile Pro Asp Ser Lys Lys
165 170 175

Asn Ala Cys Asn Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Arg Gly Thr
180 185 190

Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Thr Phe Pro Cys Gly Gln Pro Asn
195 200 205

Asp Pro Gly Val Tyr Thr Gln Val Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Asn

210 215 220

Asp Thr Met Lys Lys His Arg
225 230

<210> 56

<211> 224

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Активний людський KLK7

<400> 56

Ile Ile Asp Gly Ala Pro Cys Ala Arg Gly Ser His Pro Trp Gln Val
1 5 10 15

Ala Leu Leu Ser Gly Asn Gln Leu His Cys Gly Gly Val Leu Val Asn
20 25 30

Glu Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Met Asn Glu Tyr Thr
35 40 45

Val His Leu Gly Ser Asp Thr Leu Gly Asp Arg Arg Ala Gln Arg Ile
50 55 60

Lys Ala Ser Lys Ser Phe Arg His Pro Gly Tyr Ser Thr Gln Thr His
65 70 75 80

Val Asn Asp Leu Met Leu Val Lys Leu Asn Ser Gln Ala Arg Leu Ser
85 90 95

Ser Met Val Lys Lys Val Arg Leu Pro Ser Arg Cys Glu Pro Pro Gly
100 105 110

Thr Thr Cys Thr Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Thr Ser Pro Asp Val

115 120 125

Thr Phe Pro Ser Asp Leu Met Cys Val Asp Val Lys Leu Ile Ser Pro
130 135 140

Gln Asp Cys Thr Lys Val Tyr Lys Asp Leu Leu Glu Asn Ser Met Leu
145 150 155 160

Cys Ala Gly Ile Pro Asp Ser Lys Lys Asn Ala Cys Asn Gly Asp Ser
165 170 175

Gly Gly Pro Leu Val Cys Arg Gly Thr Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp
180 185 190

Gly Thr Phe Pro Cys Gly Gln Pro Asn Asp Pro Gly Val Tyr Thr Gln
195 200 205

Val Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Asn Asp Thr Met Lys Lys His Arg
210 215 220

<210> 57

<211> 232

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Проформа KLK7 яванської макаки

<400> 57

Gly Gln Glu Ala Gln Gly Asp Lys Ile Ile Asp Gly Ala Pro Cys Thr
1 5 10 15

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

His Cys Gly Gly Val Leu Val Asn Glu Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala

35 40 45

His Cys Lys Met Asn Asp Tyr Ile Val His Leu Gly Ser Asp Thr Leu
50 55 60

Gly Asp Arg Lys Ala Gln Arg Ile Lys Ala Ser Arg Ser Phe Arg His
65 70 75 80

Pro Gly Tyr Ser Thr Gln Thr His Val Asn Asp Leu Met Leu Val Lys
85 90 95

Leu Asn Ser Pro Ala Arg Leu Ser Ser Thr Val Lys Lys Val Arg Leu
100 105 110

Pro Ser Arg Cys Glu Pro Pro Gly Thr Thr Cys Thr Val Ser Gly Trp
115 120 125

Gly Thr Thr Thr Ser Pro Asp Val Thr Phe Pro Ser Asp Leu Met Cys
130 135 140

Val Asp Val Lys Leu Ile Ser Ser Gln Asp Cys Thr Lys Val Tyr Lys
145 150 155 160

Asp Met Leu Gly Asn Ser Met Leu Cys Ala Gly Ile Pro Asn Ser Lys
165 170 175

Lys Asn Ala Cys Asn Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Arg Gly
180 185 190

Thr Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Thr Phe Pro Cys Gly Gln Pro
195 200 205

Asn Asp Pro Gly Val Tyr Thr Gln Val Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile
210 215 220

Asn Asp Thr Ile Lys Lys His Arg
225 230

<210> 58

<211> 224

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Активний KLK7 яванської макаки

<400> 58

Ile Ile Asp Gly Ala Pro Cys Thr Arg Gly Ser His Pro Trp Gln Val
1 5 10 15

Ala Leu Leu Ser Gly Asn Gln Leu His Cys Gly Gly Val Leu Val Asn
20 25 30

Glu Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Met Asn Asp Tyr Ile
35 40 45

Val His Leu Gly Ser Asp Thr Leu Gly Asp Arg Lys Ala Gln Arg Ile
50 55 60

Lys Ala Ser Arg Ser Phe Arg His Pro Gly Tyr Ser Thr Gln Thr His
65 70 75 80

Val Asn Asp Leu Met Leu Val Lys Leu Asn Ser Pro Ala Arg Leu Ser
85 90 95

Ser Thr Val Lys Lys Val Arg Leu Pro Ser Arg Cys Glu Pro Pro Gly
100 105 110

Thr Thr Cys Thr Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Thr Ser Pro Asp Val
115 120 125

Thr Phe Pro Ser Asp Leu Met Cys Val Asp Val Lys Leu Ile Ser Ser
130 135 140

Gln Asp Cys Thr Lys Val Tyr Lys Asp Met Leu Gly Asn Ser Met Leu
145 150 155 160

Cys Ala Gly Ile Pro Asn Ser Lys Lys Asn Ala Cys Asn Gly Asp Ser
165 170 175

Gly Gly Pro Leu Val Cys Arg Gly Thr Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp
180 185 190

Gly Thr Phe Pro Cys Gly Gln Pro Asn Asp Pro Gly Val Tyr Thr Gln
195 200 205

Val Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Asn Asp Thr Ile Lys Lys His Arg
210 215 220

<210> 59

<211> 226

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Активний мишачий KLK5

<400> 59

Ile Val Asn Gly Ser Asp Cys Gln Lys Asp Ala Gln Pro Trp Gln Gly
1 5 10 15

Ala Leu Leu Leu Gly Pro Asn Lys Leu Tyr Cys Gly Ala Val Leu Ile
20 25 30

Ser Pro Gln Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Pro Val Phe
35 40 45

Arg Ile Arg Leu Gly His His Ser Met Ser Pro Val Tyr Glu Ser Gly
50 55 60

Gln Gln Met Phe Gln Gly Ile Lys Ser Ile Pro His Pro Gly Tyr Ser
65 70 75 80

His Pro Gly His Ser Asn Asp Leu Met Leu Ile Lys Met Asn Arg Lys
85 90 95

Ile Arg Asp Ser His Ser Val Lys Pro Val Glu Ile Ala Cys Asp Cys
100 105 110

Ala Thr Glu Gly Thr Arg Cys Met Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Ser
115 120 125

Ser Ser His Asn Asn Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn Ile Thr
130 135 140

Val Leu Ser Glu Glu Arg Cys Lys Asn Ser Tyr Pro Gly Gln Ile Asp
145 150 155 160

Lys Thr Met Phe Cys Ala Gly Asp Glu Glu Gly Arg Asp Ser Cys Gln
165 170 175

Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Lys Leu Gln Gly Leu
180 185 190

Val Ser Trp Gly Asp Phe Pro Cys Ala Gln Arg Asn Arg Pro Gly Val
195 200 205

Tyr Thr Asn Leu Cys Glu Phe Val Lys Trp Ile Lys Asp Thr Met Asn
210 215 220

Ser Asn

225

<210> 60

<211> 227

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Активний KLK5 яванської макаки

<400> 60

Ile Ile Asn Gly Ser Asp Cys Asp Glu His Thr Gln Pro Trp Gln Ala

1 5 10 15

Ala Leu Leu Leu Gly Pro Asn Gln Leu Tyr Cys Gly Gly Val Leu Val

20 25 30

His Pro Gln Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Lys Val Phe

35 40 45

Arg Val Arg Leu Gly His Tyr Ser Leu Ser Pro Val Tyr Glu Ser Gly

50 55 60

Gln Gln Met Phe Gln Gly Ile Lys Ser Ile Pro His Pro Gly Tyr Ser

65 70 75 80

His Pro Gly His Ser Asn Asp Leu Met Leu Ile Lys Leu Asn Arg Arg

85 90 95

Ile His Ser Thr Lys Asp Val Arg Pro Ile Asn Val Ser Ser His Cys

100 105 110

Pro Ser Ala Gly Thr Lys Cys Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Arg

115 120 125

Ser Pro Gln Val His Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn Ile Ser

130 135 140

Val Leu Ser Gln Lys Arg Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Arg Gln Ile Asp
145 150 155 160

Asp Thr Met Phe Cys Ala Gly Asp Glu Ala Gly Arg Asp Ser Cys Gln
165 170 175

Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln Gly Leu
180 185 190

Val Ser Trp Gly Asp Tyr Pro Cys Ala Lys Pro Asn Arg Pro Gly Val
195 200 205

Tyr Thr Asn Leu Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Gln Glu Thr Ile Gln
210 215 220

Ala Asn Ser
225

<210> 61

<211> 302

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Людський Fc-фрагмент кролячого LEKTI D8

<400> 61

Glu Ala Ala Lys Glu Ile Cys Ser Glu Phe Arg Asp Gln Val Arg Asn
1 5 10 15

Gly Thr Leu Ile Cys Thr Arg Glu His Asn Pro Val Arg Gly Pro Asp
20 25 30

Gly Lys Met His Gly Asn Lys Cys Ala Met Cys Ala Ser Val Phe Lys

35 40 45

Leu Glu Glu Glu Glu Lys Lys Asn Asp Lys Glu Glu Lys Gly Lys Val
50 55 60

Glu Ala Glu Lys Val Leu Glu Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser
65 70 75 80

Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
85 90 95

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
100 105 110

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val
115 120 125

Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro
130 135 140

Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr
145 150 155 160

Leu Pro Ile Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys
165 170 175

Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
180 185 190

Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro
195 200 205

Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
210 215 220

Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly
225 230 235 240

Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp
 245 250 255

Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp
 260 265 270

Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 275 280 285

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 290 295 300

<210> 62

<211> 11

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ДІЛЯНКА CDR-L1 Q24R

<400> 62

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

<210> 63

<211> 11

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ДІЛЯНКА CDR-L1 Q24K

<400> 63

Lys Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala

<210> 64

<211> 330

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид важкого ланцюгу антитіла 10236 gL6 Q24R

<400> 64

```
gcgtatgaca tgactcagag cccgtccagc ctgtccgct ccgtgggaga tcgctgact    60
atcacgtgtc gggcctcaca atccattagc tcctggctgg cctggtacca gcagaagcca    120
gggaaggctc cgaagctgct gatctacctg gcctccaccc ttgcctccgg cgtgccttca    180
cgggtttctg gatccggctc gggaaccgac ttcaccctca ccatctcgtc gctccaaccc    240
gaggacttcg caacctacta ctgccaacag gggatatacca acagcaacat catcaacacc    300
ttcgggtggcg gaactaaggt cgaaatcaag                                330
```

<210> 65

<211> 645

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид легкого ланцюга антитіла 10236 gL6 Q24R

<400> 65

```
gcgtatgaca tgactcagag cccgtccagc ctgtccgct ccgtgggaga tcgctgact    60
atcacgtgtc gggcctcaca atccattagc tcctggctgg cctggtacca gcagaagcca    120
gggaaggctc cgaagctgct gatctacctg gcctccaccc ttgcctccgg cgtgccttca    180
cgggtttctg gatccggctc gggaaccgac ttcaccctca ccatctcgtc gctccaaccc    240
gaggacttcg caacctacta ctgccaacag gggatatacca acagcaacat catcaacacc    300
ttcgggtggcg gaactaaggt cgaaatcaag gtggccgctc cctccgtgtt catcttcca    360
```

ccctccgacg agcagctgaa gtccggcacc gcctccgtcg tgtgcctgct gaacaacttc 420

tacccccgcg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaacg ccctgcagtc cggcaactcc 480

caggaatccg tcaccgagca ggactccaag gacagcacct actccctgtc ctccaccctg 540

accctgtcca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gaccaccag 600

ggcctgtcca gcccgtgac caagtccttc aaccggggcg agtgc 645

<210> 66

<211> 330

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид варіабельного легкого ланцюга антитіла 10236 gL6 Q24K

<400> 66

gcgtatgaca tgactcagag cccgtccagc ctgtccgcgt ccgtgggaga tcgctgact 60

atcacgtgta aggctcaca atccattagc tcctggctgg cctggtacca gcagaagcca 120

gggaaggctc cgaagctgct gatctacctg gcctccacc ttgcctccgg cgtgccttca 180

cggttttctg gatccggctc gggaaccgac ttcaccctca ccatctcgtc gctccaaccc 240

gaggacttcg caacctacta ctgccaacag gggatatcca acagcaacat catcaacacc 300

ttcgggtggcg gaactaaggt cgaaatcaag 330

<210> 67

<211> 645

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид легкого ланцюга 10236 gL6 Q24K

<400> 67

gcgtatgaca tgactcagag cccgtccagc ctgtccgcgt ccgtgggaga tcgctgact 60

atcacgtgta aggctcaca atccattagc tcctggctgg cctggtacca gcagaagcca 120

gggaaggctc cgaagctgct gatctacctg gcctccaccc ttgcctccgg cgtgccttca 180
 cggttttctg gatccggctc gggaaccgac ttcaccctca ccatctcgtc gctccaaccc 240
 gaggacttcg caacctacta ctgccaacag gggatatcca acagcaacat catcaacacc 300
 ttcggtgggc gaactaaggt cgaatatcaag gtggccgctc cctccgtgtt catcttcca 360
 ccctccgacg agcagctgaa gtccggcacc gcctccgtcg tgtgcctgct gaacaacttc 420
 taccctccgag aggcgaaggt gcagtgggaag gtggacaacg ccctgcagtc cggcaactcc 480
 caggaatccg tcaccgagca ggactccaag gacagcacct actccctgtc ctccaccctg 540
 accctgtcca aggccgacta cgagaagcac aagggtgtacg cctgcgaagt gaccaccag 600
 ggctgtcca gcccgtgac caagtccttc aaccggggcg agtgc 645

<210> 68

<211> 13

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ділянка CDR-L1 антитіла 10273

<400> 68

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asp Leu Ala

1 5 10

<210> 69

<211> 7

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ділянка CDR-L2 антитіла 10273

<400> 69

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 70

<211> 12

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ділянка CDR-L3 антитіла 10273

<400> 70

Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Asp Val Asp Thr Tyr Thr

1 5 10

<210> 71

<211> 10

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ділянка CDR-H1 антитіла 10273

<400> 71

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 72

<211> 16

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ділянка CDR-H2 антитіла 10273

<400> 72

Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

1 5 10 15

<210> 73

<211> 20

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ділянка CDR-H3 антитіла 10273

<220>

<221> інші властивості

<222> (19)..(19)

<223> Хаа може бути будь-якою природною амінокислотою

<400> 73

Asp His Ile Tyr Arg Tyr Asp Asp Tyr Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Tyr

1 5 10 15

Gly Met Хаа Pro

20

<210> 74

<211> 112

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> варіабельний легкий ланцюг кролячого антитіла 10273

<400> 74

Ala Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Met Ser Ala Ala Val Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn

20 25 30

Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Asp
 85 90 95

Asp Val Asp Thr Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 75

<211> 336

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид варіабельного легкого ланцюга кролячого антитіла 10273

<400> 75

gcagtcgtgc tgactcagac accatcaccc atgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcagttgcc agtccagtca gagtgtttat aataataacg acttagcctg gtatcagcag 120

aaaccagggc agcctcctaa gctcctgac tacagggcat ccactctggc atctggggtc 180

ccgtcgcggt tcagcggcag tggatctggg acacagttca ctctacccat cagcggcgtg 240

cagtgtagc atgctgccac ttactactgt ctaggcgggt atgatgatga tgttgatacg 300

tatactttcg gcggagggac cgaggtggtg gtcaaa 336

<210> 76

<211> 125

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> 10273 VH

<400> 76

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro

1 5 10 15

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

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

Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp His
85 90 95

Ile Tyr Arg Tyr Asp Asp Tyr Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Pro Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 77

<211> 375

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид варіабельного важкого ланцюга антитіла 10273

<400> 77

cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccctc gacactcacc 60

tgcacagtct ctggattctc cctcagtagc tatggaatga gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatggat cggaattatt agtagtagtg gtagcacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaag acctcgacca cgggtggatct gaaaatcgcc 240
 agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gagatcacat ttataggtac 300
 gatgactatg gtgattaccc tacctactac ggcatggacc cctggggccc aggcaccctg 360
 gtcaccgtct cgagc 375

<210> 78

<211> 219

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Легкий ланцюг кролячого антитіла 10273 до mlgG

<400> 78

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

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
 65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Asp
 85 90 95

Asp Val Asp Thr Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

Arg Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Cys
165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 79

<211> 449

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг кролячого антитіла 10273 до mIgG

<400> 79

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

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

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

Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp His
85 90 95

Ile Tyr Arg Tyr Asp Asp Tyr Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Pro Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
115 120 125

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr
130 135 140

Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn
195 200 205

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro

210 215 220

Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser
225 230 235 240

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr
 245 250 255

Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr
 275 280 285

Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser
 290 295 300

Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln
 370 375 380

Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met
385 390 395 400

Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys
405 410 415

Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
420 425 430

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 80

<211> 657

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид легкого ланцюга кролячого антитіла 10273 до mIgG

<400> 80

gcagtcgtgc tgactcagac accatcaccc atgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcagttgcc agtccagtca gagtgtttat aataataacg acttagcctg gtatcagcag 120

aaaccagggc agcctcctaa gctcctgac tacagggcat cactctggc atctggggtc 180

ccgtcgcggt tcagcggcag tggatctggg acacagttca ctctacccat cagcggcgtg 240

cagtgtgacg atgtgccac ttactactgt ctaggcggtt atgatgatga tgttgatacg 300

tatactttcg gcggagggac cgaggtggtg gtcaaacgta cggatgctgc accaactgta 360

tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 420

ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgga agattgatgg cagtgaacga 480

caaaatggcg tcctgaacag ttggactgat caggacagca aagactgcac ctacagcatg 540

agcagcaccc tcacgttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag 600

gccactcaca agacatcaac ttcacccatt gtcaagagct tcaacaggaa tgagtgt 657

<210> 81

<211> 1347

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид важкого ланцюга кролячого антитіла 10273 до mIgG

<400> 81

cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccctt gacactcacc 60

tgcacagtct ctggattctc cctcagtagc tatggaatga gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatggat cggaattatt agtagtagtg gtagcacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaag acctcgacca cgggtggatct gaaaatcgcc 240

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gagatcacat ttataggtac 300

gatgactatg gtgattacc tacctactac ggcatggacc cctggggccc aggcaccctg 360

gtcaccgtct cgagtgccaa aacgacaccc ccattctgtct atccactggc ccctggatct 420

gctgccaaa ctaactccat ggtgaccctg gtagtcctgg tcaagggcta ttccctgag 480

ccagtgcag tgacctggaa ctctggatcc ctgtccagcg gtgtgcacac cttcccagct 540

gtcctgcagt ctgacctcta cactctgagc agctcagtga ctgtcccctc cagcacctgg 600

cccagcgaga ccgtcacctg caacgttgcc caccggcca gcagaccaa ggtggacaag 660

aaaattgtgc ccagggattg tggttgtaag ctttgcata gtacagtccc agaagtatca 720

tctgtcttca tcttcccc aaagccaag gatgtgtca ccattactct gactcctaag 780

gtcacgtgtg ttgtggtaga catcagcaag gatgatccg aggtccagtt cagctggttt 840

gtagatgatg tggaggtgca cacagctcag acgcaacccc gggaggagca gttcaacagc 900

actttccgct cagtcatga acttcccatc atgcaccagg actgggtcaa tggcaaggag 960

ttcaaatgca gggtaacag tgcagctttc cctgcccc tcgagaaaac catctccaaa 1020

accaaaggca gaccgaaggc tccacaggtg tacaccattc cacctcccaa ggagcagatg 1080

gccaaaggata aagtcagtct gacctgcatg ataacagact tcttcctga agacattact 1140

gtggagtggc agtggaatgg gcagccagcg gagaactaca agaactca gcccatcatg 1200

gacacagatg gctcttactt cgtctacagc aagctcaatg tgcagaagag caactgggag 1260

gcaggaaata ctttcacctg ctctgtgtta catgagggcc tgcacaacca ccatactgag 1320

aagagcctct cccactctcc tggtaaa 1347

<210> 82

<211> 217

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Легкий ланцюг кролячого антитіла 10273 до mlgG

<400> 82

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys

65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Asn Ser Asn

85 90 95

Ile Ile Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr
100 105 110

Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu
115 120 125

Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn
145 150 155 160

Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Cys Thr Tyr
165 170 175

Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His
180 185 190

Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile
195 200 205

Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 83

<211> 438

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг кролячого антитіла 10236 до mIgG

<400> 83

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

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

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

Asp Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

Gly Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Asn
85 90 95

Asn Asp Tyr Gly Leu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly
115 120 125

Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu
145 150 155 160

Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr
165 170 175

Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu
180 185 190

Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp

195 200 205

Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
210 215 220

Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
225 230 235 240

Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp
245 250 255

Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp
260 265 270

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
275 280 285

Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp
290 295 300

Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro
305 310 315 320

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala
325 330 335

Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp
340 345 350

Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile
355 360 365

Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn
370 375 380

Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys
385 390 395 400

Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys
 405 410 415

Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu
 420 425 430

Ser His Ser Pro Gly Lys
 435

<210> 84

<211> 651

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид легкого ланцюга кролячого антитіла 10236 до mIgG

<400> 84

gcctatgata tgaccagac tccagcctct gtggaggttag ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagc agttgggttag cctggtatca gcagaaacca 120

ggtcagcctc ccaagctcct gatctatctg gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg 180

cggttcaaag gcagtggatc tgggacacag ttcacttca ccatcagcgg cgtggagtgt 240

gccgatgctg ccacttacta ctgtcaacag ggttatacta atagtaatat tattaatact 300

ttcggcggag ggaccgaggt ggtgggtcaaa cgtacggatg ctgcaccaac tgtatccatc 360

ttcccacat ccagttagca gttaacatct ggaggtgcct cagtcgtgtg cttcttgaac 420

aacttctacc ccaaagacat caatgtcaag tggaagattg atggcagtga acgacaaaat 480

ggcgtcctga acagttggac tgatcaggac agcaaagact gcacctacag catgagcagc 540

accctcacgt tgaccaagga cgagtatgaa cgacataaca gctatacctg tgaggccact 600

cacaagacat caacttcacc cattgtcaag agcttcaaca ggaatgagtg t 651

<210> 85

<211> 1386

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид важкого ланцюга кролячого антитіла 10236 до mIgG

<400> 85

cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccctt gacactcacc 60

tgcaccgtct ctgggttccc cctcagtaat tatgcaatga gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatggat cggagacatt taccctagt atactataga ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaa acctcgacca cggtaggagct gaaaatcacg 240

ggtagcaca ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gagacaaca tgactatggt 300

ctggacatct ggggcccagg caccctggtc accgtctcga gtgcaaaaac gacaccccca 360

tctgtctatc cactggcccc tggatctgct gcccaacta actccatggt gaccctggga 420

tgcttggtca agggctattt ccctgagcca gtgacagtga cctggaactc tggatccctg 480

tccagcgttg tgacacatt ccagctgtc ctgagcttg acctctacac tctgagcagc 540

tcagtactg tcccctccag caccctggcc agcgagaccg tcacctgcaa cgttggccac 600

ccggccagca gcaccaaggt ggacaagaaa attgtgcca gggattgtgg ttgtaagcct 660

tgcatatgta cagtagcaga agtatcatct gtctcatct tcccccaaa gcccaaggat 720

gtgctacca ttactctgac tcctaaggct acgtgtgttg tgtagacat cagcaaggat 780

gatcccgagg tccagttcag ctggtttgta gatgatgtgg aggtgcacac agctcagacg 840

caacccggg aggagcagtt caacagcact ttccgctcag tcagtgaact tccatcatg 900

caccaggact ggctcaatgg caaggagttc aaatgcaggg tcaacagtgc agctttccct 960

gccccatcg agaaaaccat ctcaaaacc aaaggcagac cgaaggctcc acaggtgtac 1020

accattccac ctccaagga gcagatggcc aaggataaag tcagtctgac ctgcatgata 1080

acagacttct tccctgaaga cattactgtg gaggggcagt ggaatgggca gccagcggag 1140

aactacaaga acactcagcc catcatggac acagatggct cttacttcgt ctacagcaag 1200

ctcaatgtgc agaagagcaa ctgggaggca ggaaatactt tcacctgctc tgtgttacat 1260

gagggcctgc acaaccacca tactgagaag agcctctccc actctcctgg taaatgatcc 1320

cagtgtcctt ggagccctct ggtcctacag gactctgaca cctacctcca cccctccctg 1380

tataaa 1386

<210> 86

<211> 214

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Fab-фрагмент легкого ланцюга антитіла 10236

<400> 86

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

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Asn Ser Asn
85 90 95

Ile Ile Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr
100 105 110

Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp Gln Val
115 120 125

Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr Phe Pro
130 135 140

Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr Thr Gly
145 150 155 160

Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr Tyr Asn
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser His Lys
180 185 190

Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val Val Gln Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Asp Cys
210

<210> 87

<211> 642

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид Fab-фрагменту кролячого легкого ланцюга антитіла 10236

<400> 87

gcctatgata tgaccagac tccagcctct gtggaggttag ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagc agttgggttag cctggtatca gcagaaacca 120

ggtcagcctc ccaagctcct gatctatctg gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg 180
 cggttcaaag gcagtggatc tgggacacag ttactctca ccatcagcgg cgtggagtgt 240
 gccgatgctg ccacttacta ctgtcaacag ggttatacta atagtaatat tattaatact 300
 ttcggcggag ggaccgaggt ggtgggtcaaa cgtacgccag ttgcacctac tgtcctcatc 360
 ttcccaccag ctgctgatca ggtggcaact ggaacagtca ccatcgtgtg tgtggcgaat 420
 aaatactttc ccgatgtcac cgtcacctgg gaggtggatg gcaccacca aacaactggc 480
 atcgagaaca gtaaaacacc gcagaattct gcagattgta cctacaacct cagcagcact 540
 ctgacactga ccagcacaca gtacaacagc cacaagagt acacctgcaa ggtgaccag 600
 ggcacgacct cagtcgtcca gagcttcaat aggggtgact gt 642

<210> 88

<211> 217

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Fab-фрагмент важкого ланцюга антитіла 10236

<400> 88

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

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

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

Asp Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

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

Gly Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Asn
 85 90 95

Asn Asp Tyr Gly Leu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys
 115 120 125

Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
 130 135 140

Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu
145 150 155 160

Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val
 180 185 190

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
 195 200 205

Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro
 210 215

<210> 89

<211> 651

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> нуклеотид Fab-фрагменту важкого ланцюга антитіла 10236

<400> 89

```
cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccctt gacactcacc    60
tgcaccgtct ctgggttccc cctcagtaat tatgcaatga gctgggtccg ccaggctcca    120
gggaaggggc tggaatggat cggagacatt tctcctagtg atatcataga ctacgcgagc    180
tgggcgaaag gccgattcac catctccaa acctcgacca cggaggagct gaaaatcacg    240
ggtcgacaa ccgaggacac ggccacatat ttctgtgcca gagacaacaa tgactatggt    300
ctggacatct ggggcccagg caccctggtc accgtctcga gtgggcaacc taaggctcca    360
tcagtcttcc cactggcccc ctgtgcggg gacacacca gctccacggt gaccctgggc    420
tgcctgttca aaggctacct cccggagcca gtgacctga cctggaactc gggcacctc    480
accaatgggg tacgcacctt cccgtccgtc cggcagtcct caggcctcta ctcgtgagc    540
agcgtggtga gcgtgacctc aagcagccag cccgtcacct gcaacgtggc ccaccagcc    600
accaacacca aagtgacaa gaccgttgcg ccctcgacat gcagcaagcc c          651
```

<210> 90

<211> 216

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Fab-фрагмент легкого ланцюга антитіла 10273

<400> 90

```
Ala Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Met Ser Ala Ala Val Gly
1      5      10      15
```

```
Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
      20      25      30
```

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

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Asp
85 90 95

Asp Val Asp Thr Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

Arg Thr Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp
115 120 125

Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr
130 135 140

Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr
145 150 155 160

Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr
165 170 175

Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser
180 185 190

His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val Val
195 200 205

Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
210 215

<210> 91
<211> 648
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> нуклеотид Fab-фрагменту легкого ланцюга антитіла 10273

<400> 91
gcagtcgtgc tgactcagac accatcaccc atgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcagttgcc agtccagtca gagtgtttat aataataacg acttagcctg gtatcagcag 120

aaaccagggc agcctcctaa gctcctgac tacagggcat cactctggc atctggggtc 180

ccgtcgcggt tcagcggcag tggatctggg acacagttca ctctacccat cagcggcgtg 240

cagtgtagc atgtgccac ttactactgt ctaggcggtt atgatgatga tgtgatacg 300

tatactttcg gcggaggac cgaggtggtg gtcaaacgta cgccagttgc acctactgtc 360

ctcatcttc caccagctgc tgatcaggtg gcaactggaa cagtcacccat cgtgtgtgtg 420

gcgaataaat actttccga tgtcacgctc acctgggagg tggatggcac cacccaaaca 480

actggcatcg agaacagtaa aacaccgcag aattctgcag attgtaccta caacctcagc 540

agcactctga cactgaccag cacacagtac aacagccaca aagagtacac ctgcaagggtg 600

accagggca cgacctcagt cgtccagagc ttcaataggg gtgactgt 648

<210> 92
<211> 228
<212> БЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Fab-фрагмент важкого ланцюга антитіла 10273

<400> 92

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

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

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

Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp His
85 90 95

Ile Tyr Arg Tyr Asp Asp Tyr Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

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

Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro
130 135 140

Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg
165 170 175

Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala
195 200 205

His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr
210 215 220

Cys Ser Lys Pro
225

<210> 93

<211> 684

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид Fab-фрагменту важкого ланцюга антитіла 10273

<400> 93

cagtcggtgg aggagtcgagg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccctt gacactcacc 60

tgcacagtct ctggattctc cctcagtagc tatggaatga gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatggat cggaattatt agtagtagtg gtagcacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaag acctcgacca cgggtggatct gaaaatcgcc 240

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gagatcacat ttataggtac 300

gatgactatg gtgattaccc tacctactac ggcatggacc cctggggccc aggcaccctg 360

gtcaccgtct cgagtgggca acctaaggct ccatcagtct tccactggc cccctgctgc 420

ggggacacac ccagctccac ggtgaccctg ggctgcctgg tcaaaggcta cctcccggag 480

ccagtgaccg tgacctggaa ctcgggcacc ctaccaatg gggtacgcac cttcccgtcc 540

gtccggcagt cctcaggcct ctactcgtg agcagcgtgg tgagcgtgac ctcaagcagc 600

cagcccgctca cctgcaacgt ggcccaccca gccaccaaca ccaaagtgga caagaccgtt 660

gcgccctcga catgcagcaa gccc

684

<210> 94

<211> 316

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг Fab-фрагменту людського LEKTI D5

<400> 94

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

65 70 75 80

Gly Gly Gly Ser Arg Glu Ile Val Lys Leu Cys Ser Gln Tyr Gln Asn

85 90 95

Gln Ala Lys Asn Gly Ile Leu Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile

100 105 110

Arg Gly Pro Asp Gly Lys Met His Gly Asn Leu Cys Ser Met Cys Gln

115 120 125

Ala Tyr Phe Gln Ala Glu Asn Glu Glu Lys Lys Lys Ala Glu Ala Arg

130 135 140

Ala Arg Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Lys Asn Thr Val

145 150 155 160

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
165 170 175

Cys Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
180 185 190

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
195 200 205

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
210 215 220

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
225 230 235 240

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
245 250 255

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
260 265 270

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
275 280 285

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
290 295 300

Ser Cys His His His His His His His His His His
305 310 315

<210> 95

<211> 217

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Легкий ланцюг Fab-фрагменту людського LEKTI D5

<400> 95

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

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

Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile
85 90 95

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 96

<211> 217

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Кролячий/людський химерний ланцюг (hCK S171C) антитіла 10236

<400> 96

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

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Asn Ser Asn
85 90 95

Ile Ile Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Cys Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 97

<211> 441

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Кролячий/людський химерний важкий ланцюг антитіла 10236

<400> 97

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro

1 5 10 15

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

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

Asp Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

Gly Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Asn
85 90 95

Asn Asp Tyr Gly Leu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys
115 120 125

Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
225 230 235 240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
245 250 255

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
305 310 315 320

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
385 390 395 400

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 98

<211> 308

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LEKTI-D5-Fc TEV

<400> 98

Glu Ile Val Lys Leu Cys Ser Gln Tyr Gln Asn Gln Ala Lys Asn Gly
1 5 10 15

Ile Leu Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Arg Gly Pro Asp Gly
20 25 30

Lys Met His Gly Asn Leu Cys Ser Met Cys Gln Ala Tyr Phe Gln Ala
35 40 45

Glu Asn Glu Glu Lys Lys Lys Ala Glu Ala Arg Ala Arg Asn Leu Glu
50 55 60

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

65 70 75 80

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
85 90 95

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
100 105 110

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
115 120 125

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
130 135 140

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
145 150 155 160

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
165 170 175

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
180 185 190

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
195 200 205

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
210 215 220

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
225 230 235 240

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
245 250 255

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
260 265 270

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
275 280 285

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
290 295 300

Ser Pro Gly Lys
305

<210> 99

<211> 315

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LEKTI-D8Fc TEV

<400> 99

Glu Ala Ala Lys Glu Ile Cys Ser Glu Phe Arg Asp Gln Val Arg Asn
1 5 10 15

Gly Thr Leu Ile Cys Thr Arg Glu His Asn Pro Val Arg Gly Pro Asp
20 25 30

Gly Lys Met His Gly Asn Lys Cys Ala Met Cys Ala Ser Val Phe Lys
35 40 45

Leu Glu Glu Glu Glu Lys Lys Asn Asp Lys Glu Glu Lys Gly Lys Val
50 55 60

Glu Ala Glu Lys Val Leu Glu Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Val Asp
65 70 75 80

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
85 90 95

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
100 105 110

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
115 120 125

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
130 135 140

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
145 150 155 160

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
165 170 175

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
180 185 190

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
195 200 205

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
210 215 220

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
225 230 235 240

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
245 250 255

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

260 265 270

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
275 280 285

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
290 295 300

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
305 310 315

<210> 100

<211> 651

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид легкого ланцюга антитіла 10236 gL5 мінус RS

<400> 100

```
gcgtatgaca tgactcagag cccgtccagc ctgtccgcgt ccgtgggaga tcgctgact    60
atcacgtgtc aggccacaca atccattagc tcctggctgg cctggtacca gcagaagcca    120
gggaaggctc cgaagctgct gatctacctg gcctccaccc ttgcctccgg cgtgccttca    180
cggtttaaag gatccggctc gggaaccgac ttcaccctca ccatctcgtc gctccaaccc    240
gaggacttcg caacctacta ctgccaacag gggatatcca acagcaacat catcaacacc    300
ttcggtggcg gaactaaggt cgaatatcaag cgtacgggtg ccgctccctc cgtgttcac    360
ttccaccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgcct ccgtcgtgtg cctgctgaac    420
aacttctacc cccgcgaggc caaggtgcag tggaagggtg acaacgccct gcagtccggc    480
aactcccagg aatccgtcac cgagcaggac tccaaggaca gcacctactc cctgtcctcc    540
accctgacct tgtccaaggc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg cgaagtgacc    600
caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag tccttcaacc ggggcgagtg c          651
```

<210> 101

<211> 651

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид легкого ланцюга антитіла 10236 gL7 плюс RS

<400> 101

```
gcgatcgaca tgactcagag cccgtccagc ctgtccgcgt ccgtgggaga tcgctgact    60
atcacgtgtc aggccacaca atccattagc tcctggctgg cctggtacca gcagaagcca    120
gggaaggctc cgaagctgct gatctacctg gcctccaccc ttgcctccgg cgtgccttca    180
cggttttctg gatccggctc gggaaccgac ttcaccctca ccatctcgtc gctccaaccc    240
gaggacttcg caacctacta ctgccaacag gggatatcca acagcaacat catcaacacc    300
ttcggtgggc gaactaaggt cgaatatcaag cgtacgggtg ccgtccctc cgtgttcac    360
ttccaccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgcct ccgtcgtgtg cctgctgaac    420
aacttctacc cccgcgaggc caaggtgcag tggaagggtg acaacgcct gcagtccggc    480
aactcccagg aatccgtcac cgagcaggac tccaaggaca gcacctactc cctgtcctcc    540
accctgacct tgtccaaggc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg cgaagtgacc    600
caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag tccttcaacc ggggcgagtg c          651
```

<210> 102

<211> 651

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид легкого ланцюга антитіла 10236 gL8 плюс RS

<400> 102

```
gcgatcaga tgactcagag cccgtccagc ctgtccgcgt ccgtgggaga tcgctgact    60
atcacgtgtc aggccacaca atccattagc tcctggctgg cctggtacca gcagaagcca    120
gggaaggctc cgaagctgct gatctacctg gcctccaccc ttgcctccgg cgtgccttca    180
```

cggttttctg gatccggctc gggaaccgac ttcaccctca ccatctcgtc gctccaaccc 240
 gaggacttcg caacctacta ctgccaacag gggatatcca acagcaacat catcaacacc 300
 ttcggtggcg gaactaaggt cgaatcaag cgtacgggtg ccgctccctc cgtgttcac 360
 ttcccaccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgcct ccgtcgtgtg cctgctgaac 420
 aacttctacc cccgcgaggc caaggtgcag tggaagggtg acaacgccct gcagtccggc 480
 aactcccagg aatccgtcac cgagcaggac tccaaggaca gcacctactc cctgtcctcc 540
 accctgaccc tgtccaaggc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg cgaagtgacc 600
 caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag tccttcaacc ggggcgagtg c 651

<210> 103

<211> 651

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид легкого ланцюга антитіла 10236 gL7 Q24R плюс RS

<400> 103

gcgtatgaca tgactcagag cccgtccagc ctgtccgct ccgtgggaga tcgcgtgact 60
 atcacgtgtc gggcctcaca atccattagc tcctggctgg cctggtacca gcagaagcca 120
 gggaaggctc cgaagctgct gatctacctg gcctccacc ttgcctccgg cgtgccttca 180
 cggttttctg gatccggctc gggaaccgac ttcaccctca ccatctcgtc gctccaaccc 240
 gaggacttcg caacctacta ctgccaacag gggatatcca acagcaacat catcaacacc 300
 ttcggtggcg gaactaaggt cgaatcaag cgtacgggtg ccgctccctc cgtgttcac 360
 ttcccaccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgcct ccgtcgtgtg cctgctgaac 420
 aacttctacc cccgcgaggc caaggtgcag tggaagggtg acaacgccct gcagtccggc 480
 aactcccagg aatccgtcac cgagcaggac tccaaggaca gcacctactc cctgtcctcc 540
 accctgaccc tgtccaaggc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg cgaagtgacc 600

caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag tccttcaacc ggggcgagtg c 651

<210> 104

<211> 651

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотид легкого ланцюга антитіла 10236 gL6 Q24K плюс RS

<400> 104

gcgtatgaca tgactcagag cccgtccagc ctgtccgct cgtgggaga tcgctgact 60

atcacgtgta aggccacaca atccattagc tcctggctgg cctggtacca gcagaagcca 120

gggaaggctc cgaagctgct gatctacctg gcctccaccc ttgcctccgg cgtgccttca 180

cggttttctg gatccggctc gggaaccgac ttcaccctca ccatctcgtc gctccaaccc 240

gaggacttcg caacctacta ctgccaacag gggatatacca acagcaacat catcaacacc 300

ttcggtggcg gaactaaggt cgaatcaag cgtacggtgg ccgctccctc cgtgttcac 360

ttccaccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgcct ccgtcgtgtg cctgctgaac 420

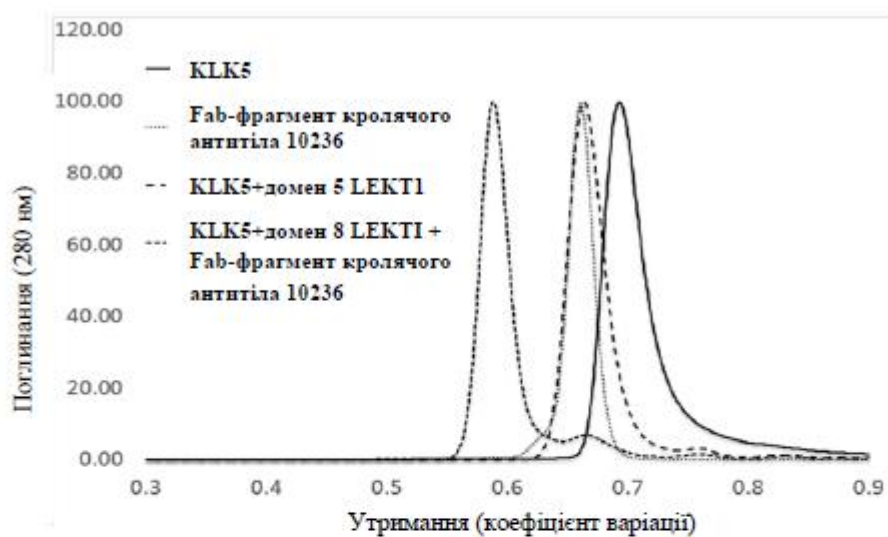
aacttctacc cccgcgaggc caaggtgcag tggaagggtg acaacgccct gcagtccggc 480

aactcccagg aatccgtcac cgagcaggac tccaaggaca gcacctactc cctgtcctcc 540

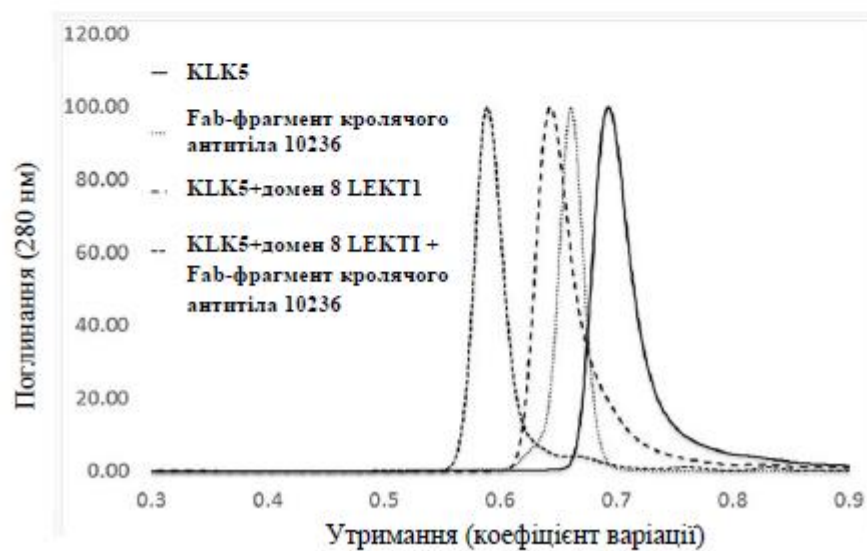
accctgaccc tgtccaaggc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg cgaagtgacc 600

caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag tccttcaacc ggggcgagtg c 651

A



B



Фіг. 1

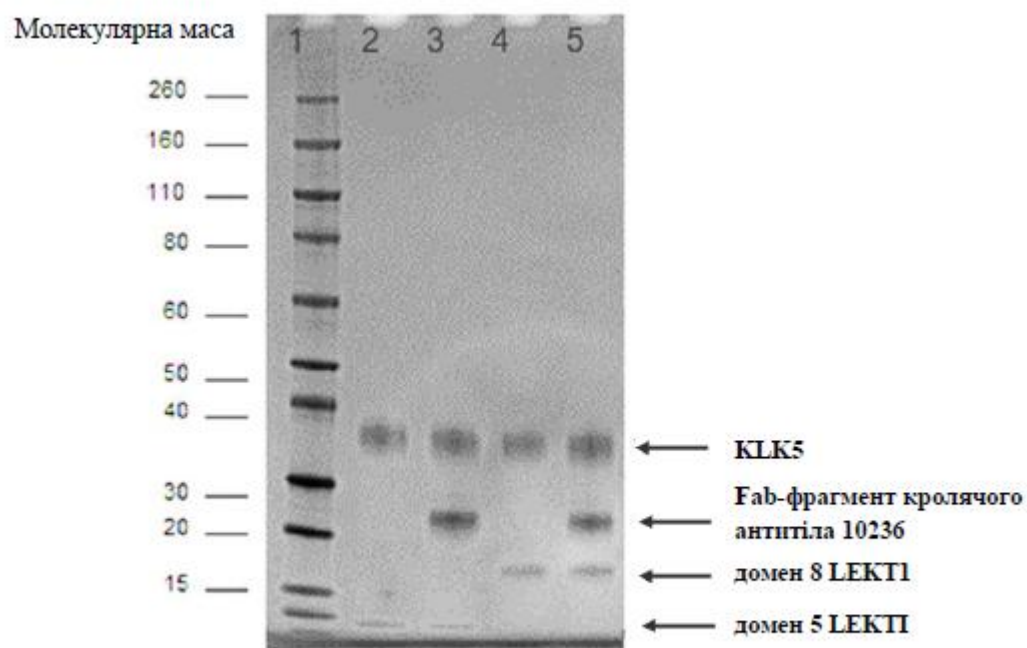


Fig. 2

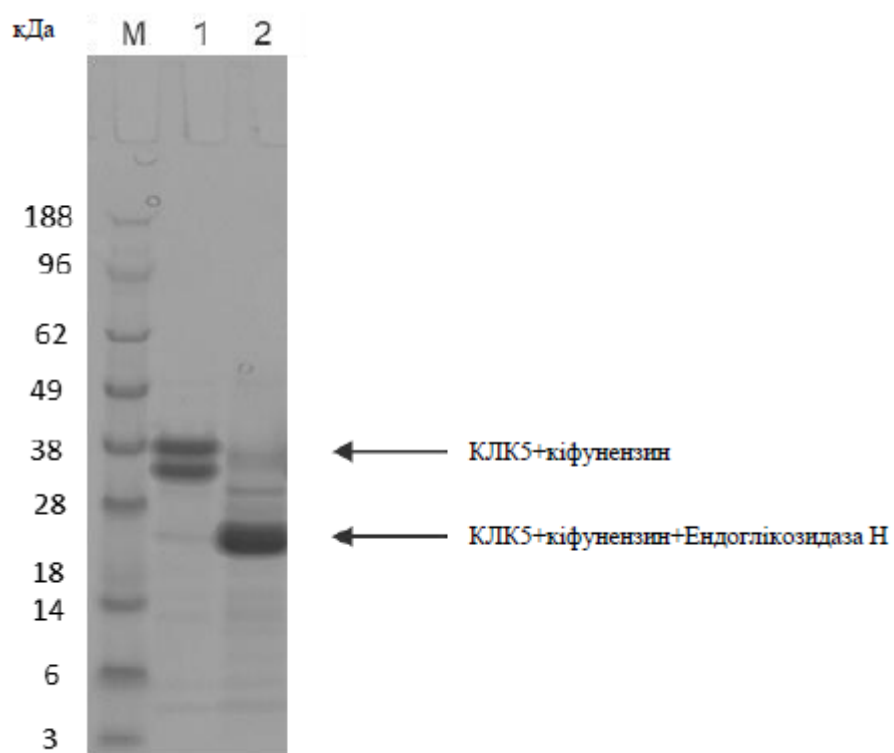


Fig. 3

A

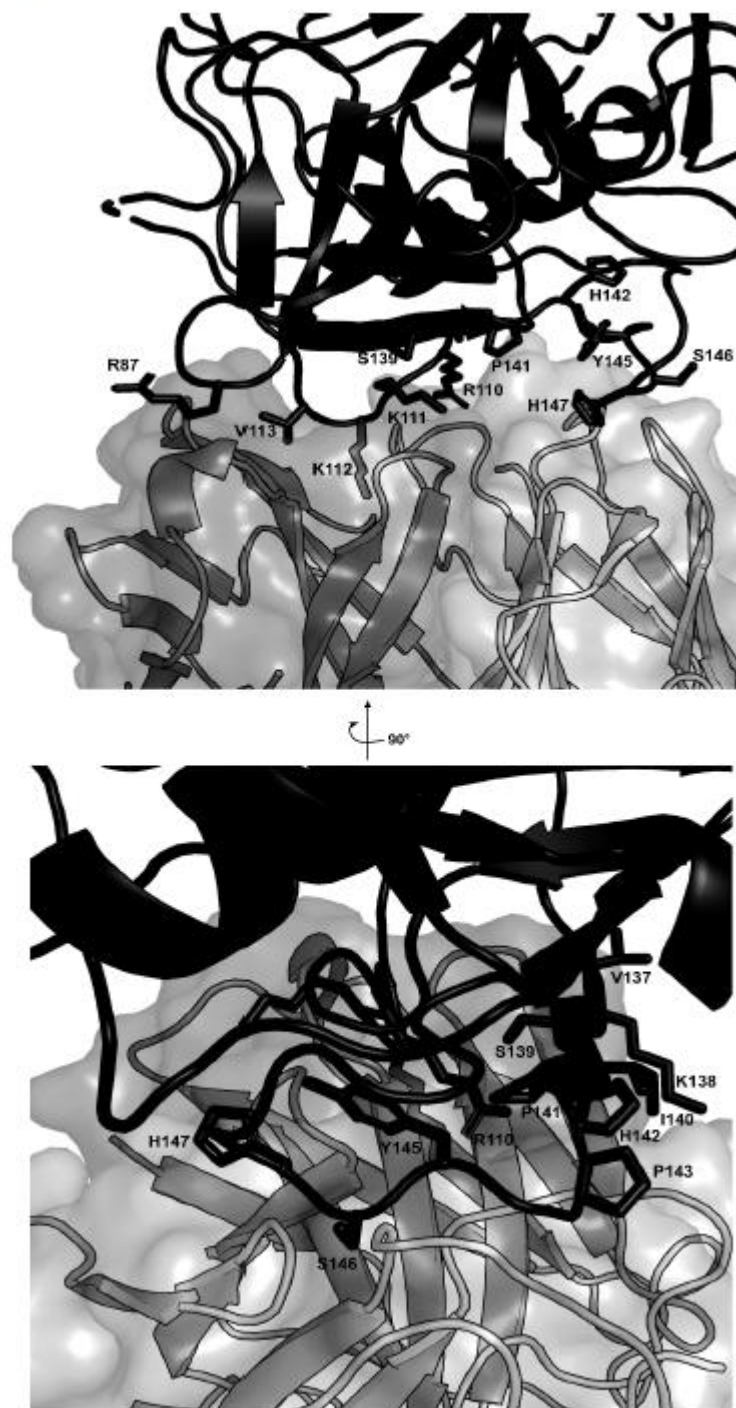
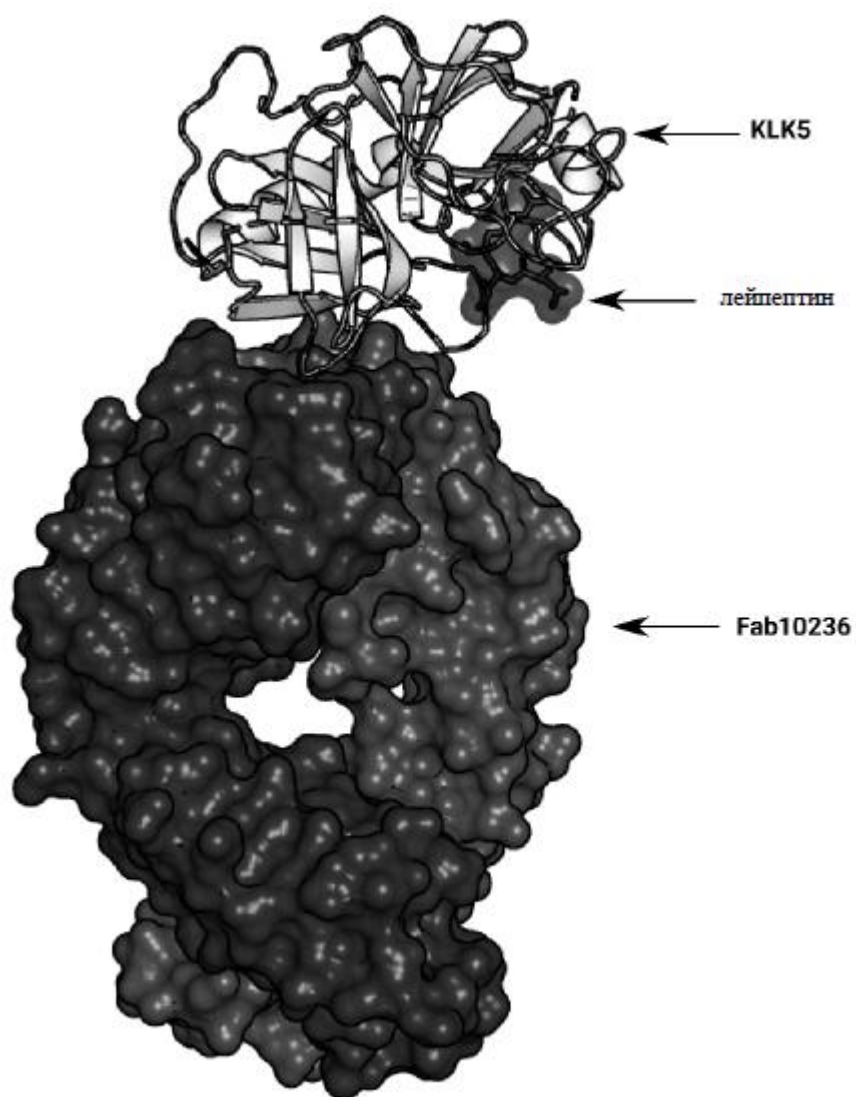
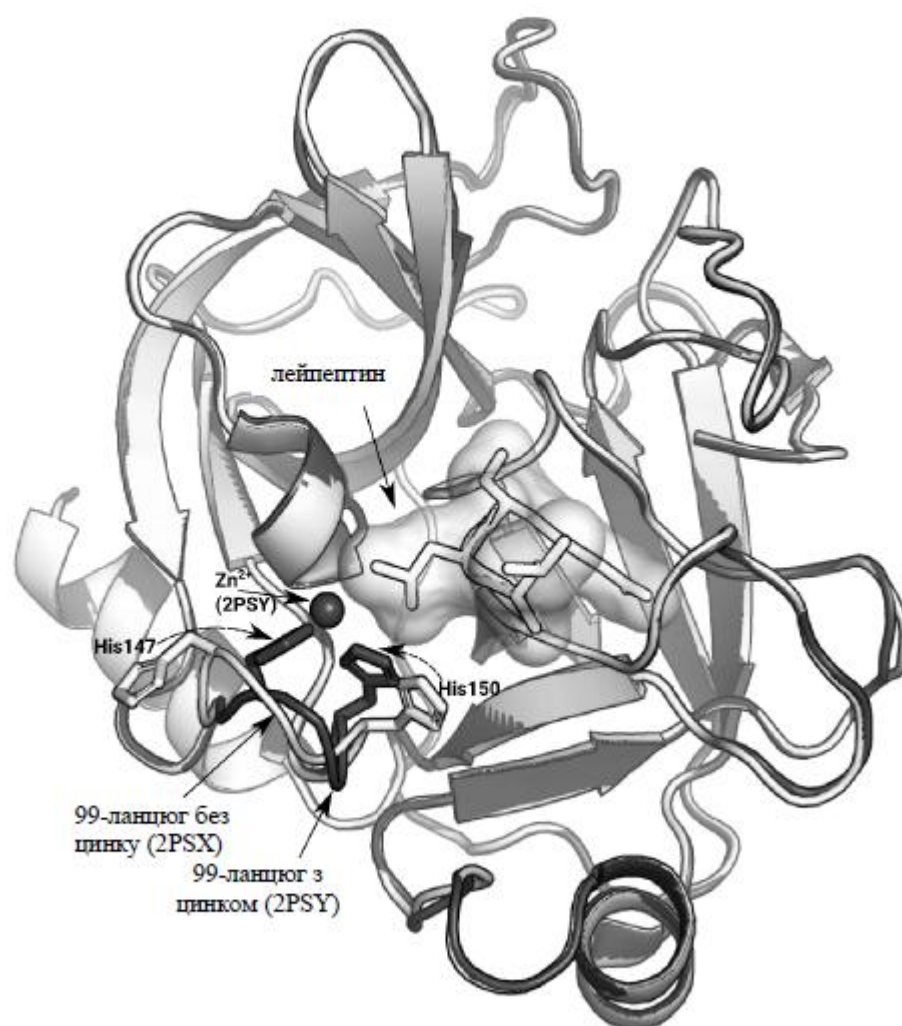


Fig. 4

В

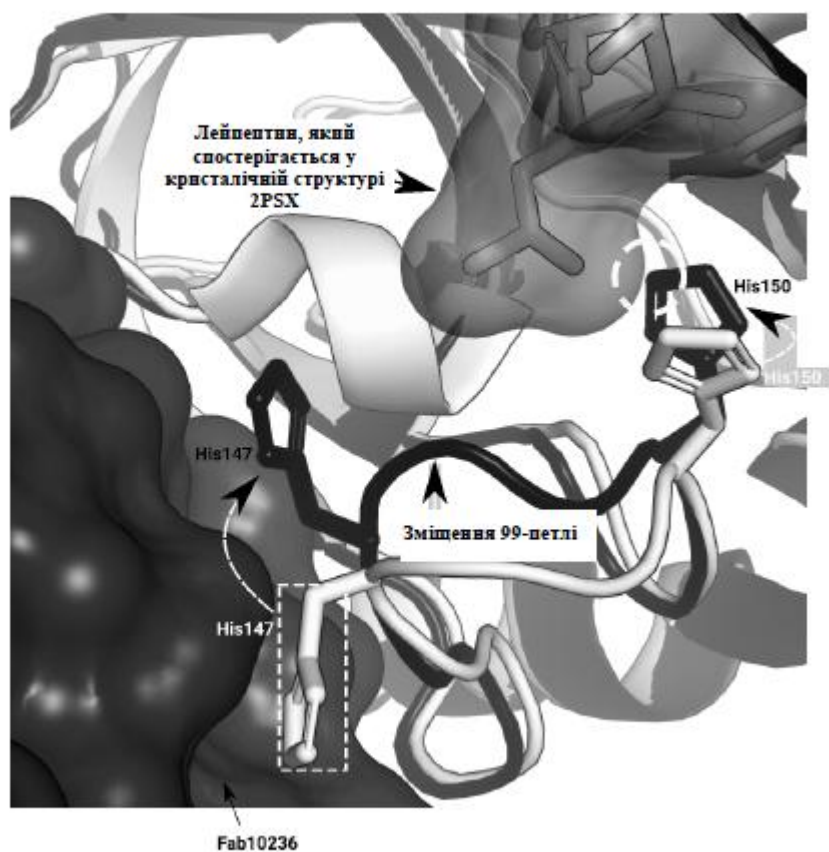


Фиг. 4 (продовження)

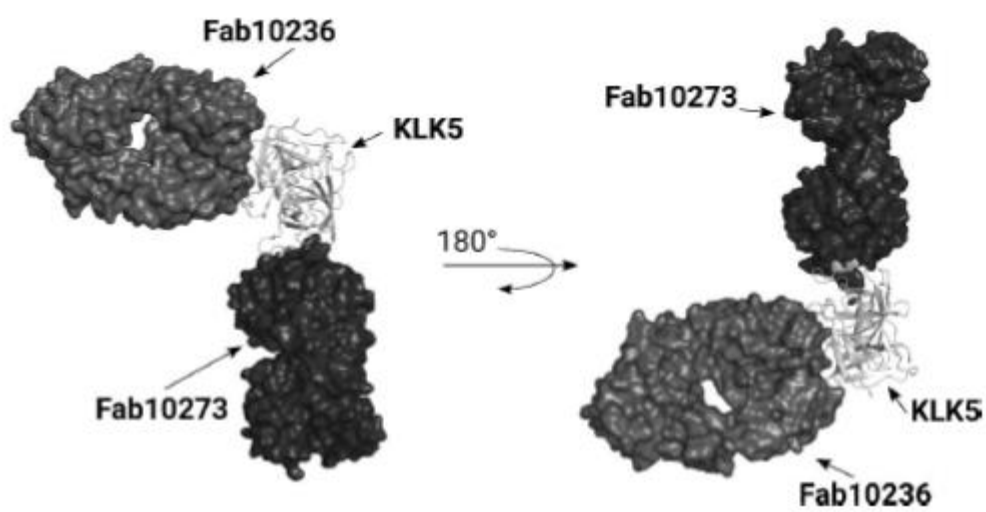


Фіг. 4 (продовження)

D



Фіг. 4 (продовження)



Фіг. 5

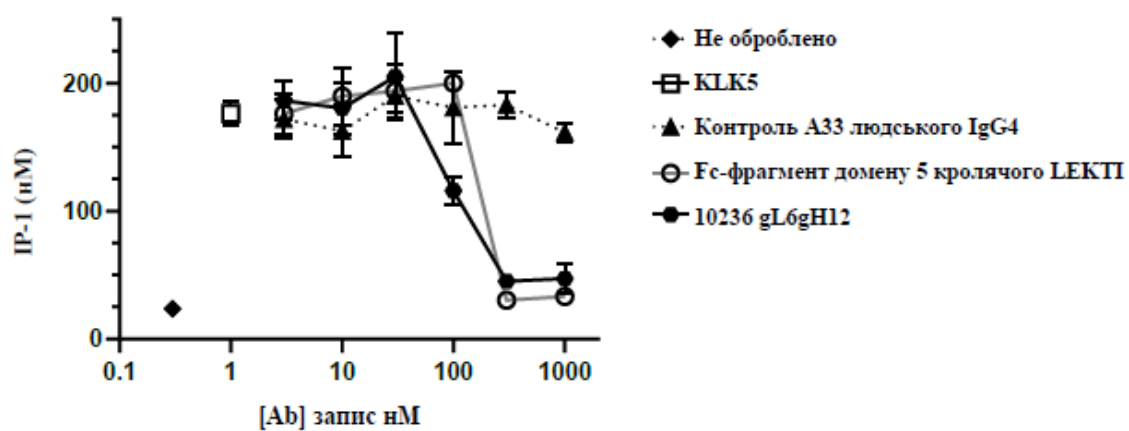
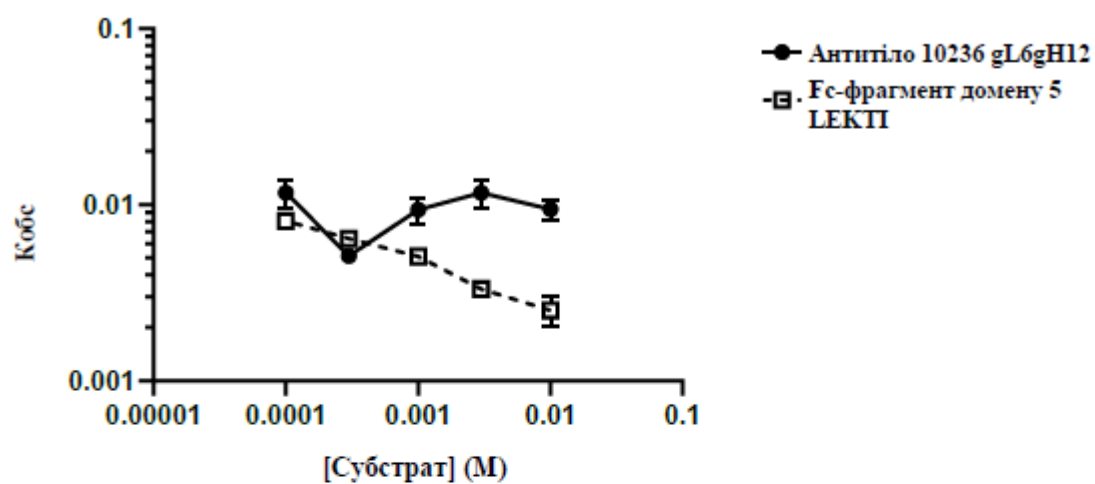


Fig. 9

A



B

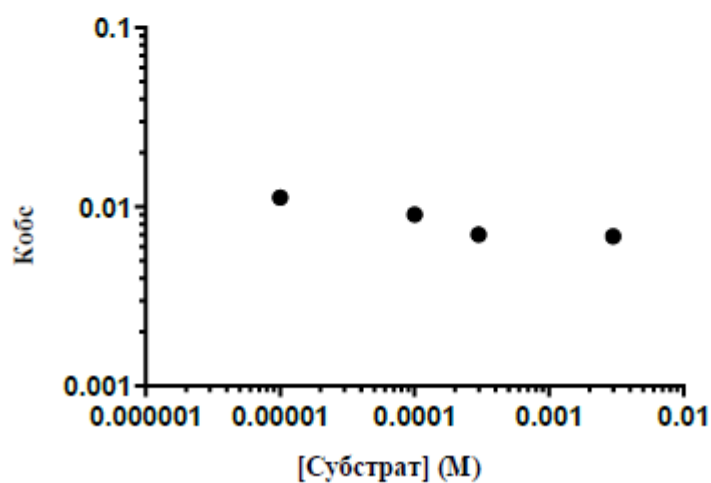


Fig. 10

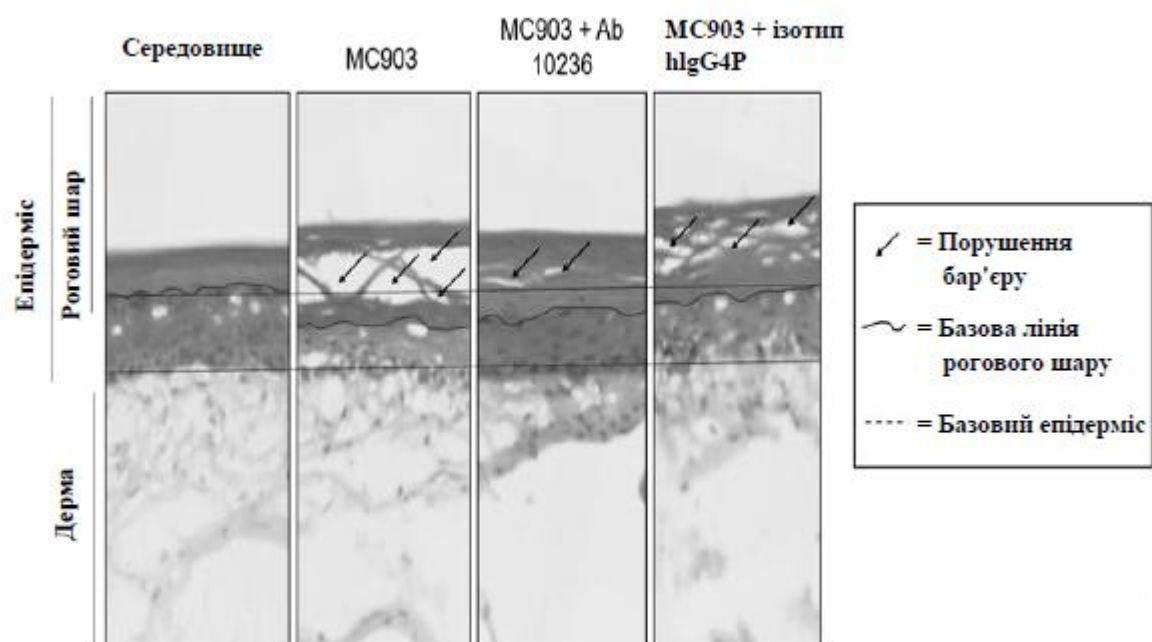


Fig. 11

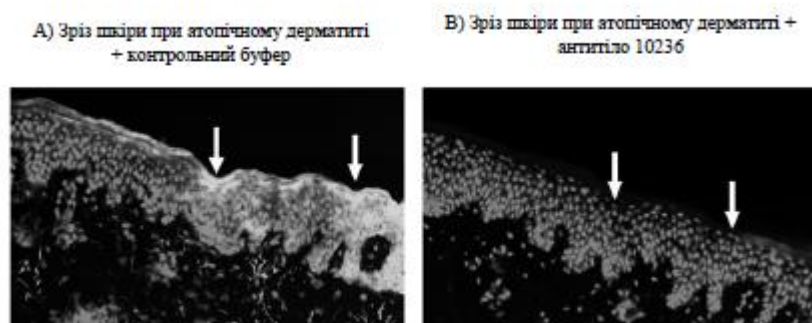
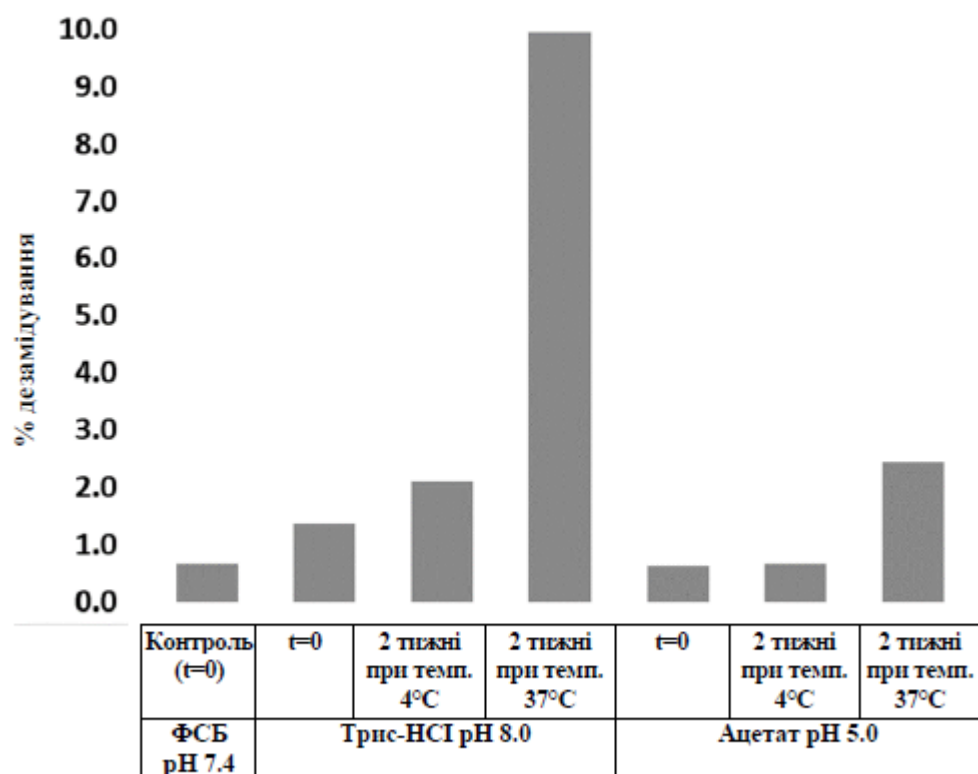


Fig. 12

Дезамідування в 10236gL6gH12
пептид ділянки CDR3 легкого ланцюга TNSNIINTF (N94)



Фіг. 13