

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047781**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|--|--|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.09 | (51) Int. Cl. <i>C07K 16/24</i> (2006.01)
<i>A61K 39/395</i> (2006.01)
<i>C12P 21/00</i> (2006.01)
<i>C12N 15/63</i> (2006.01)
<i>C07H 21/00</i> (2006.01)
<i>A61P 29/00</i> (2006.01)
<i>A61P 37/00</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки
202193002 | |
| (22) Дата подачи заявки
2015.09.03 | |

(54) **СОЕДИНЕНИЕ, НАЦЕЛЕННОЕ НА ИЛ-23А И ФНО-АЛЬФА, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

- | | |
|--|--|
| (31) 62/045,498 | (56) US-A1-20120251541
US-A1-20140213772
US-B2-7250165
WO-A1-2012061448 |
| (32) 2014.09.03 | |
| (33) US | |
| (43) 2022.03.31 | |
| (62) 201790505; 2015.09.03 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE);
МЭКРОУДЖЕНИКС, ИНК. (US) | |
| (72) Изобретатель:
Барретт Рейчел Ребекка, Джонсон
Лесли С., Сингх Санджайа, Ласт-
Барни Кэтлин, Син До-Цун, Гиблин
Патрисия, Бродёр Скотт, Нагараджа
Неламангала (US) | |
| (74) Представитель:
Купцова М.В., Фелицына С.Б. (RU) | |

-
- (57) Изобретение связано с соединениями, специфическими к ИЛ-23А и ФНО-альфа, композициями, содержащими соединения, и способами их применения. Также раскрыты нуклеиновые кислоты, клетки и способы производства, связанные с соединениями и композициями.

B1

047781

047781

B1

Родственные заявки

В данной заявке заявляется приоритет по дате подачи согласно 35 U.S.C. §119 по предварительной заявке США с серийным номером 62/045498, поданной 3 сентября 2014, которая называется "Соединение нацеленное на ИЛ-23А и ФНО-АЛЬФА, и его применение", содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники

Воспаление включает в себя врожденный и адаптивный иммунный ответ, необходимый для борьбы с инфекцией. Однако когда воспаление становится неконтролируемым, могут развиваться аутоиммунные и аутовоспалительные заболевания, нейродегенеративные заболевания и даже рак. Установлено, что ингибирование активности провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ1, ФНО-альфа, ИЛ6, ИЛ12, ИЛ17, ИЛ18 или ИЛ23 уменьшает воспаление и подавляет специфические пути, которые активируют иммунные клетки.

Интерлейкин-23 (ИЛ23) представляет собой гетеродимерный цитокин, который состоит из двух субъединиц p40 и p19. Субъединицу p19 также называют ИЛ-23А. В то время как субъединица p19 является уникальной для ИЛ23, субъединица p40 также является частью цитокина ИЛ12. Было выяснено, что ИЛ23 представляет собой ключевой регулятор патогенных Th17, $\gamma\delta$ Т и врожденных лимфоидных клеток (ВЛК), которые запускают продуцирование ИЛ17, ИЛ22 и других цитокинов, что приводит к воспалению местных тканей и их повреждению. ИЛ23 способствует повышенной активности матриксной металлопротеазы ММР9, повышает ангиогенез, снижает инфильтрацию CD8⁺ Т-клеток, и вовлечен в развитие раковых опухолей. Кроме этого, в сочетании с ИЛ6 и ФНО-бета 1, ИЛ23 стимулирует "необученные" CD4⁺ Т-клетки к дифференциации в клетки Th17. В свою очередь, Th17 клетки производят ИЛ17, провоспалительный цитокин, который усиливает Т-клеточное примирование и стимулирует выработку провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ1, ИЛ6, ФНО-альфа, NOS-2, а также индуцирует экспрессию хемокинов, что приводит к воспалению и патогенезу болезни. ИЛ23 проявляет свое влияние через поверхностный клеточный рецептор, который состоит из ИЛ12 β 1 субъединицы рецептора ИЛ12, которая работает вместе с уникальной субъединицей ИЛ23R. Экспрессия ИЛ23R происходит только в отдельных популяциях иммунных клеток, и обнаружена главным образом в субпопуляциях Т-клеток ($\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ TCR⁺) и НК-клетках (натуральные киллеры).

У мышей, генетическая абляция гена ИЛ23p19 приводит к селективной потере функции ИЛ23, которая сопровождается значительным нарушением Т-зависимых иммунных ответов, в том числе пониженным производством антиген-специфических иммуноглобулинов и ослабленными реакциями задержанной гиперчувствительности (Ghilardi N, et al. (2004) *J. Immunol.* 172 (5): 2827-33). В нокаутных мышцах с недостатком или ИЛ23p40, или ИЛ23p19, или любой субъединицы рецептора ИЛ23 (ИЛ23R и ИЛ12-бета1), развиваются менее тяжелые симптомы в животных моделях рассеянного склероза, артрита и воспалительных заболеваний кишечника. Аналогичные результаты были получены при использовании специфических антител для ИЛ23p19 в ЕАЕ, и опосредованная Т-клеточная модель колита дополнительно подтверждает роль ИЛ23 в этих параметрах заболевания (Chen Y. et al. (2006) *J. Clin. Invest.* 116 (5): 1317-26; Elson CO. et al. (2007) *Gastroenterology* 132 (7): 2359-70). Это подчеркивает важность ИЛ23 в хроническом воспалении (Langowski et al. (2006) *Nature* 442 (7101): 461-5; Kikly K, et al. (2006) *Curr. Opin. Immunol.* 18 (6): 670-5). Кроме этого, повышенное продуцирование ИЛ23 рассматривается как основной фактор при воспалительных артритах и аутоиммунных воспалительных заболеваниях (Adamopoulos et al. (2011) *J. Immunol.* 187: 593-594; и Langris et al. (2005) *J. Exp. Med.* 201:233-240). Сообщается о связи между ИЛ23, его нисходящим цитокином ИЛ22 и формированием костной ткани в мышечной модельной системе, в которой ИЛ23 избыточно экспрессируется (Sherlock et al. (2012) *Nat. Med.* 18: 1069-76).

Гомотримерный ФНО- α цитокин экспрессируется преимущественно макрофагами, лимфоцитами, эпителиальными клетками, фибробластами и связывается с двумя разными типами рецепторов: ФНО-Р1 (рецептор 1 ФНО), который экспрессируется на многих типах клеток, и ФНОРП (рецептор 2 ФНО), с более ограниченной экспрессией на иммунных клетках (CD4⁺ Т-клетки, НК-клетки). Как и многие другие члены суперсемейства ФНО, ФНО- α существует как в мембранной, так и в растворимой форме, растворимые формы возникают при расщеплении мембранной формы металлопротеазой ADAM12 (TACE, ФНО- α преобразующей фермент). Обе, связанная с мембраной и растворимая формы цитокинов, являются биологически активными.

Фактор некроза опухоли (ФНО-альфа, ФНО- α) представляет собой провоспалительный цитокин, который стимулирует острую фазу воспаления. Фактор некроза опухоли увеличивает коэффициент проницаемости сосудов за счет индукции ИЛ8, тем самым привлекая макрофагов и нейтрофилов к месту инфекции. После этого, активированные макрофаги продолжают производить ФНО-альфа, тем самым поддерживая и усиливая воспалительную реакцию. Главная роль ФНО-альфа заключается в регуляции иммунных клеток; однако, ФНО-альфа также участвует в регуляции широкого спектра биологических процессов, которые включают клеточную пролиферацию, дифференциацию, апоптоз, метаболизм липидов и свертывания крови. ФНО-альфа может вызвать воспаление, способен индуцировать гибель клеток через апоптоз, ингибировать онкогенез, и ингибировать репликацию вирусов.

Нарушение регуляции выработки ФНО-альфа имеет место при множестве человеческих заболеваний, включая аутоиммунные заболевания (например, ревматоидный артрит (РА), болезнь Крона, рассеянный склероз), воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), язвенный колит, псориаз, токсический шок, реакцию трансплантата против хозяина, инсулинорезистентность, болезнь Альцгеймера, рак, и тяжелую депрессию (Swardfager W, et al. (2010) *Biol Psychiatry* 68 (10): 930-941; Locksley RM, et al. (2001) *Cell* 104 (4): 487-501; Dowlati et al., (2010) *Biol Psychiatry* 67 (5): 446-457; Brynskov J. et al. (2002) *Gut* 51 (1): 37-43).

Были применены антитела в качестве биологической терапии для ингибирования ФНО-альфа и ИЛ23 при лечении различных воспалительных заболеваний. Infliximab (Centocor, Малверн, Пенсильвания), который описан в патентах США № 6277969, № 6284471 и № 6790444, представляет собой химерное анти-ФНО-альфа моноклональное IgG антитело, которое несет константные области человеческого IgG4 и переменные области мыши, и применяется в клинике для лечения ревматоидного артрита, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита, болезни Крона, язвенного колита и бляшечного спондилоартрита. Моноклональное антитело адалимумаб (клон D2E7; Abbott Laboratories, Эбботт Парк, Иллинойс), описанное в патенте США № 6090382, представляет собой анти-ФНО-альфа препарат, который применяют в клинике для лечения ревматоидного артрита, болезни Крона, псориаза, псориатического артрита, анкилозирующего спондилоартрита, ювенильного идиопатического артрита. Голимумаб представляет собой блокатор ФНО-альфа, который применяется для лечения ревматоидного артрита, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита и неспецифического язвенного колита. Кроме этого, человеческое моноклональное антитело устекинумаб (Centocor, Inc, Малверн, Пенсильвания), описанное в патенте США № 6902734 и патенте США № 7166285, направленное против интерлейкина 12 и интерлейкина 23 (особенно р40 субъединицы), применяется в клинике для лечения тяжелого бляшковидного псориаза и дополнительно изучается для лечения псориатического артрита, рассеянного склероза и саркоидоза. Однако, анти-ФНО-α терапии имеют зарегистрированные побочные эффекты [см., например, Keane J et al. (2001)]. Туберкулез связан с инфликсимабом, нейтрализующим средством фактора некроза опухоли α. *N Engl J Med* 345 (15): 1098-1104; Scheinfeld N. (2005) Adalimumab: a review of side effects. *Expert Opin Drug Saf.* 4(4): 637-41; Chovel-Sella A et al. (2012) Clinical efficacy and adverse effects of golimumab in the treatment of rheumatoid arthritis. *Isr Med Assoc J.* 14 (6): 390-4]. Выявление более эффективных способов лечения позволит вводить меньшие дозы, а также снизит расходы связанные с лечением.

Сохраняется потребность в композиции с повышенной эффективностью для лечения и предотвращения аутоиммунных или воспалительных заболеваний.

Сущность изобретения

В данном документе предлагаются соединения, специфические к ФНО-альфа и ИЛ23А, композиции, содержащие такие соединения, а также способы их применения и изготовления.

Аспекты раскрытия изобретения связаны с соединением, содержащим первый полипептид и второй полипептид, причем:

(А) указанный первый полипептид содержит:

(i) переменный домен легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), специфический к первому целевому белку;

(ii) переменный домен тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), специфический к второму целевому белку; и

(iii) шарнирную область, константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и константную область 3 тяжелой цепи (CH3); и

(Б) указанный второй полипептид содержит:

(i) переменный домен легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), специфический к указанному второму целевому белку; и

(ii) переменный домен тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), специфический к указанному первому целевому белку; при этом:

(i) указанные VL1 и VH1 объединяются, чтобы сформировать сайт, связывающий указанный первый целевой белок;

(ii) указанные VL2 и VH2 объединяются, чтобы сформировать сайт, связывающий указанный второй целевой белок;

(iii) указанная константная область 2 тяжелой цепи (CH2) содержит тирозин в позиции 252, треонин в позиции 254 и глутаминовую кислоту в позиции 256, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat для обычного антитела; и

(iv) указанный первый целевой белок представляет собой ФНО-альфа и указанный второй целевой белок представляет собой ИЛ-23А, или указанный первый целевой белок представляет собой ИЛ-23А и указанный второй целевой белок представляет собой ФНО-альфа, при этом:

(i) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 2, указанный VH1 содержит SEQ ID NO:1, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 8 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 7 или

(ii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4 или 6, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3 или 5,

указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 8 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 7 или

(iii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 8, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 7, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 2 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 1 или

(iv) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 8, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 7, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 или 6 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3 или 5.

В некоторых вариантах реализации изобретения (ii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 8 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах реализации изобретения (ii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 6, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 5, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 8 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах реализации изобретения (iv) указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 8 и указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах реализации изобретения, (iv) указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 6, указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 5, указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 8 и указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах реализации изобретения, указанный первый полипептид дополнительно содержит первый линкер между указанным VL1 и указанным VH2, а указанный второй полипептид дополнительно содержит второй линкер между указанными VL2 и указанным VH1. В некоторых вариантах реализации изобретения, указанный первый линкер или указанный второй линкер содержит аминокислотную последовательность GGGSGGG (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах реализации изобретения, указанный первый линкер и указанный второй линкер содержат аминокислотную последовательность GGGSGGG (SEQ ID NO: 9).

В некоторых вариантах реализации изобретения, указанный первый полипептид дополнительно содержит домен константной области 1 тяжелой цепи (CH1) и указанный второй полипептид дополнительно содержит домен константной области легкой цепи (CL), причем указанный CL и указанный CH1 объединяются через дисульфидную связь, чтобы сформировать домен C1.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанный первый полипептид дополнительно содержит третий линкер между указанным VH2 и указанным CH1, а указанный второй полипептид дополнительно содержит четвертый линкер между указанными VH1 и указанным CL. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный третий линкер содержит аминокислотную последовательность FNRGES (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах реализации изобретения указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность VEPKSS (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения указанный третий линкер содержит аминокислотную последовательность FNRGES (SEQ ID NO: 11) и указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность VEPKSS (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения третий линкер или указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность LGGGSG (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения указанный третий линкер и указанный четвертый линкер содержат аминокислотную последовательность LGGGSG (SEQ ID NO: 10).

В некоторых вариантах реализации изобретения указанная константная область 2 тяжелой цепи (CH2) содержит аланин в позиции 234 и аланин в позиции 235, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat для обычного антитела.

В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность указанной шарнирной области, указанной константной области 2 тяжелой цепи (CH2) или указанной константной области 3 тяжелой цепи (CH3) получена с IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения указанная шарнирная область содержит аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40).

В некоторых вариантах реализации изобретения, указанное соединение содержит два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, причем два указанных первых полипептида объединены через по меньшей мере одну дисульфидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения, указанное соединение содержит два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, причем два указанных первых полипептида объединены через по меньшей мере одну дисульфидную связь, и при этом каждый указанный первый полипептид объединен с одним указанным вторым полипептидом через по меньшей мере одну дисульфидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения:

(i) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

(ii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;

(iii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;

(iv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(v) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и

указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

(vi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;

(vii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;

(viii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;

(ix) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;

(x) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;

(xi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;

(xii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах реализации изобретения, указанное соединение отличается тем, что содержит два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, при этом указанные два первых полипептида объединены через по меньшей мере одну дисульфидную связь.

В некоторых вариантах реализации изобретения, указанное соединение содержит два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, и при этом CH2 и CH3, и CH1, если имеются, одного из первых полипептидов, объединенные с CH2 и CH3, и CH1, если имеются, другого из первых полипептидов, образуя тетравалентную молекулу. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное соединение содержит два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, причем каждый из указанных первых полипептидов содержит CH1, CH2 и CH3 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит CL, и при этом CH2 и CH3 одного из первых полипептидов объединяется с CH2 и CH3 другого с первых полипептидов, и CH1 каждого из указанных первых полипептидов объединяется с CL одного из указанных вторых полипептидов, образуя тетравалентную молекулу.

Другие аспекты раскрытия изобретения связаны с первым соединением, конкурирующим с другим соединением за связывание с ИЛ-23А и с ФНО-альфа, причем указанное первое соединение содержит третий полипептид и четвертый полипептид, при этом:

(А) указанный третий полипептид содержит:

(i) переменный домен легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), специфический к первому целевому белку;

(ii) переменный домен тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), специфический ко второму целевому белку; и

(iii) шарнирную область, константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и константную область 3 тяжелой цепи (CH3); и

(Б) указанный четвертый полипептид содержит:

(i) переменный домен легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), специфический к указанному второму целевому белку; и

(ii) переменный домен тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), специфический к указанному первому целевому белку; и при этом

(i) указанный VL1 и указанный VH1 объединяются для того, чтобы сформировать сайт связывания, связывающий указанный первый целевой белок;

(ii) указанный VL2 и указанный VH2 объединяются для того, чтобы сформировать сайт, связывающий указанный второй целевой белок; и

(iii) указанный первый целевой белок представляет собой ФНО-альфа и указанный второй целевой белок представляет собой ИЛ-23А или указанный первый целевой белок представляет собой ИЛ-23А и указанный второй целевой белок представляет собой ФНО-альфа,

и причем указанное второе соединение содержит первый полипептид и второй полипептид, при этом:

(i) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

(ii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;

(iii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;

(iv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(v) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

(vi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23

- и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;
- (vii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;
- (viii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;
- (ix) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;
- (x) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;
- (xi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;
- (xii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

Еще другие аспекты изобретения относятся к фармацевтической композиции, содержащей соединение, описанное в данном документе, такое как соединение, описанное выше.

Другие аспекты изобретения связаны со способом лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, включающим стадию, в которой субъекту вводят соединение, описанное в данном документе, такое как соединение, описанное выше, или фармацевтическую композицию, которая содержит указанное соединение.

Еще другие аспекты изобретения связаны с соединением, описанным в данном документе, таким как соединение, описанное выше, для применения в медицине. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное применение представляет собой лечение аутоиммунного или воспалительного заболевания.

Еще другие аспекты изобретения относятся к фармацевтической композиции, содержащей соединение, описанное в данном документе, такое как соединение, описанное выше. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное применение представляет собой лечение аутоиммунного или воспалительного заболевания.

Еще другие аспекты изобретения связаны с применением соединения, описанного в данном документе, таким как соединение, описанное выше, в производстве лекарственного средства для применения в медицине. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное применение представляет собой лечение аутоиммунного или воспалительного заболевания.

Другие аспекты изобретения связаны с применением фармацевтической композиции, описанной в данном документе, такой как фармацевтическая композиция, описанная выше, в производстве лекарственного средства для применения в медицине. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное применение представляет собой лечение аутоиммунного или воспалительного заболевания.

Еще другие аспекты изобретения связаны с нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, описанный в этом документе, такой как полипептид, описанный выше. Другие аспекты изобретения связаны с вектором, содержащим указанную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор содержит промотор, который функционально связан с указанной нуклеиновой кислотой. Другие аспекты изобретения связаны с клеткой, которая содержит указанную нуклеиновую кислоту или указанный вектор.

Другие аспекты изобретения связаны со способом продуцирования соединения или полипептидов, как описано в данном документе, например, полипептида, описанного выше, включающим стадию, в которой получают клетку, описанную в данном документе, такую клетку, которая описана выше, и стадию, в которой экспрессируют нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе, в указанной клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает стадии, в которых изолируют и очищают указанный полипептид или соединение.

Подробности одного или нескольких вариантов раскрытия изобретения изложены в описании ниже. Другие особенности и преимущества изобретения станут очевидными из следующих прилагаемых графических материалов и подробного описания нескольких вариантов реализации изобретения, а также с добавленной формулой изобретения.

Краткое описание графических материалов

Следующие графические материалы являются частью спецификации и включены для того, чтобы дополнительно продемонстрировать определенные аспекты данного раскрытия изобретения, которые можно лучше понять при помощи ссылки на один или более из этих графических материалов в сочетании с детальным описанием специфических вариантов реализации изобретения, которые представлены в настоящем документе.

На фиг. 1А проиллюстрирована диаграмма иллюстративного соединения, специфического к ФНО-альфа и ИЛ23А. Первая полипептидная цепь содержит CH₃, CH₂, VH₂ (VH_{II}) и VL₁ (VL_I) домены. Вторая полипептидная цепь содержит VH₁ (VH_I) и VL₂ (VL_{II}) домены. VL₁ и VH₁ являются специфическими к первому целевому белку (или ФНО-альфа, или ИЛ23А), а VL₂ и VH₂ являются специфическими ко второму целевому белку (или ИЛ23А, или ФНО-альфа). Верхняя панель иллюстрирует каждую полипеп-

тидную цепь отдельно. Нижняя панель иллюстрирует четырехвалентные соединения, сформированные путем объединения CH2 и CH3 доменов одного первого полипептида с CH2 и CH3 доменами другого первого полипептида. Связывающие домены для первого и второго целевого белка формируются путем объединения VH₁ и VL₁ и через объединение VH₂ и VL₂ соответственно.

На фиг. 1Б проиллюстрирована диаграмма иллюстративного соединения, специфического к ФНО-альфа и ИЛ23А. Первая полипептидная цепь содержит CH3, CH2, CH1, VH₂ (VH_{II}) и VL₁ (VL_I) домены. Вторая полипептидная цепь содержит CL, VH₁ (VH_I) и VL₂ (VL_{II}) домены. VL₁ и VH₁ являются специфическими к первому целевому белку (или ФНО-альфа, или ИЛ23А), а VL₂ и VH₂ являются специфическими ко второму целевому белку (или ИЛ23А, или ФНО-альфа). Верхняя панель иллюстрирует каждую полипептидную цепь отдельно. Нижняя панель иллюстрирует четырехвалентное соединение, сформированное путем объединения CH2 и CH3 доменов одного первого полипептида с CH2 и CH3 доменами другого первого полипептида. Связывающие домены первого и второго целевого белка формируются путем объединения VH₁ и VL₁, и через объединение VH₂ и VL₂ соответственно. Соединение дополнительно объединяется через взаимодействие между CL и CH1 доменами.

На фиг. 2 проиллюстрирован график, демонстрирующий сывороточные концентрации соединения М и его УТЕ мутанта - соединения А, у самцов яванских обезьян (среднее ± SD (стандартное отклонение), N=3) после 1 мг/кг ВВ (внутривенной) 10-минутной инфузии.

На фиг. 3 проиллюстрирован график, демонстрирующий сывороточные концентрации соединения О и его УТЕ мутанта - соединения Е, у самцов яванских обезьян (среднее ± SD (стандартное отклонение), N=3) после 1 мг/кг ВВ 10-минутной инфузии.

На фиг. 4 проиллюстрирована серия графиков и таблица, которые показывают, что соединение Е поддерживало функциональную эффективность против ИЛ23 *in vivo*. Мышам вводили эквивалентные дозы или контрольного антитела 3 (ИЛ23А моноклональное антитело), или соединения Е, и стимулировали человеческим ИЛ23 дважды для того, чтобы вызвать воспаление уха. Двадцать четыре часа после последней инъекции, уши были собраны и проанализированы по мышиному ИЛ17А и мышиному ИЛ22 в качестве меры функциональной блокады ИЛ23. Соединение Е поддерживало функциональную эффективность *in vivo* по сравнению с контрольным антителом 3 (ИЛ23А моноклональное антитело) в зависимости от конечной экспозиции и уровня эффективности. Контрольное антитело 3: незакрашенные квадраты, треугольники и ромбы. Соединение Е: окрашенные квадраты, треугольники и ромбы. МВ: молекулярный вес.

На фиг. 5 проиллюстрирована серия графиков и таблица, которые показывают, что соединение Е поддерживало функциональную эффективность против ФНО *in vivo*. Мышам вводили эквивалентные дозы или контрольного антитела 2 (ФНОα моноклональное антитело), или соединения Е, и стимулировали человеческим ФНО. Два часа после стимуляции цельная кровь была собрана, и сыворотка была проанализирована по мышиному КС и мышиному ИЛ-6 в качестве меры функциональной блокады ФНО. Соединение Е поддерживало функциональную эффективность *in vivo* по сравнению с анти-ФНО, в зависимости от конечной экспозиции и уровня эффективности. Контрольное антитело 3: незакрашенные квадраты, треугольники и ромбы. Соединение Е: окрашенные квадраты, треугольники и ромбы. МВ: молекулярный вес.

Подробное описание сущности изобретения

В данном изобретении описаны соединения, которые связываются с обоими - ФНО-альфа (в данном документе также называется ФНО-α или ФНОα) и ИЛ23А (также называется ИЛ23p19 или ИЛ-23А). На сегодняшний день нет одобренных соединений, мишенью которых являются ФНО-альфа и ИЛ23А. Существуют ограниченные исследования с одновременной нейтрализацией двух/более ключевых медиаторов воспаления, применяя биотерапевтический подход. Хотя эти исследования не смогли продемонстрировать улучшение в клинических результатах, которое оценивали при лечении ревматоидного артрита (РА), на сегодняшний день не описано бифункциональное терапевтическое средство, нацеленное на одну и ту же комбинацию. Кроме того, подобные комбинации могут увеличить побочные эффекты, такие как риск заражения (см., например, Genovese MC, Cohen S., Moreland, L., Lium D., Robbins S., et al. (2004). *Arth. Rheum.* 50, 1412-9; Genovese M.C., Cohen S., Moreland L., Lium D., Robbins S., et al. (2004). *Arth. Rheum.* 50, 1412-9; and Weinblatt M., Schiff M., Goldman, A. Kremer, , Luggen M., et al. (2007). *Ann. Rheum.Dis.* 66, 228-34). Дополнительно, такие биспецифические соединения трудно разрабатывать через проблемные моменты, связанные с растворимостью (например, агрегация) и стабильностью (например, неудовлетворительная фармакокинетика).

Неожиданно было обнаружено, что соединения, описанные в данном документе, связывающие как ФНО-альфа, так и ИЛ23А, имели аналогичные расширенные свойства по сравнению с индивидуальными антителами, которые нацелены на ИЛ23А, или на ФНО-альфа. Также было обнаружено, что эти соединения имеют подходящую фармакокинетическую, и были растворимыми в подходящих для целей дозирования диапазонах. Дополнительно, в некоторых вариантах реализации изобретения, существуют преимущества однократного введения над введением нескольких отдельных доз с точки зрения побочных эффектов индивидуальных методов лечения и пониженного дозирования. Кроме того, в некоторых вариантах ре-

лизации изобретения, СМС свойства соединений показали, что соединения имели низкий уровень агрегации. В одном аспекте, иллюстративные соединения продемонстрировали, в частности, низкую агрегацию. Также было также показано, что линкеры были оптимизированы с целью повышения стабильности и предотвращения расщеплению и, что мутация YTE улучшала аффинность Fc Rn. Считается, что соединения, которые описаны в данном документе, имеют одно или более полезных свойств, например, снижение побочных эффектов, повышение удобства и безопасности введения, увеличенный период полувыведения, увеличенную аффинность связывания, или повышенную ингибирующую активность, по сравнению со стандартными молекулами антител, например молекулой IgG или молекулой антигенсвязывающего фрагмента (Fab).

Соответственно, аспекты раскрытия изобретения связаны с соединениями, которые являются специфическими как к ФНО-альфа, так и к ИЛ23А, а также со способами применения и производства таких соединений. Соединения

Аспекты раскрытия изобретения связаны с соединением, специфическим как к ФНО-альфа, так и ИЛ23 А. Типичная белковая последовательность ФНО-альфа и типичная белковая последовательность ИЛ23 А показаны ниже.

```
>NP_000585.2 - ФНО-альфа [Homo sapiens]
MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLSLI
SPLAQAVRSSSRTPSDKPVANVAVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLYSQVLF
KGQGPCSTHVLTLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYLYLGGVVFQLEKGDRLSA
EINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 144)
```

```
>NP_057668.1 - ИЛ23А [Homo sapiens]
MLGSRVAVMLLLLLPWTAQGRAVPGGSSPAWTQCQQLSOKLCTLAWSAHPLVGHMDLREEGDEETNDVPH
IQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRINQGLIFYEKLLGSDIFTGEPSELLPDSVPGQLHASLLGLSQLLQPEGH
HWETQQIPSLSPSQPWRLLLLRFKILRSLQAFVAVARVFAHGAATLSP (аминокислоты 1-19 является
предсказанной сигнальной последовательностью) (SEQ ID NO: 145)
```

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит первый полипептид и второй полипептид. В некоторых вариантах реализации изобретения, первый полипептид содержит (i) переменный домен легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), специфический к первому целевому белку, (ii) переменный домен тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), специфический ко второму целевому белку; и (iii) шарнирную область, константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и константную область 3 тяжелой цепи (CH3). В некоторых вариантах реализации изобретения первый полипептид дополнительно содержит константную область 1 тяжелой цепи (CH1). В некоторых вариантах реализации изобретения второй полипептид содержит: (i) переменный домен легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), специфический ко второму целевому белку; (ii) переменный домен тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), специфический к первому целевому белку. В некоторых вариантах реализации изобретения первый полипептид дополнительно содержит константную область легкой цепи (CL).

Следует понимать, что переменные домены и константные домены/области первого полипептида могут располагаться в любом порядке и что переменные домены и константные домены/области (если таковые имеются) второго полипептида могут располагаться в любом порядке. Несколько иллюстративных конфигураций для доменов/областей на первом и втором полипептиде с N-конца к С-концу показаны ниже.

Конфигурация первого полипептида 1: N-VL1-VH2-якорь-CH2-CH3-C
 Конфигурация первого полипептида 2: N-VH2-VL1-якорь-CH2-CH3-C
 Конфигурация первого полипептида 3: N-VL1-VH2-CH1-якорь-CH2-CH3-C
 Конфигурация первого полипептида 4: N-VH2-VL1-CH1-якорь-CH2-CH3-C
 Конфигурация второго полипептида 1: N-VL2-VH1-C
 Конфигурация второго полипептида 2: N-VH1-VL2-C
 Конфигурация второго полипептида 3: N-VL2-VH1-CL-C
 Конфигурация второго полипептида 4: N-VH1-VL2-CL-C

Приведенные в качестве примера конфигурации соединения показаны на фиг. 1А и 1Б. В некоторых вариантах реализации изобретения, соединение содержит первый полипептид в Конфигурации 1 и второй полипептид в Конфигурации 1. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит первый полипептид в Конфигурации 3 и второй полипептид в Конфигурации 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения переменные области первого полипептида и второго полипептида объединяются друг с другом для того, чтобы сформировать сайт связывания для первого целевого белка и сайт связывания для второго целевого белка. В некоторых вариантах реализации изобретения VL1 первого полипептида и VH1 второго полипептида объединяются, чтобы сформировать сайт связывания, который связывается с первым целевым белком, и VL2 второго полипептида и VH2

первого полипептида объединяются, чтобы сформировать сайт связывания, который связывается со вторым целевым белком. В некоторых вариантах реализации изобретения первый целевой белок представляет собой ФНО-альфа и второй целевой белок представляет собой ИЛ23А. В других вариантах первый целевой белок представляет собой ИЛ23А, а второй целевой белок представляет собой ФНО-альфа. Следует понимать, что под терминами "первый" и "второй" не имеется в виду уровень значимости того или иного белка.

Приведенные в качестве примера комбинации последовательностей каждого из VL1, VH1, VL2 и VH2 предлагаются ниже в табл. 1 и также в табл. 2А в примере 1.

Таблица 1. Приведенные в качестве примера комбинации последовательностей VL1, VH1, VL2 и VH2

Номер комбинации	Последовательность VL1	Последовательность VH1	Последовательность VL2	Последовательность VH2
1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:7
2	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:1
3	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3
4	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO:5
5	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5
6	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:3
7	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:7
8	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:7
9	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:7
10	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:7

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит последовательность VL1, содержащую CDR1, CDR2, и CDR3 первой легкой цепи и последовательность VH1, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 первой тяжелой цепи, последовательность VL2, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 второй легкой цепи и последовательность VH2, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 второй тяжелой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения CDR представляет собой CDR одной или более VL1, VH1, VL2, и VH2 последовательности, которые приведены в табл. 1 или 2А. Типичные последовательности CDR легкой цепи и тяжелой цепи для VL1, VH1, VL2 и VH2 последовательностей, которые предлагаются в табл. 1, показаны ниже:

SEQ ID NO: 1 CDR: DYAMH (SEQ ID NO: 146) (CDR1), AITWNSGHIDYADSVEG (SEQ ID NO: 147) (CDR2), VSYLSTASSLDY (SEQ ID NO: 148) (CDR3)

SEQ ID NO: 2 CDR: RASQGIRNYLA (SEQ ID NO: 149) (CDR1), AASTLQS (SEQ ID NO: 150) (CDR2), QRYNRAPYT (SEQ ID NO: 151) (CDR3)

SEQ ID NO: 3 i SEQ ID NO: 5 CDR: SYAMH (SEQ ID NO: 152) (CDR1), FMSYDGSNKKYADSVKG (SEQ ID NO: 153) (CDR2), NYYYYGMDV (SEQ ID NO: 154) (CDR3)

SEQ ID NO: 4 i SEQ ID NO: 6 CDR: RASQSVYSYLA (SEQ ID NO: 155) (CDR1), DASNRAT (SEQ ID NO: 156) (CDR2), QQRSNWPPFT (SEQ ID NO: 157) (CDR3)

SEQ ID NO: 7 CDR: DQTIH (SEQ ID NO: 158) (CDR1), YIYPRDDSPKYNENFKG (SEQ ID NO: 159) (CDR2), PDRSGYAWFIY (SEQ ID NO: 160) (CDR3)

SEQ ID NO: 8 CDR: KASRDVAIAVA (SEQ ID NO: 161) (CDR1), WASTRHT (SEQ ID NO: 162) (CDR2), HQYSSYPFT (SEQ ID NO: 163) (CDR3)

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит VH1, VL1, VH2 и/или VL2, содержащие последовательность, которая по меньшей мере на 80% (например, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична последовательности, описанной в табл. 1. "Процент идентичности" двух аминокислотных последовательностей определяется с применением алгоритма Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-68, 1990, измененном как в Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990. BLAST белковые поиски могут быть выполнены с помощью программы XBLAST, оценка=50, длина слова=3, для того, чтобы получить аминокислотные последовательности, гомологичные белковым молекулами интереса. Если между двумя последовательностями имеются пробелы, может быть применен Gapped BLAST как описано в Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST, могут быть применены параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

В некоторых вариантах реализации изобретения, соединение содержит VH1, VL1, VH2 и/или VL2, содержащие последовательность, которая содержит одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) мутаций в последовательности, приведенной в табл. 1. Такие мутации могут быть консервативными аминокислотными заменами. Как используется в настоящем документе, "консервативная аминокислотная замена" относится к аминокислотной замене, не изменяющей относительный заряд или ха-

рактеристики размера белка, в котором делают аминокислотную замену. Консервативные замены аминокислот включают, например, замены между аминокислотами среди следующих групп: а) М, I, L, V; б) F, Y, W; в) K, R, H; г) A, G; д) S, T; е) Q, N и ё) E, D.

Аминокислотные последовательности шарнирной области, CH2 и CH3 соединения (и в качестве варианта CH1 и CL, если соединение содержит такие области) могут быть получены из любого подходящего источника, например, константной области антитела, такого как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Аминокислотные последовательности константных областей легкой и тяжелой цепей антитела хорошо известны в данной области техники, например, такие последовательности предлагаются в базе данных IMGT (www.imgt.org) или www.vbase2.org/vbstat.php, обе включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения, аминокислотные последовательности CH2 и CH3 получены из IgG1 или из IgG4 (например, SEQ ID NO: 39 или 37). В некоторых вариантах реализации изобретения, CL содержит аминокислотную последовательность каппа CL или лямбда CL. В некоторых вариантах реализации изобретения, шарнирная область содержит аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 40); <http://www.imgt.org/http://www.vbase2.org/vbstat.php>

В некоторых вариантах реализации изобретения, CH2 и/или CH3 соединения (и в качестве варианта CH1 и CL, если соединение содержит такие области) могут содержать одну или более аминокислотных замен, отличающихся от CH2 или CH3 дикого типа, например, одну или более аминокислотных замен в CH2 или CH3 IgG1 дикого типа, или одну или более аминокислотных замен в CH2 или CH3 IgG4 дикого типа (SEQ ID NO: 39 предлагается в качестве примера IgG1 дикого типа). Такие замены известны в данной области техники (см., например, US 7704497, US 7083784, US 6821505, US 8323962, US 6737056 и US 7416727).

В некоторых вариантах реализации изобретения CH2 содержит аминокислотную замену в 234, 235, 252, 254 и/или 256, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat для обычного антитела (Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Следует понимать, что все аминокислотные позиции, описанные в данном документе, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat для обычных антител. В некоторых вариантах реализации изобретения CH2 содержит аминокислотную замену в позиции 252, 254 и/или 256. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота в позиции 252 - это тирозин, фенилаланин, серин, триптофан, или треонин. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота в позиции 254 - это треонин. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота в позиции 254 - это серин, аргинин, глутамин, глутаминовая кислота или аспарагиновая кислота. В некоторых вариантах реализации изобретения CH2 содержит тирозин в позиции 252, треонин в позиции 254 и глутаминовую кислоту в позиции 256 (далее упоминается в настоящем документе как мутант YTE). В некоторых вариантах реализации изобретения, CH2 содержит аминокислотную замену в позиции 234 и/или 235. В некоторых вариантах реализации изобретения CH2 содержит аланин в позиции 234 и аланин в позиции 235, также дальше упоминается в настоящем документе как мутант KO. В некоторых вариантах реализации изобретения, CH2 содержит тирозин в позиции 252, треонин в позиции 254, глутаминовую кислоту в позиции 256, аланин в позиции 234 и аланин в позиции 235, также дальше упоминается в настоящем документе как мутант KO-YTE.

В некоторых вариантах реализации изобретения один или более линкер может быть применен для того, чтобы соединить домены/области вместе на первом и/или втором полипептиде. Например, первый полипептид может содержать линкер между VL1 и VH2. Если первый полипептид содержит CH1, первый полипептид может содержать линкер между VL1 или VH2 (в зависимости от конфигурации, как обсуждалось выше) и CH1 (например, VL1-линкер-CH1 или VH2-линкер-CH1). В другом примере второй полипептид может содержать линкер между VL2 и VH1. Если второй полипептид содержит CL, второй полипептид может дополнительно содержать линкер между VL2 или VH1 (в зависимости от конфигурации, которая обсуждалась выше) и CL (например, VL2-линкер-CL или VH1-линкер-CL). Следует понимать, что любое количество линкеров может быть применено для соединения любого домена или области с любым другим доменом или областью на первом полипептиде, и/или любое количество линкеров может быть применено для соединения любого домена или области с любым другим доменом или областью на втором полипептиде.

Предусмотрено применение любого подходящего линкера, известного в данной области техники, в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения, линкер является пептидным линкером. В некоторых вариантах реализации изобретения пептидный линкер содержит по меньшей мере две аминокислоты, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения пептидный линкер имеет не более 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислоты в длину. В некоторых вариантах реализации изобретения пептидный линкер имеет длину в пределах 2 и 50, 2 и 40, 2 и 30, 2 и 20, 2 и 10, 2 и 9, 2 и 8, 2 и 7 или 2 и 6 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность GGGSGGG (SEQ ID NO: 9), LGGSGG (SEQ ID NO: 10), FNRGES (SEQ ID NO: 11), VEPKSS (SEQ ID NO: 12) или их комбинацию. В некоторых вариантах реализации изобретения пептидный линкер может содержать несколько копий линкерной последовательности, например не-

сколько копий последовательности GGGSGGG (SEQ ID NO: 9), LGGGSG (SEQ ID NO: 10), FNRGES (SEQ ID NO: 11), VEPKSS (SEQ ID NO: 12) или их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение содержит два первых полипептида и два вторых полипептида. В некоторых вариантах реализации изобретения СН2 и СН3 одного из первых полипептидов объединяются с СН2 и СН3 другого из первых полипептидов, образуя четырехвалентную молекулу (например, два первых полипептиды димеризуются через связи между их соответствующими СН2 и СН3 доменами, чтобы сформировать четырехвалентную молекулу, содержащую два сайта связывания, специфические к первому целевому белку, и два сайта связывания, специфические ко второму целевому белку). Если первый полипептид дополнительно содержит СН1 домен, СН1 домен также может участвовать в образовании тетравалентной молекулы (например, два первых полипептида димеризуются через связи между их соответствующими СН1, СН2 и СН3 доменами, чтобы сформировать тетравалентную молекулу, которая содержит два сайта связывания для первого целевого белка, и два сайта связывания для второго целевого белка). В некоторых вариантах реализации изобретения первые два полипептида объединены вместе с помощью по меньшей мере одной дисульфидной связи.

Также в этом документе предусмотрены другие соединения, которые конкурируют за связывание с соединением, как описано в данном документе, например, исследуемое соединение, которое конкурирует с соединением, как описано в данном документе, за связывание с ФНО-альфа и ИЛ23А. В некоторых вариантах реализации изобретения исследуемое соединение может иметь по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с соединением, как описано в данном документе. Конкурентное связывание может быть определено с помощью любого анализа, известного в данной области техники, например равновесного связывания, ELISA, поверхностного плазмонного резонанса или спектроскопии.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение, описанное в данном документе, специфически связывается с обеими ФНО-альфа и ИЛ23А. Соединение, которое "специфически связывается" с антигеном или эпитопом, обозначает термин, хорошо известный в данной области техники, и способы определения такого специфического связывания также хорошо известны в данной области техники. Говорят, что молекула показывает "специфическое связывание", если она реагирует или связывается чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с особым целевым антигеном, чем с альтернативными целями. Соединение "специфически связывается" с целевым антигеном или эпитопом, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, более быстро, и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими веществами. Например, соединение, которое специфически (или селективно) связывается с антигеном (например, ФНО-альфа или ИЛ23А) или антигенным эпитопом в этом антигене, представляет собой вещество, которое связывается с этим целевым антигеном с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими антигенами или другими эпитопами в этом же антигене. Читая это определение, следует также понимать, что, например, соединение, которое специфически связывается с первым целевым антигеном, может, или не может специфически или селективно связываться со вторым целевым антигеном. Таким образом, "специфическое связывание" или "избирательное связывание" не обязательно требует (хотя может включать) исключительное связывание. В целом, как правило, но не обязательно, отсылка к связыванию означает селективное связывание. В некоторых примерах соединение, которое "специфически связывается" с целевым антигеном, или эпитопом этого антигена, может не связываться с другими антигенами или другими эпитопами в том же антигене.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение, как описано в данном документе, имеет соответствующее сродство к ФНО-альфа и ИЛ23, или их антигенным эпитопам. Как применяется в настоящем документе, "аффинность связывания" относится к условной константе связывания или K_A . K_A - это величина обратная константе диссоциации (K_D). Соединения, которые описаны в данном документе, могут иметь аффинность связывания (K_D) по меньшей мере 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 11^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} М или меньше для одного, или обоих целевых антигенов или антигенных эпитопов. Повышенная аффинность связывания соответствует меньшему K_D . В некоторых вариантах реализации изобретения, соединения, которые описаны в данном документе имеют аффинность связывания (K_D) по меньшей мере 10^{-11} М или меньше, для одного или обоих целевых антигенов или антигенных эпитопов. Высокая аффинность связывания соединения для первого антигена и второго антигена по отношению к третьему антигену может быть обозначена с помощью более высокой K_A (или меньшего числового значения K_D) для связывания первого и второго антигена, чем K_A (или числового значения K_D) для связывания третьего антигена. В таких случаях, соединение имеет специфичность к первому антигену и второму антигену (например, первому белку в первой конформации или ему подобному, и второму белку в первой конформации или ему подобному) по отношению к третьему антигену (например, тот же первый или второй белок во второй конформации или ему подобный, или третий белок). Отличие в аффинности связывания (например, по специфичности или другими показателями) может составлять по меньшей мере 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37,5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 10000 или 10^5 раз.

Аффинность связывания (или специфичность связывания) может быть определена различными способами, в том числе, равновесным связыванием, ELISA, поверхностным плазмонным резонансом, или

спектроскопией (например, применяя флуоресцентный анализ). Типичными условиями для оценки аффинности связывания является HBS-P буфер (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005% (v/v) Surfactant P20). Данные методы могут быть применены для измерения концентрации связанного связывающего белка как функции концентрации целевого белка. Концентрация связанного связывающего белка, ([Bound]) зависит от концентрации свободного целевого белка ([Free]) и концентрации сайтов связывания для связывающего белка на цели, где (N) - число сайтов связывания на одну целевую молекулу, описывается следующим уравнением:

$$[\text{Bound}] = \frac{N[\text{Free}]}{K_D + [\text{Free}]}$$

Не всегда необходимо точно определять K_A , однако, так как иногда достаточно получить количественную оценку аффинности, например, рассчитанную с помощью такого способа, как ИФА или FACS (сортировка клеток с активированной флуоресценцией) анализа, которая пропорциональна K_A , и, следовательно, может быть применена для сравнений, таких как: определение, является ли аффинность выше, например, в 2 раза выше, для получения качественной оценки аффинности, или для того, чтобы предсказать аффинность, например, по активности в функциональном анализе, например, в анализах *in vitro* или *in vivo*.

В некоторых вариантах реализации изобретения, соединение содержит первый и второй полипептид, как определено в табл. 2A. В некоторых вариантах реализации изобретения, соединение содержит:

- (i) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
- (ii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;
- (iii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;
- (iv) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;
- (v) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;
- (vi) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;
- (vii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;
- (viii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;
- (ix) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;
- (x) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;
- (xi) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;
- (xii) первый, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;
- (xiii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45;
- (xiv) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;
- (xv) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49;
- (xvi) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51;
- (xvii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53;
- (xviii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;
- (xix) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57;
- (xx) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59;
- (xxi) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;
- (xxii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63;
- (xxiii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и

рой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127;

(Iv) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129;

(Ivi) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131;

(Ivii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133;

(Iviii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135;

(Iix) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137;

(Ix) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139;

(Ixii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141; или

(Ixii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143.

В некоторых вариантах реализации изобретения, соединение содержит:

(i) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

(ii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;

(iii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;

(iv) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

(v) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

(vi) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;

(vii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;

(viii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;

(ix) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;

(x) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;

(xi) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; или

(xii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

Способы получения соединений, нуклеиновых кислот, векторов и клеток

Аспекты раскрытия изобретения также включают нуклеиновые кислоты, кодирующие соединения, описанные в данном документе, или полипептиды, которые описаны в данном документе (например, первый или второй полипептид, которые описаны в данном документе), которые могут быть закодированы вместе или по отдельности. Полинуклеотиды, кодирующие соединения, описанные в данном документе, или полипептиды, описанные в данном документе, могут быть получены, а нуклеотидные последовательности полинуклеотидов определены любым способом, известным в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота содержится в векторе, таком как вектор экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор содержит промотор, который функционально соединен с нуклеиновой кислотой.

Могут быть применены различные промоторы для экспрессии соединений, описанных в данном документе, или полипептидов, которые описаны в данном документе, которые включают, но не ограничиваются только этими, ранний промежуточный промотор цитомегаловируса (ЦМВ), LTR, такая как LTR, HIV-LTR, HTLV-1 LTR вируса саркомы Рауса, ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), лак промотор UV5 E. coli и промотор tk вируса простого герпеса.

Также могут быть использованы регулируемые промоторы. Такие регулируемые промоторы включают те, которые используют lac репрессор с E.coli как модулятор транскрипции для регулирования транскрипции с промоторов клеток млекопитающих, которые несут lac оператор [Brown M. et al., Cell, 49: 603-612 (1987)], и те, которые используют тетрациклиновый репрессор (tetR) [Gossen, M., and Bujard, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992); Yao F. et al., Human Gene Therapy, 9: 1939-1950 (1998);

Shockelt, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6522-6526 (1995)]. Другие системы включают димер FK506, VP 16 или р65 с применением астрадиола, RU486, дифенол мурислерона или рапамицина. Индуцибельные системы можно получить в Invitrogen, Clontech и Ariad.

Могут быть использованы регулируемые промоторы, которые содержат репрессор с опероном. В одном варианте реализации изобретения лак-репрессор с *Escherichia coli* может функционировать как транскрипционный модулятор для того, чтобы регулировать транскрипцию через промоторы клеток млекопитающих, которые несут lac оператор [M. Brown et al., Cell, 49: 603-612 (1987)]; Госсен и Буджарт (1992) [M. Gossen et al., Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551 (1992)] объединили тетрациклиновый репрессор (tetR) с транскрипционным активатором (VP 16) для того, чтобы создать гибридный белок tetR-активатор транскрипции клетки млекопитающего, tTa (tetR-VP 16), с tetO-несущим минимальным промотором, полученным из главного промежуточного-раннего промотора человеческого цитомегаловируса (hCMV) для того, чтобы создать a tetR-tet операторную систему для контроля генной экспрессии в клетках млекопитающих. В одном варианте реализации изобретения, применяется индуцибельный тетрациклиновый переключатель (Yao et al., Human Gene Therapy; Gossen et al., Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551 (1992); Shockett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6522-6526 (1995)).

Дополнительно вектор может содержать, например, некоторые или все из следующих: селективный маркерный ген, такой как ген неомицина, для селекции стабильных или временных трансфектантов в клетках млекопитающих; энхансерные/промоторные последовательности с немедленного раннего гена ЦМВ человека для высоких уровней транскрипции; сигналы терминации транскрипции и процессинга РНК с SV40 для стабильности мРНК; точки начала репликации SV40 и ColE1 для правильной эпизомальной репликации; внутренние сайты связывания рибосомы (ВССР), полилинкер и РНК промоторы T7 и SP6 для *in vitro* транскрипции смысловой и антисмысловой РНК. Подходящие векторы и способы продуцирования векторов, содержащих трансгены, хорошо известны и доступны в данной области техники.

Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, может быть перенесен в клетку-хозяина с помощью обычных методов (например, электропорации, липосомной трансфекции и преципитации с фосфатом кальция), и трансфицированные клетки затем культивируют с помощью общепринятых методов получения соединений, которые описаны в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения экспрессия соединений, описанных в данном документе, регулируется с помощью конститутивных, индуцибельных или ткань-специфических промоторов.

Клетки-хозяева, применяемые для экспрессии соединений, описанных в данном документе, или полипептидов, описанных в данном документе, могут быть как бактериальными клетками, так и клетками *Escherichia coli* или желателно эукариотическими клетками. В частности, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как основной промоторный элемент промежуточного раннего гена из человеческого цитомегаловируса, является эффективной системой экспрессии для иммуноглобулинов (Foecking et al. (1986) "Powerful And Versatile Enhancer-Promoter Unit For Mammalian Expression Vectors," Gene 45: 101-106; Cockett et al. (1990) "High Level Expression Of Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases In Chinese Hamster Ovary Cells Using Glutamine Synthetase Gene Amplification," Biotechnology 8:662-667).

Для экспрессии соединений, описанных в данном документе, или полипептидов, описанных в данном документе, может быть применено множество хозяин-экспрессирующих векторных систем. Такие хозяин-экспрессирующие системы представляют собой переносчики, с помощью которых кодирующие последовательности соединений, описанные в данном документе, или полипептиды, описанные в данном документе, могут быть продуцированы и впоследствии очищены, но также представляют собой клетки, которые могут, когда трансформированы или трансфицированы с помощью соответствующих кодирующих нуклеотидных последовательностей, экспрессировать соединения, описанные в данном документе, *in situ*. Они включают, но не ограничиваются только этими, микроорганизмы, такие как бактерии, (например, *E. coli* и *B. subtilis*) трансформированные рекомбинантными бактериофаговыми ДНК, плазмидными ДНК или космидными ДНК векторами экспрессии, содержащие кодирующие последовательности соединений, описанные в данном документе; дрожжи (например, *Saccharomyces pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, содержащими последовательности, кодирующие соединения, описанные в данном документе; клеточные системы насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, baculovirus), содержащими последовательности, кодирующие соединения, описанные в данном документе; клеточные системы растений, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты (CaMV) и вирусом табачной мозаики (TMV)) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, Те плазмиды), содержащими последовательности, кодирующие молекулы соединений, описанные в данном документе; или клеточные системы млекопитающих (например, COS, CHO, ВНК, 293, 293T, 3T3 клетки, лимфоцитарные клетки (см. патент США № 5807715), клетки Per C.6 (человеческие клетки сетчатки, разработанные Crucell), несущие рекомбинантные конструкции экспрессии, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотора металоглионеина) или вирусов млекопитающих (например, поздний аденовирусный промотор; промотор 7,5 вируса осповакцины).

В бактериальных системах может быть с большим преимуществом отобран ряд векторов экспрессии, в зависимости от применения, предназначенных для соединения, которое экспрессируется. Например, когда должно быть произведено большое количество такого белка, для получения фармацевтических композиций соединений, описанных в данном документе, могут быть желательными векторы, управляющие экспрессией высоких уровней легко очищаемых гибридных белковых продуктов. Такие векторы включают, но не ограничиваются только этими, вектор экспрессии pUR278 *E. coli* (Ruther et al. (1983) "Easy Identification Of cDNA Clones," *EMBO J.* 2: 1791-1794), в котором кодирующая последовательность может быть лигирована отдельно в вектор в рамке с *lac Z* кодирующей областью, таким образом, что продуцируется гибридный белок; векторы pIN (Inouye et al. (1985) "Up-Promoter Mutations In The *lpp* Gene Of *Escherichia Coli*," *Nucleic Acids Res.* 13: 3101-3110; Van Heeke et al. (1989) "Expression Of Human Asparagine Synthetase In *Escherichia Coli*," *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509) и тому подобное. Могут также быть применены векторы pGEX для того, чтобы экспрессировать полипептиды как гибридные белки с глутатион S-трансферазой (GST). В общем, такие гибридные белки являются растворимыми и могут быть легко очищены с лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матриксными глутатион-агарозными шариками, с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX предназначены для включения тромбиновых или Ха протеазных сайтов расщепления, таким образом, клонированный целевой генный продукт может быть освобожден от GST-части.

В системах насекомых вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV) применяется в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус размножается в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующая последовательность может быть клонирована отдельно в неважные области (например, ген полиедрина) вируса, и размещена под контролем промотора AcNPV (например, промотором полиедрина).

В клетках-хозяевах млекопитающих может быть применен ряд систем экспрессии на основе вирусов. В тех случаях, когда аденовирус применяется как вектор экспрессии, кодирующая последовательность интереса может быть лигирована с комплексом контроля транскрипции/трансляции, например, поздним промотором и трехсторонней лидерной последовательностью. Этот химерный ген может быть вставлен в геном аденовируса с помощью *in vitro* или *in vivo* рекомбинации. Вставка в неважную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приведет к образованию рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным, и способен экспрессировать молекулу иммуноглобулина в инфицированных хозяевах (см., например, Logan et al. (1984) "Adenovirus Tripartite Leader Sequence Enhances Translation Of mRNAs Late After Infection," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3655-3659). Также могут потребоваться специфические сигналы инициации, для эффективной трансляции встроенных последовательностей, кодирующих антитело(а). Эти сигналы включают ATG иницирующий кодон и смежные последовательности. Кроме этого, кодон инициации должен быть в фазе с рамкой считывания желаемой кодирующей последовательности для того, чтобы обеспечить трансляцию всей вставки. Эти экзогенные сигналы контроля трансляции и кодоны инициации могут быть различного происхождения, как природного, так и синтетического. Эффективность экспрессии может быть увеличена путем включения соответствующих элементов транскрипции, энхансерных элементов, терминаторов транскрипции и т.д. (см. Bitter et al. (1987) "Expression And Secretion Vectors For Yeast," *Methods in Enzymol.* 153: 516-544).

Кроме этого, может быть избран штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и обрабатывает генный продукт желаемым специфическим образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и обработка (например, расщепление) белковых продуктов, могут быть важны для функции белка. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения, соединения, которые описаны в данном документе, могут быть экспрессированные как один генный продукт (например, как единственная полипептидная цепь, то есть, как полибелковый прекурсор), который требует протеолитического расщепления с помощью нативных или рекомбинантных клеточных механизмов для того, чтобы образовать отдельные полипептиды соединений, описанных в данном документе. Таким образом, раскрытие изобретения охватывает проектирование нуклеотидной последовательности для кодирования прекурсорной полибелковой молекулы, содержащей полипептиды соединений, описанных в данном документе, содержащая кодирующие последовательности, способные направлять посттрансляционное расщепления указанного полибелкового прекурсора. Посттрансляционное расщепления полибелкового прекурсора приводит к образованию полипептидов соединений, описанных в данном документе. Посттрансляционное расщепления молекулы прекурсора, содержащей полипептиды соединений, описанных в данном документе, может происходить *in vivo* (то есть внутри клетки-хозяина с помощью нативных или рекомбинантных клеточных систем/механизмов, например фуринового расщепления в соответствующем сайте) или может происходить *in vitro* (например, инкубация указанной полипептидной цепи в композиции, содержащей протеазы или пептидазы с известной активностью, и/или в композиции, содержащей условия или реагенты, известные тем, что способствуют желаемой протеолитической активности). Очистка и модификация рекомбинантных белков хорошо известны в данной области техники, и таким образом дизайн полибелкового прекурсора может включать в себя ряд вариантов реализации изобретения, которые легко могут быть распознаны квалифицированным специалистом. Любые известные протеазы или пептидазы, которые известны в данной области тех-

ники, могут быть применены для описанной модификации молекулы прекурсора, например, тромбин или фактор Ха (Nagai et al. (1985) "Oxygen Binding Properties Of Human Mutant Hemoglobins Synthesized In Escherichia Coli," Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82: 7252-7255, и их обзор выполнен в Jenny et al. (2003) "A Critical Review Of The Methods For Cleavage Of Fusion Proteins With Thrombin And Factor Xa," Protein Expr. Purif. 31: 1-11, каждый из которых включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки)), энтерокиназы (Collins-Racie et al. (1995) "Production Of Recombinant Bovine Enterokinase Catalytic Subunit In Escherichia Coli Using The Novel Secretory Fusion Partner DsbA," Biotechnology 13: 982-987 этим включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки)), фурин, и AcTEV (Parks et al. (1994) "Release Of Proteins And Peptides From Fusion Proteins Using A Recombinant Plant Virus Proteinase," Anal. Biochem. 216: 413-417 этим включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки)) и протеаза С3 ящура.

Клетки-хозяева имеют характерные и специфические механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Могут быть выбраны соответствующие клеточные линии или хозяйские системы для обеспечения правильной модификации и процессинга чужеродного экспрессирующегося белка. С этой целью могут быть применены эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточной инженерией для правильного процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются только этими CHO, VERY, ВНК, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, CRL7030 и Hs578Bst.

Стабильная экспрессия является желанной для долгосрочного, плодотворного продуцирования рекомбинантных белков. Например, могут быть разработаны клеточные линии, стабильно экспрессирующие соединения, описанные в данном документе. Вместо того, чтобы применять векторы экспрессии, содержащие вирусные точки начала репликации, клетки-хозяева могут быть трансформированы ДНК, что контролируется соответствующими контролирующими элементами экспрессии (например, промотор, энхансерные последовательности, терминаторы транскрипции, сайты полиаденилирования и т.д.), и маркером селекции. После введения чужеродной ДНК спроектированным клеткам, могут позволить расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде, а затем их переносят на селективную среду. Маркер селекции в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к веществу, с помощью которого проводят отбор, и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в их хромосомы и расти, образуя очаги, которые, в свою очередь, могут быть клонированы и расширены в клеточные линии. Данный способ может быть с преимуществом использован для разработки клеточных линий, экспрессирующих соединения, описанные в данном документе. Такие сконструированные клеточные линии могут быть особенно полезными для скрининга и оценки соединений, взаимодействующих непосредственно или косвенно с соединениями, которые описаны в данном документе.

Может быть применен ряд систем отбора, включая, но не ограничиваясь только этими: ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al. (1977) "Transfer Of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene To Cultured Mouse Cells," Cell 11: 223-232), ген гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (Szybalska et al. (1992) "Use Of The HPRT Gene And The HAT Selection Technique In DNA-Mediated Transformation Of Mammalian Cells First Steps Toward Developing Hybridoma Techniques And Gene Therapy," Bioessays 14: 495-500), и ген аденин фосфорибозилтрансферазы (Lowy et al. (1980) "Isolation Of Transforming DNA: Cloning The Hamster aprt Gene," Cell 22: 817-823) могут быть применены в tk-, hgprt- или aprt- клетках, соответственно. Кроме того, антиметаболитная устойчивость может быть использована в качестве основы отбора для следующих генов: dhfr, придающий устойчивость к метотрексату (Wigler et al. (1980) "Transformation Of Mammalian Cells With An Amplifiable Dominant-Acting Gene," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567-3570; O'Hare et al. (1981) "Transformation Of 5 Mouse Fibroblasts To Methotrexate Resistance By A Recombinant Plasmid Expressing A Prokaryotic Dihydrofolate Reductase," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527-1531); gpt, придающий устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan et al. (1981) "Selection For Animal Cells That Express The Escherichia coli Gene Coding For Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072-2076); neo, придающий устойчивость к аминогликозиду G-418 (Tolstoshev (1993) "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions," Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan (1993), "The Basic Science Of Gene Therapy," Science 260: 926-932; и Morgan et al. (1993), "Human Gene Therapy," Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217) и hygro, придающий устойчивость к гигромицину (Santerre et al. (1984) "Expression Of Prokaryotic Genes For Hygromycin B And G418 Resistance As Dominant-Selection Markers In Mouse L Cells," Gene 30: 147-156). Способы, широко известные в данной области рекомбинантной ДНК технологии, и которые могут быть применены, описаны в Ausubel et al. (Eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Krieglner, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; and in Chapters 12 and 13 Dracopoli et al. (Eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin et al. (1981) "A New Dominant Hybrid Selective Marker for Higher Eukaryotic Cells," J. Mol. Biol. 150: 1-14.

Уровни экспрессии соединений, описанных в данном документе, или полипептидов, описанных в данном документе, могут быть увеличены с помощью вектора амплификации (для ознакомления см. Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in

mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987). Когда маркер в векторной системе, экспрессирующей соединение, описанное в данном документе, может быть амплифицирован, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина позволит увеличить количество копий маркерного гена. Поскольку область амплификации связана с нуклеотидной последовательностью соединения, описанного в данном документе, или полипептида, описанного в данном документе, производство полипептида также возрастет (Crouse et al. (1983) "Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes," Mol. Cell. Biol. 3: 257-266).

Клетка-хозяин может быть трансфицирована двумя векторами экспрессии, первым вектором, кодирующим первый полипептид соединения, которое описано в данном документе, и вторым вектором, кодирующим второй полипептид соединения, которое описано в данном документе. Два вектора могут содержать идентичные маркеры селекции, делающие возможным одинаковую экспрессию обоих полипептидов. В альтернативном варианте, может быть применен единственный вектор, кодирующий оба полипептиды. Кодирование последовательности полипептидов соединений, описанных в данном документе, могут содержать к ДНК или геномную ДНК.

Как только соединение, описанное в данном документе, или полипептид, описанный в данном документе, была (был) рекомбинантно экспрессирован(о), он(оно) может быть очищен(о) любым способом, известным в данной области техники для очистки полипептидов, полибелков или антител (например, аналогичный схемам очистки антител, основанные на антигенной селективности), например, хроматографией (например, ионообменной, аффинной, особенно аффинной к специфическому антигену (при необходимости после отбора при помощи белка А, где соединение содержит Fc домен (или его часть)), и эксклюзионной хроматографией), центрифугированием, дифференциальной растворимостью, или любым другим стандартным методом для очистки полипептидов или антител.

Другие аспекты изобретения связаны с клеткой, содержащей нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе, или вектор, описанный в данном документе. Клетка может быть прокариотической или эукариотической клеткой. В некоторых вариантах реализации изобретения, клетка является клеткой млекопитающего. Приведенные в качестве примера типы клеток описаны в данном документе.

Еще другие аспекты изобретения связаны со способом продуцирования соединения, описанного в данном документе, или полипептида, описанного в данном документе (например, первого полипептида или второго полипептида), способом, включающим получение клеток, описанных в данном документе, и экспрессию нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, в указанной клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения, способ дополнительно включает выделение и очистку соединения, описанного в данном документе, или полипептида, описанного в данном документе.

Способы лечения и композиций для применения в медицине

Другие аспекты изобретения связаны со способами лечения и композициями для применения в медицине. Не ограничивающими примерами соединений для применения в способах, и композиции являются теми, что содержат:

- (i) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
- (ii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;
- (iii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;
- (iv) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;
- (v) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;
- (vi) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;
- (vii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;
- (viii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;
- (ix) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;
- (x) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;
- (xi) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; или
- (xii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ лечения или применение является способом лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, или применением в таком способе. В некото-

рых вариантах реализации изобретения способ включает введение соединения, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей указанное соединение, субъекту, например субъекту, который имеет или находится под риском приобрести аутоиммунное или воспалительное заболевание.

Субъект, подвергающийся лечению с помощью методов, описанных в данном документе, может быть млекопитающим, более желательно человеком. Млекопитающие включают, но не ограничены только этими, сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних животных, приматов, лошадей, собак, кошек, мышей и крыс. Человеческий субъект, требующий лечения, может быть человеческим субъектом, имеющим или находящимся под риском приобрести заболевание, или у него подозревают наличие заболевания. Субъект, имеющий заболевание, может быть обнаружен с помощью обычного медицинского осмотра, например физического обследования, лабораторного тестирования, функциональной проверки органа, КТ сканирование или УЗИ. Субъект, который подозревается в наличии любого такого заболевания, может демонстрировать один или несколько симптомов заболевания. Признаки и симптомы заболеваний, например аутоиммунных и воспалительных заболеваний, хорошо известны специалистам в данной области техники. Субъект с риском приобретения заболевания может быть субъектом, имеющим один или более факторов риска данного заболевания.

Не ограничивающие примеры аутоиммунных заболеваний включают ревматоидный артрит, псориаз, сахарный диабет 1 типа, системную красную волчанку, отторжение трансплантата, аутоиммунные заболевания щитовидной железы (болезнь Хашимото), саркоидоз, склеродермию, гранулематозный васкулит, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, болезнь Шегрена, анкилозирующий спондилит, псориатический артрит, полимиозит дерматомиозит, узелковый периартериит, иммунологически опосредованное пузырчатое заболевание кожи, синдром Бехчета, рассеянный склероз, системную склеродермию, болезнь Гудпасчера, или иммунологически опосредованный гломерулонефрит.

Не ограничивающие примеры воспалительных заболеваний включают ревматоидный артрит, системную красную волчанку, очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (АЛПС), аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру (АТП), болезнь Бехчета, буллезный пемфигид, кардиомиопатию, брюшной спрудерматит, синдром хронической усталости, иммунодефицит (CFIDS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, рубцовый пемфигус, холодовую лектиновую болезнь, синдром Тибьержа-Вейсенбаха, болезнь Крона, болезнь Дего, дерматомиозит, ювенильный дерматомиозит, дискоидную волчанку, существенную смешанную криоглобулинемию, фибромиалго-фибромиозит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, идиопатический легочный фиброз, болезнь Верльгофа (ИТП), IgA нефропатию, инсулинозависимый сахарный диабет (тип I), ювенильный артрит, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз, миастению, пузырчатку обычную, пернициозную анемию, узелковый периартериит, полихондрит, плюригландулярные синдромы, ревматическую полимиалгию, полимиозит и дерматомиозит, первичный иммунодефицит, первичный билиарный цирроз печени, псориаз, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматическую лихорадку, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, синдром мышечной скованности, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, неспецифический язвенный колит, увеит, васкулит, витилиго, и гранулематоз Вегенера. В некоторых вариантах реализации изобретения аутоиммунное или воспалительное заболевание является болезнью Крона, анкилозирующим спондилитом или псориатическим артритом.

Чтобы практиковать способ, описанный в данном документе, эффективное количество соединения или фармацевтической композиции, что описаны в данном документе, может быть введено субъекту (например, человеку), что требует лечения. Известны различные системы доставки, и они могут быть применены для введения соединений по данному изобретению. Способы введения включают, но не ограничиваются только этими, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и оральный пути. Соединения по данному изобретению могут быть введены, например, путем инфузии, болюса или инъекции, и могут вводиться вместе с другими биологически активными веществами, такими как противовоспалительные вещества. Введение может быть системным или местным. В желаемых вариантах реализации изобретения введение выполняют подкожной инъекцией. Лекарственное средство для подобных инъекций может быть приготовлено в, например, предварительно заполненных шприцах, которые можно вводить один раз каждые две недели.

"Эффективное количество", как применяется в данном документе, относится к количеству каждого соединения, которое необходимо, чтобы предоставить терапевтический эффект субъекту, либо самостоятельно, либо в комбинации с одним или более другими соединениями. Эффективные количества могут быть разными, как определено специалистами в данной области техники, в зависимости от конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, индивидуальных параметров субъекта, включая возраст, физическое состояние, размер, пол, вес, продолжительность лечения, характер сопутствующей терапии (если таковая имеется), конкретный путь введения и подобные факторы, которые находятся в пределе знаний и опыта врача. Эти факторы являются хорошо известными специалистам в данной облас-

ти техники и могут быть обнаружены с помощью не более чем рутинных экспериментов. Желательно, в целом, как правило, чтобы применялась максимальная доза отдельных компонентов или их комбинаций, то есть самая высокая безопасная доза с медицинской точки зрения. Специалистам в данной области техники будет понятно, что субъект может настаивать на более низкой дозе или допустимой дозе по медицинским причинам, психологических причинам или по любым другим причинам. Эмпирические факторы, такие как период полувыведения, как правило, будут способствовать определению дозировки. Например, соединения, совместимые с иммунной системой человека, такие как соединения, содержащие области с гуманизованными антителами или полностью человеческими антителами, могут быть применены, чтобы продлить период полувыведения соединения и предотвратить, чтобы соединение было атаковано иммунной системой хозяина. Частота введения может быть определена и скорректирована в ходе лечения, обычно, но не обязательно основанная на лечении и/или, угнетении, и/или улучшении, и/или замедлении заболевания. В альтернативном варианте могут быть целесообразными лекарственные препараты с непрерывным замедленным высвобождением соединения. В данной области техники известны различные лекарственные формы и устройства для достижения замедленного высвобождения.

В некоторых вариантах реализации изобретения дозировка происходит ежедневно, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, или каждые шесть дней. В некоторых вариантах реализации изобретения, частота дозирования составляет раз в неделю, каждые 2 недели, каждые 4 недели, каждые 5 недель, каждые 6 недель, каждые 7 недель, каждые 8 недель, каждые 9 недель, или 10 недель, или раз в месяц, каждые 2 месяца, или каждые 3 месяца или дольше. Прогресс данной терапии можно легко контролировать с помощью обычных методов и анализов. Режим дозирования (в том числе применяемых соединений) может изменяться с течением времени.

В некоторых вариантах реализации изобретения взрослому субъекту с нормальным весом могут быть введены дозы, которые варьируют от около 0,01 до 1000 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения доза составляет от 1 до 200 мг. Конкретная схема приема лекарственного средства, то есть доза, время и повторение будет зависеть от конкретного субъекта и истории болезни этого субъекта, а также от свойств соединения (например, периода полувыведения соединения и других факторов, которые хорошо известны специалистам в данной области техники).

В контексте данного изобретения соответствующая доза соединения, как описано в данном документе, будет зависеть от конкретного вовлеченного соединения (или композиции на его основе), состава и пути введения, типа и тяжести заболевания, от того соединение вводится с профилактическими или лечебными целями, предшествующей терапии, клинической истории субъекта и ответа на антагонист и по усмотрению лечащего врача. Как правило, врач будет управлять введением соединения до тех пор, пока не будет достигнута установленная доза, позволяющая достичь желаемого результата. Введение одного или более соединений может быть непрерывным или периодическим, в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, в зависимости от того цель введения является терапевтической или профилактической, так и других факторов, известных опытным специалистам. Введение соединения может быть по сути непрерывным в течение заранее выбранного периода времени или может быть разбито на ряд разделенных промежутками времени доз, например, до, во время или после проявления заболевания.

Как применяется в настоящем документе, термин "лечение" относится к применению или введению соединения, или композиции, содержащей соединение, субъекту, имеющему заболевание, симптомы заболевания или предрасположенность к заболеванию, с целью вылечить, заживить, смягчить, облегчить, изменить, исправить, улучшить или повлиять на болезнь, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию.

Облегчение заболевания включает в себя замедление развития или прогрессирующего заболевания, или снижения тяжести заболевания. Облегчение болезни не обязательно требует лечебных результатов. Как применяется в настоящем документе, "замедлить" развитие заболевания означает задержать, помешать, замедлить, стабилизировать и/или отсрочить прогрессирующее заболевание. Данное замедление может быть различной продолжительности в зависимости от истории болезни и/или лиц, которых лечат. Способ "замедление" или облегчения развития заболевания, или задержки начала заболевания - это способ, который снижает вероятность развития одного или более симптомов заболевания в данный конкретный период времени и/или снижает степень симптомов в течение определенного периода времени, по сравнению с ситуацией, когда способ не применяется. Такие сравнения обычно основаны на клинических исследованиях с использованием ряда субъектов, достаточного для получения статистически значимого результата.

"Развитие" или "прогрессирование" заболевания означает начальные проявления и/или последующее прогрессирование заболевания. Развитие заболевания может быть обнаружено и оценено с помощью стандартных клинических методов, которые хорошо известны в данной области техники. Однако, развитие также относится к прогрессирующему, что может быть незаметным. Для целей настоящего раскрытия изобретения, развитие или прогрессирующее относится к биологическому течению симптомов. "Развитие" включает в себя возникновение, рецидив и начало. Как применяется в настоящем документе, "начало" или "возникновение" болезни включает первоначальное начало и/или рецидив.

В некоторых вариантах реализации изобретения, соединение, описанное в данном документе, вводят субъекту, который нуждается в лечении, в объеме, достаточном для ингибирования активности одного или обоих ФНО-альфа, или ИЛ23А минимум на 20% (например, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более) *in vivo* или *in vitro*. Способы определения ингибирующей способности соединения известны в данной области техники. Приведенные в качестве примера анализы ингибирования ФНО-альфа и ИЛ23А приведенные в примерах.

Общепринятые способы, известные специалистам в данной области медицины, могут быть применены для введения соединения или фармацевтической композиции субъекту, в зависимости от типа заболевания, которое будет лечиться, или места заболевания. Данная композиция также может быть введена с помощью других общепринятых путей, например, введена перорально, парентерально, путем вдыхания спрея, местно, ректально, назально, трансбуккально, вагинально или через имплантированный резервуар. Термин "парентерально", как применяется в данном документе, включает подкожное, внутрикожное, внутривенное, внутримышечное, внутрисуставное, внутриаартериальное, внутрисиновиальное введение, введение в полость позвоночного канала, введение в очаг поражения, и внутричерепной впрыск или инфузионные методы. Кроме этого, она может быть введена субъекту путем введения вещества медленного всасывания, как применяют 1-, 3- или 6-месячные вещества медленного всасывания или биоразлагаемые материалы и способы.

Фармацевтические композиции

Другие аспекты раскрытия изобретения связаны с фармацевтической композицией, содержащей соединение, описанное в данном документе. Композиция, содержащая соединение настоящего изобретения (например, соединение, которое является специфическим к обоим - ФНО-альфа и ИЛ23А), может быть введена субъекту, имеющему или находящемуся под риском приобрести аутоиммунное или воспалительное заболевание. Изобретение относится к применению соединения настоящего изобретения в производстве лекарственного средства для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания. Соединения могут быть введены или по одиночке, или в сочетании с другими композициями для профилактики или лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания. Не ограничивающими примерами соединений настоящего изобретения для применения в фармацевтических композициях являются те, которые содержат:

- (i) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
- (ii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;
- (iii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;
- (iv) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;
- (v) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;
- (vi) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;
- (vii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;
- (viii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;
- (ix) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;
- (x) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;
- (xi) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; или
- (xii) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

Как применяется в настоящем документе, термин "фармацевтическая композиция" относится в составу соединения, описанного в данном документе, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать дополнительные вещества (например, для специфической доставки, увеличение периода полувыведения или другие терапевтические соединения).

Как применяется в настоящем документе, термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемое вещество, композицию или переносчик, такие как жидкий или твердый наполнитель, растворитель, наполнитель, вспомогательные вещества (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат кальция или цинка, или стеариновая кислота), или материал для инкапсулирования растворителя, которые участвуют в переносе или транспортировке соединения с одного участка тела

(например, участки введения), в другой участок (например, орган, ткань или часть тела). Фармацевтически приемлемый носитель является "приемлемым" в смысле совместимости с другими компонентами лекарственного средства и не вредит тканям субъекта (например, является физиологически совместимым, стерильным, имеет физиологический pH и т.д.).

Некоторые примеры веществ, которые могут служить в качестве фармацевтически-приемлемых носителей, включают: 1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; 2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; 3) целлюлозу и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза и ацетат целлюлозы; 4) порошкообразный трагакант; 5) солод; 6) желатин; 7) смазочные вещества, такие как магния стеарат, лаурилсульфат натрия и тальк; 8) наполнители, такие как масло какао и воски суппозиторий; 9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; 10) гликоли, такие как пропиленгликоль; 11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, манит и полиэтиленгликоль (ПЭГ); 12) сложные эфиры, такие как этил-олеат и этил-лауринат; 13) агар; 14) буферные вещества, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; 15) альгиновую кислоту; 16) апирогенную воду; 17) изотонический физиологический раствор; 18) раствор Рингера; 19) этиловый спирт 20) растворы с забуференным pH; 21) полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; 22) объемосоздающие вещества, такие как полипептиды и аминокислоты; 23) компонент сыворотки, такой как сывороточный альбумин, ЛПВП и ЛПНП; 22) C2-C12 спирты, такие как этанол; и 23) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических лекарственных препаратах. Также в состав могут входить: смачивающие вещества, окрашивающие вещества, антиадгезивы, покрывающие вещества, подсластители, вкусовые добавки, ароматизаторы, консерванты и антиоксиданты. Такие термины, как "наполнитель", "носитель", "фармацевтически-приемлемый носитель" или подобные применяются как взаимозаменяемые в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение настоящего изобретения в композиции вводят путем инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, при этом имплантат может быть пористым, непористым, или желеобразным веществом, включая мембрану, такую как резиновая мембрана или волокно. Как правило, при введении композиции применяют материалы, которые не абсорбируют соединение настоящего изобретения.

В других вариантах реализации изобретения соединения настоящего изобретения доставляются системой контролируемого высвобождения. В одном варианте реализации изобретения может быть применен насос (см., например, Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1533; Sefton, 1989, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 201; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88: 507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321: 574). В другом варианте реализации изобретения могут быть применены полимерные материалы (См., например, *Medical Applications of Controlled Release* (Langer and Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance* (Smolen and Ball eds., Wiley, New York, 1984); Ranger and Peppas, 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61. See also Levy et al., 1985, *Science* 228: 190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25: 351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71: 105). Другие системы контролируемого высвобождения обсуждаются, например, в Langer, выше.

Соединения настоящего изобретения могут быть введены как фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество связывающего вещества, и один или более фармацевтически совместимый компонент.

В типичных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция изготовлена в соответствии с рутинными процедурами в качестве фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного или подкожного введения субъекту, например человеку. Как правило, композиции для введения путем инъекций представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. В случае необходимости, фармкомпозиция также может содержать вещество, которое повышает растворимость, и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции. В целом, как правило, компоненты поставляются либо отдельно, либо в смеси в дозированном виде, например в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или сашет, с указанием количества активного вещества. Когда фармкомпозиция должна быть введена вливанием, она может быть приготовлена в виде флакона для вливания, содержащего стерильную фармацевтически-чистую воду или физиологический раствор. Когда фармкомпозицию вводят с помощью инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, таким образом, компоненты могут быть смешаны перед введением.

Фармацевтическая композиция для системного введения может быть жидкостью, например стерильным физиологическим раствором, раствором Рингера с лактозой или раствором Хэнка. Кроме этого фармацевтическая композиция может быть в твердой форме и повторно растворена или ресуспендирована сразу перед применением. Также рассматриваются лиофилизированные формы.

Фармацевтическая композиция может содержаться внутри липидных частиц или везикул, таких как липосомы или микрокристаллы, которые также подходят для парентерального введения. Частицы могут иметь любую подходящую структуру, например однослойную или многослойную, если только композиции содержатся в них. Соединения могут быть захваченными в стабилизированные плазмид-липидные

частицы (СПЛЧ), которые содержат липид слияния диолеоилфосфатидилэтаноламин (ДОФЕ), низкие уровни (5-10 мл%) катионного липида, и которые стабилизированы с помощью полиэтиленгликолевого (ПЭГ) покрытие (Zhang Y. P. et al, Gene Ther. 1999, 6: 1438-47). Положительно заряженные липиды, такие как N-[1-(2,3-диолеоилокси)пропил]-N,N,N-триметиламонийметилсульфат, или "ДОТАП," особенно желательны для таких частиц и везикул. Приготовление таких липидных частиц является хорошо известным. См., например, патенты США № 4880635; 4906477; 4911928; 4917951; 4920016 и 4921757.

Фармацевтические композиции данного изобретения могут быть введены или упакованы, например, в качестве однократной дозы. Термин "однократная доза", когда применяется по отношению к фармацевтической композиции данного раскрытия изобретения, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичного дозирования для субъекта, каждая единица содержит заданное количество активного вещества, рассчитанное для создания желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым растворителем, например, носителем или переносчиком.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединения, описанное в данном документе, может быть соединено с терапевтической частью, например, противовоспалительным средством. Методы для соединения таких терапевтических частей с полипептидами, включая, например, Fc домены, хорошо известны; см., например, Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (Eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson et al. (Eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (Eds.), 1985, pp. 475-506 "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (Eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; and Thorpe et al. (1982) "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates," *Immunol. Rev.*, 62: 119-158.

Дополнительно фармацевтическая композиция может быть предложена в качестве фармацевтического набора, который содержит: а) контейнер, содержащий соединение по настоящему изобретению в лиофилизированной форме; и б) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый растворитель (например, стерильную воду) для инъекций. Фармацевтически приемлемый растворитель может быть применен для восстановления или разведения лиофилизированных соединений по настоящему изобретению. При необходимости, к такому контейнеру может быть присоединено сообщение в форме, определенной правительственным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, для которых сообщение отражает одобрение органом производства, применения или продажи для введения человеку.

В другом аспекте реализации изобретения включено промышленное изделие, содержащее материалы, полезные для лечения описанных выше заболеваний. В некоторых вариантах реализации изобретения промышленное изделие содержит контейнер и этикетку. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. В некоторых вариантах реализации изобретения контейнер содержит композицию, которая является эффективной при лечении заболеваний, описанных в данном документе, и может иметь стерильный порт доступа. Например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, которая пробивается иглой для подкожных инъекций. Активное вещество в композиции является соединением настоящего изобретения. В некоторых вариантах реализации изобретения этикетка на контейнере или которая присоединена к контейнеру, указывает, что композиция применяется для лечения заболевания по выбору. Промышленное изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Рингера или раствор глюкозы. Оно может дополнительно содержать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши с инструкцией по применению.

Не вдаваясь в подробности, считается, что специалист в данной области техники, опираясь на приведенное выше описание изобретения, использует данное раскрытие изобретения в полном объеме. Вследствие этого, следующие конкретные варианты рассматриваться только как иллюстративные, а не как такие, что ограничивают остальное раскрытие изобретения в любой форме. Все публикации, цитируемые здесь, включены путем ссылки для целей или объекта изобретения, которые упоминаются в данном документе.

Примеры

Пример 1. Конструирование иллюстративных соединений, нацеленных на ИЛ23А и ФНО-альфа.

В табл. 2А ниже предлагаются соединения, которые связываются с обоими - ИЛ23А и ФНО-альфа, которые были использованы в следующих примерах. Данные соединения были продуцированы с помощью рекомбинантных способов, известных в данной области техники (см., например, публикации РСТ WO 2006/113665, WO 2008/157379 и WO 2010/080538, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки). Если коротко, плазмиды, кодирующие первый и второй полипептиды для каждого

соединения, были трансфицированные вместе в клетки CHO-S, применяя FreeStyle MAX Reagent (CHO). Клетки культивировали в течение 13-14 дней и соединения, которые были продуцированы клетками, очищали, используя Белок А хроматографию. Соединения были дополнительно очищены с помощью эксклюзионной хроматографии.

Таблица 2А. Приведенные в качестве примера ИЛ23А и ФНО-альфа связывающие соединения

Идентификатор соединения	Большая цепь VL	Большая цепь VH	Малая цепь VL	Малая цепь VH	Типы линкера	Изотип	SEQ ID NO: (11-й/2-ой)
Соединение А	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	GS	IgG1KO-YTE	13/14
Соединение В	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	VF	IgG1KO-YTE	15/16
Соединение С	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	GS	IgG1KO-YTE	17/18
Соединение D	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG1KO-YTE	19/20
Соединение E	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	GS	IgG1KO-YTE	21/22
Соединение F	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG1KO-YTE	23/24
Соединение G	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	GS	IgG1KO-YTE	25/26
Соединение H	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	VF	IgG1KO-YTE	27/28
Соединение I	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	GS	IgG1KO-YTE	29/30
Соединение J	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	GS	IgG1KO-YTE	31/32
Соединение K	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	VF	IgG1KO-YTE	33/34
Соединение L	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG1KO-YTE	35/36
Соединение M	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	GS	IgG1KO	44/45
Соединение N	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG1KO	46/47
Соединение O	ИЛ23А (1) VL	ФНОа (2) VH (SEQ	ФНОа (2) VL (SEQ	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID	GS	IgG1KO	48/49

	(SEQ ID NO: 8)	ID NO: 3)	ID NO: 4)	NO: 7)			
Соединение P	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG1KO	50/51
Соединение Q	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	GS	IgG4Pro	52/53
Соединение R	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	GS	IgG4Pro-YTE	54/55
Соединение S	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	GS	IgG4Pro	56/57
Соединение T	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	GS	IgG4Pro-YTE	58/59
Соединение U	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	VF	IgG1KO	60/61
Соединение V	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	VF	IgG1WT	62/63
Соединение W	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	VF	IgG4Pro	64/65
Соединение X	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	VF	IgG4Pro-YTE	66/67
Соединение Y	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	GS	IgG1WT	68/69
Соединение Z	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	GS	IgG4Pro	70/71
Соединение AA	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	GS	IgG4Pro-YTE	72/73
Соединение AB	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG1WT	74/75

	NO: 8)						
Соединение AC	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG4Pro	76/77
Соединение AD	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG4Pro-YTE	78/79
Соединение AE	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	GS	IgG1KO	80/81
Соединение AF	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	GS	IgG1WT	82/83
Соединение AG	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	GS	IgG4Pro	84/85
Соединение AH	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	GS	IgG4Pro-YTE	86/87
Соединение AI	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	VF	IgG1KO	88/89
Соединение AJ	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	VF	IgG1WT	90/91
Соединение AK	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	VF	IgG4Pro	92/93
Соединение AL	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	VF	IgG4Pro-YTE	94/95
Соединение AM	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	GS	IgG1KO	96/97
Соединение AN	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	GS	IgG1WT	98/99
Соединение AO	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	GS	IgG4Pro	100/101

Соединение AP	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	GS	IgG4Pro-YTE	102/103
Соединение AQ	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG1KO	104/105
Соединение AR	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG1WT	106/107
Соединение AS	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG4Pro	108/109
Соединение AT	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (3) VH (SEQ ID NO: 5)	ФНОа (3) VL (SEQ ID NO: 6)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG4Pro-YTE	110/111
Соединение AU	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	GS	IgG1KO	112/113
Соединение AV	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	GS	IgG1WT	114/115
Соединение AW	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	GS	IgG4Pro	116/117
Соединение AX	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	GS	IgG4Pro-YTE	118/119
Соединение AY	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	VF	IgG1KO	120/121
Соединение AZ	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	VF	IgG1WT	122/123
Соединение BA	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	VF	IgG4Pro	124/125
Соединение BB	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	VF	IgG4Pro-YTE	126/127

Соединение BC	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	GS	IgG1KO	128/129
Соединение BD	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	GS	IgG1WT	130/131
Соединение BE	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	GS	IgG4Pro	132/133
Соединение BF	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	GS	IgG4Pro-YTE	134/135
Соединение BG	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	GS	IgG1WT	136/137
Соединение BH	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG1WT	138/139
Соединение BI	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG4Pro	140/141
Соединение BJ	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	VF	IgG4Pro-YTE	142/143

ФНОа=ФНО-альфа, VL=вариабельный домен легкой цепи, VH=вариабельный домен тяжелой цепи, GS=GGGSGGGG (SEQ ID NO: 9), LGGGSG (SEQ ID NO: 10), или оба, VF=FNRGES (SEQ ID NO: 11), VEPKSS (SEQ ID NO: 12), или оба, IgG1 WT=IgG1 дикий тип, IgG1KO-YTE=IgG1 с M252Y/S254T/T256E тройной мутацией в Fc области и также содержит L234A/L235A мутации, IgG4Pro-YTE=IgG4 с M252Y/S254T/T256E тройной мутацией в Fc области и также содержит S241P мутацию, IgG1KO=усеченная Fc область, которая содержит L234A/L235A мутации, IgG4Pro=содержит S241P мутацию. 1-й=первый полипептид, 2-ой=второй полипептид. Нумерация мутаций представляет собой нумерацию согласно Kabat для обычных анти тел, начиная с принятого для антител CH1.

Ниже приведенные контрольные антитела также были применены для целей сравнения. Контролем служили моноклональные антитела, нацеленные на ФНОа или ИЛ23.

Таблица 2Б

Контрольные	Последовательность VH	Последовательность VL
Контрольное антитело 1 (ФНОа моноклональное антитело)	ФНОа (1) VH (SEQ ID NO: 1)	ФНОа (1) VL (SEQ ID NO: 2)
Контрольное антитело 2 (ФНОа моноклональное антитело)	ФНОа (2) VH (SEQ ID NO: 3)	ФНОа (2) VL (SEQ ID NO: 4)
Контрольное антитело 3 (ИЛ23 моноклональное антитело)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO: 7)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO: 8)

Пример 2. Поверхностный Плазмонный Резонанс (ППР) аффинности иллюстративных соединений
Тестируемые соединения были проанализированы с помощью ППР, чтобы определить сродство к ФНО-альфа и ИЛ23А.

Материалы и способы

НИР эксперименты были выполнены на приборе ProteOn XPR36 (Bio Rad). GLM чип был предварительно обработан с помощью последовательных впрыскиваний 60 с 0,5% SDS, 50 mM раствора NaOH и 100 mM HCl при скорости потока 30 мкл/мин как в вертикальном, так и в горизонтальном направлениях. Предварительно обработанный GLM чип был активирован с помощью впрыскивания смеси EDC (76,7 мг/мл) и сульфо-NHS (21,7 мг/мл) с соотношением 1:1 в 6 горизонтальных каналов. Козы IgG антитела (ГАНА) к Fc гамма человека (Invitrogen) в концентрации 30 мкг/мл в 10 mM, pH 5,0 натрий-ацетатном буфере был иммобилизован до 8,000 резонансных единиц на активированном GLM чипе в 6 горизонтальных каналах. Чип был окончательно деактивирован с помощью 1 M этаноламин-HCl в 6 горизонтальных каналах. Подготовленный чип ГАНА был возвращен в вертикальное положение для захвата исследуемых соединений по 5 вертикальным каналам, и последний канал был использован в качестве

референсной колонки. Чип захвата был снова размещен в горизонтальной плоскости для связывания. Связанные человеческие ИЛ-23 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc) в пяти концентрациях, 10,0 нМ, 5,00 нМ, 2,50 нМ, 1,25 нМ и 0,625 нМ, были введены горизонтально по поверхности исследуемых соединений в течение 10 мин со скоростью потока 40 мкл/мин в следующем буфере пробега (Bio Rad): фосфатно-солевой буфер (pH 7,4), 0,005% Tween 20. Была разрешена диссоциация в течение 2 ч. Поверхность ГАНА была восстановлена с помощью короткого импульсного впрыска (18 секунд) 0,85% фосфорной кислоты (Bio Rad) при скорости потока 100 мкл/мин в горизонтальном и вертикальном направлениях после 10 мин ассоциации и 2 ч диссоциации. Восстановленный ГАНА был готов к еще одному циклу связывания. Связывания соединений с человеческим ФНО-альфа или ФНО-альфа яванского макака было выполнено аналогично.

Результаты

Результаты в табл. 3 показывают, что оба исследуемых соединения были способны связывать ФНО-альфа и ИЛ23 с константой диссоциации (КД) в пиколярном диапазоне.

Таблица 3

Идентификатор соединения	КД для человеческого ФНО-альфа (пМ)	КД для ФНО-альфа яванского макака (пМ)	КД для человеческого ИЛ23 (пМ)
Соединение А	2,14	7,71	4,28 ± 2,03
Соединение Е	4,11 ± 0,68	37,1 ± 16,2	7,00 ± 6,92

Пример 3. Оценка связывания с мембран-связанным ФНО-альфа с помощью проточной цитометрии. Исследуемые соединения оценивали по их способности дозозависимо связываться с клеточными линиями, трансфицированными для того, чтобы экспрессировать мембран-связанный ФНО-альфа.

Материалы и способы

Все реагенты были подготовлены в красящем буфере для проточной цитометрии (BioLegend). Трансфицированные клеточные линии с мембран-экспрессированным ФНО-альфа (Jurkat и CHO) и родительские клеточные линии были собраны из резервуаров для тканевых культур, промыты, подсчитаны, ресуспендированы к 1×10^6 клеток/мл в красящем буфере для проточной цитометрии. Сто микролитров клеточной суспензии добавляли в 96-луночные плашки для микротитрования и помещали на лед. Были подготовлены титры исследуемых соединений и 50 мкл было добавлено к клеткам. После шестидесяти минут инкубации на льду, клетки + исследуемые соединения были промыты и было добавлено 50 мкл вторичного антитела (Jackson ImmunoResearch). Образцы инкубировали в темноте при 4 C, в течение 60 минут, затем промывали. После заключительной промывки клетки ресуспендировали в 60 мкл фиксатора (BD Bioscience). Медиану флуоресценции определяли для каждого образца в проточном цитометре и наносили на график в зависимости от концентрации испытуемого образца. Значение EC_{50} были рассчитаны с применением 4 Parameter Logistic доступной через в Excel XLfit (Activity Base software, ID Business Solutions, Ltd.). Значение EC_{50} , приведенные ниже, являются геометрическими средними, рассчитанными по нескольким экспериментам для каждого исследуемого образца, и показаны в табл. 4.

Результаты

Результаты, показанные в табл. 4 ниже, демонстрируют, что исследованные соединения, связанные с мембраной, связывали ФНО-альфа в зависимости от дозы.

Таблица 4. Значение EC_{50} для мембран-связанного ФНО-альфа

Идентификатор соединения	EC_{50} связывания клеток мФНО-Jurkat пМ (геометрическое среднее)	EC_{50} связывания клеток мФНО-CHO пМ (геометрическое среднее)
Соединение М	650	950
Соединение А	910	890
Соединение О	270	770
Соединение Е	200	450
Контрольное антитело 1 (ФНОа)	310	400
Контрольное антитело 2 (ФНОа)	230	310

Пример 4. In vitro L929 анализ цитотоксичности

Соединения были исследованы на их способность ингибировать индуцированную ФНО-альфа цитотоксичность.

Способы и материалы

Данный протокол использует PrestoBlue™⁰ Cell Viability Reagent для определения цитотоксичности рекомбинантного человеческого ФНО-альфа. Более подробный протокол PrestoBlue Cell Viability Protocol может быть загружен с сайта Invitrogen (Invitrogen.com). L929 клетки были выращены и собраны. $1,5 \times 10^4$ клеток переносили в каждую лунку 96-луночного плашки и инкубировали всю ночь при 37°C. Были подготовлены последовательные разведения соединений начиная с 5 нМ в полной среде для анализа, которая содержала 10 мкг/мл актиномицина D и 1000 пг/мл rh-ФНО-альфа. Положительный контроль содержал 20 нг/мл rh-ФНО-альфа и 1 мкг/мл актиномицина D. Отрицательный контроль не содержал ФНО-альфа. 10 мкл разведенный добавляли в соответствующие лунки и инкубировали всю ночь при 37°C в 5% CO₂. Реагент PrestoBlue™ был добавлен в лунки, и плашку инкубировали в течение 2 ч при 37°C в 5% CO₂. Относительная единица флуоресценции каждой лунки была измерена, применяя спектрофотометр для считывания планшетов Victor™x2 (возбуждение: 560 нм, излучение: 590 нм). Были нанесены на график флуоресцентные единицы (ось Y) в зависимости от концентрации исследуемого соединения (ось X), и значение IC₅₀ и значение IC₉₀ исследуемых соединений рассчитывали с помощью программного обеспечения Graphpad.

Результаты

Результаты в табл. 5 показывают, что исследуемые соединения были способны ингибировать индуцированную ФНО-альфа цитотоксичность в зависимости от дозы.

Таблица 5

Идентификатор соединения	IC ₅₀ IC ₉₀	L929 Цитотоксичность ФНО пМ Геометрическое среднее
Соединение M	IC ₅₀	19
Соединение M	IC ₉₀	55
Соединение A	IC ₅₀	20
Соединение A	IC ₉₀	67
Соединение N	IC ₅₀	34
Соединение N	IC ₉₀	
Соединение D	IC ₅₀	
Соединение D	IC ₉₀	
Соединение O	IC ₅₀	4,2
Соединение O	IC ₉₀	16
Соединение E	IC ₅₀	4,1
Соединение E	IC ₉₀	17
Соединение P	IC ₅₀	3,4
Соединение P	IC ₉₀	14
Соединение F	IC ₅₀	2,5
Соединение F	IC ₉₀	10
Контрольное антитело 1 (ФНОα)	IC ₅₀	62
Контрольное антитело 1 (ФНОα)	IC ₉₀	230
Контрольное антитело 2 (ФНОα)	IC ₅₀	20
Контрольное антитело 2 (ФНОα)	IC ₉₀	95

Пример 5. Ингибирование зависимого от ФНО-альфа высвобождение ИЛ-8 в клетках HeLa

Анти-ФНО исследуемые образцы были оценены на предмет их способности ингибировать зависящее от ФНО высвобождение ИЛ8 с человеческой клеточной линии HeLa. Образцы были исследованы при высоких и низких концентрациях рекомбинантного человеческого ФНО-альфа и одной (высокой) концентрации рекомбинантного ФНО-альфа яванского макака.

Материалы и способы

Кратко, клетки HeLa (ATCC) собирали, промывали, подсчитывали и ресуспендировали к 4×10^5 клеток/мл в стандартной полной среде (v/v) 10% фетальной бычьей сыворотки с 1% пенициллина и стрептомицина (Полная Среда, ПС). Сто микролитров суспензии клеток HeLa добавляли в 96-луночные плашки для микротитрования. Рекомбинантный человеческий ФНО-альфа (R&D Systems) в двух концентрациях (147 или 4,4 нМ), а также созданным рекомбинантные ФНО-альфа яванского макака (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.) (147 нМ) предварительно инкубировали в течение 30 мин при 37°C только с ПС или с титрами исследуемых образцов. После предварительной инкубации исследуемых образцов + ФНО-альфа, 100 мкл смеси(ей) добавляли к клеткам и тестовые плашки инкубировали при 37°C с 5% CO₂ увлажненным воздухом в течение 20 ч. Контрольные образцы получали или ПС (нестимулирован-

ный контроль), или рекомбинантный ФНО-альфа, разведенный в ПС (стимулированные контроли). После инкубации супернатанты анализировали по ИЛ8 в наборе для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) (MesoScale Discovery) в соответствии с инструкциями производителя. Интерполированные значения ИЛ8 пг/мл были определены для каждого образца и конвертированы в процент от контроля (ПОК). ПОК был нанесен на график в зависимости от концентрации исследуемого образца, и были рассчитаны значения IC_{50} и IC_{90} , применяя 4 Parameter Logistic Model, которая была доступна через Excel XLfit (Activity Base software, ID Business Solutions, Ltd.).

Исследуемые соединения были проанализированы с учетом IC_{50}/IC_{90} , как описано выше, и средние геометрические были рассчитаны по нескольким экспериментам для каждого исследуемого образца, и приведены в табл. 6.

Результаты

Результаты в табл. 6 показывают, что средние геометрические значения IC_{50} и IC_{90} для исследуемых соединений были похожи на средние геометрические значения IC_{50} и IC_{90} для Контрольного антитела 1 и для Контрольного антитела 2. Данные показывают, что исследуемые соединения в зависимости от дозы ингибируют индуцированную ФНО-альфа секрецию ИЛ-8, которая была индуцирована или при помощи человеческого ФНО-альфа (при двух исследованных концентрациях), или ФНО-альфа яванского макака.

Таблица 6

Идентификатор соединения	IC_{50} IC_{90}	HeLa ИЛ8 Низ-Чел-ФНО пМ Среднее геометрическое	HeLa ИЛ8 Выс-Чел-ФНО пМ Среднее геометрическое	HeLa ИЛ8 Мак-ФНО пМ Среднее геометрическое
Соединение M	IC_{50}	7,9	260	150
Соединение M	IC_{90}	48	420	270
Соединение A	IC_{50}	8	280	120
Соединение A	IC_{90}	41	460	260
Соединение N	IC_{50}	9,2	350	170
Соединение N	IC_{90}	54	570	330
Соединение D	IC_{50}	11	380	190
Соединение D	IC_{90}	63	590	390
Соединение O	IC_{50}	9,9	430	300
Соединение O	IC_{90}	43	760	970
Соединение E	IC_{50}	9,2	320	180
Соединение E	IC_{90}	35	530	600
Соединение P	IC_{50}	9,2	410	210
Соединение P	IC_{90}	36	810	810
Соединение F	IC_{50}	7,9	350	190
Соединение F	IC_{90}	39	660	740
Контрольное антитело 1 (ФНО α)	IC_{50}	34	330	170
Контрольное антитело 1 (ФНО α)	IC_{90}	140	490	330
Контрольное антитело 2 (ФНО α)	IC_{50}	11	290	280
Контрольное антитело 2 (ФНО α)	IC_{90}	55	520	1200

Пример 6. Ингибирования зависящего от ФНО-альфа высвобождение ИЛ8 в цельной крови
ФНО является возможным индуктором высвобождение ИЛ8 из человеческих клеток. Соединения исследовали на их способность ингибировать зависящее от ФНО-альфа высвобождение ИЛ-8 в образцах цельной крови.

Способы и материалы

Кратко, 120 мкл цельной крови с гепарином добавляли в каждую лунку в 96-луночной плашке для микротитрования. Реагенты для анализа были подготовлены в стандартной Т-клеточной среде (ТКС). Титры исследуемых образцов подготавливали в 10-кратных концентрациях и предварительно инкубировали с 10-кратной концентрацией рекомбинантного человеческого ФНО (100 нг/мл, R&D Systems) в течение 1 ч при температуре 37°C. После этой предварительной инкубации, 30 мкл смеси цитокин/исследуемое соединение добавляли к цельной крови вместе с 30 мкл соответствующего контроля в ТКС, и инкубировали при 37°C с 5% CO₂ увлажненным воздухом в течение 48 ч. Контрольные образцы получали или ТКС (не стимулированные контроли), или рекомбинантный человеческий ФНО-альфа, разведенный в ТКС (стимулированные контроли). После инкубации супернатанты анализировали по ИЛ8 в наборе ELISA (MesoScale Discovery) следуя инструкциям производителя. Интерполированные значения ИЛ8 пг/мл были определены для каждого образца и конвертированы в процент от контроля

(ПОК). ПОК был нанесен на график в зависимости от концентрации исследуемого образца, и были рассчитаны значения IC_{50} и IC_{90} применяя 4 Parameter Logistic Model, которая была доступна через Excel XLfit (Activity Base software, ID Business Solutions, Ltd.).

Исследуемые соединения были проанализированы с учетом IC_{50}/IC_{90} , как описано выше, и средние геометрические были рассчитаны по нескольким экспериментам для каждого исследуемого образца и приведены в табл. 7.

Результаты

Результаты в табл. 7 показывают, что средние геометрические значения IC_{50} и IC_{90} для исследуемых соединений были похожи на средние геометрические значения IC_{50} и IC_{90} для Контрольного антитела 1 и для Контрольного антитела 2. Данные показывают, что исследуемые соединения в зависимости от дозы ингибируют идущее ФНО-альфа высвобождение ИЛ-8 в цельной крови человека.

Таблица 7

Идентификатор соединения	IC_{50} IC_{90}	ФНО-ИЛ8 Цельная кровь пМ Геометрическое среднее
Соединение М	IC_{50}	380
Соединение М	IC_{90}	790
Соединение А	IC_{50}	360
Соединение А	IC_{90}	490
Соединение N	IC_{50}	270
Соединение N	IC_{90}	520
Соединение D	IC_{50}	560
Соединение D	IC_{90}	1100
Соединение O	IC_{50}	320
Соединение O	IC_{90}	470
Соединение E	IC_{50}	340
Соединение E	IC_{90}	610
Соединение P	IC_{50}	290
Соединение P	IC_{90}	420
Соединение F	IC_{50}	310
Соединение F	IC_{90}	450
Контрольное антитело 1 (ФНО α)	IC_{50}	320
Контрольное антитело 1 (ФНО α)	IC_{90}	490
Контрольное антитело 2 (ФНО α)	IC_{50}	330
Контрольное антитело 2 (ФНО α)	IC_{90}	600

Пример 7. Анализы фосфорилирования NF- κ B и СТАТ3

Взаимодействие ИЛ23 с его гетеродимерным рецепторным комплексом (ИЛ12P β 1-ИЛ23P) приводит к нисходящему фосфорилированию сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 3 (СТАТ3). Взаимодействие ФНО с его рецепторами (ФНОR1/ФНОR2) приводит к нисходящему фосфорилированию ядерного фактора энхансера гена каппа легкого полипептида в В-клетках (NF- κ B). Соединения оценивали по их способности ингибировать ФНО-зависимое фосфорилирование NF- κ B в клетках Jurkat, и ИЛ23-зависимое фосфорилирование СТАТ3 в клетках DB.

Способы и материалы

Коротко, культуры клеток Jurkat (ATCC) и клеток DB (ATCC), которые доращивали до лог-фазы, собирали, промывали, подсчитывали и ресуспендировали в 2×10^7 клеток/мл в стандартной полной среде (ПС; RPMI1640 с (объем/объем) 10% ФБС и 1X пенициллина и стрептомицина (Invitrogen). Титры исследуемых образцов подготавливали в 4-кратных концентрациях и предварительно инкубировали со смесью 4-кратного рекомбинантного человеческого ИЛ23 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.) и рекомбинантного человеческого ФНО (R&D Systems) в течение 1 ч при температуре 37°C. После предварительной инкубации исследуемого реагента + смесь цитокинов, 100 мкл смеси добавляли в лунки, которые содержали 100 мкл клеток в двух повторностях. Контроль устанавливали следующим образом: 100 мкл разбавленного ФНО/ИЛ23 + 100 мкл объединенных клеток (стимулированный контроль), или 100 мкл ПС + 100 мкл объединенных клеток (нестимулированный контроль). Планшеты для анализа инкубировали ровно 10 мин при 37°C с 5% CO $_2$ увлажненным воздухом. После инкубации готовили клеточные лизаты и ф-NF- κ B и ф-СТАТ3 оценивали в соответствии с инструкцией производителя (MesoScale Discovery). Начальные значения ф-NF- κ B и ф-СТАТ3 определяли для каждого образца и конвертировали в процент от контроля (ПОК). ПОК был нанесен на график (ось Y) в зависимости от концентрации исследуемого вещества (ось X). Значение IC_{50} и IC_{90} были рассчитаны с применением 4 Parameter Logistic, доступной через Excel XLfit (Activity Base software, ID Business Solutions, Ltd.).

Исследуемые соединения были проанализированы с учетом IC_{50}/IC_{90} , как описано выше, и средние

геометрические были рассчитаны по нескольким экспериментам для каждого исследуемого образца, и приведены в табл. 10. Примечание: данный анализ обеспечивает уверенность в том, что двойная молекула способна нейтрализовать оба нисходящих события передачи сигнала. Момент времени для анализа является оптимальным только для сигнала p-NF-κB, и поэтому рассчитанные IC₅₀/IC₉₀ не отражают общую эффективность в количественном выражении.

Результаты

Результаты в табл. 8 показывают, что исследуемые соединения были способны ингибировать оба - индуцированное ФНО-альфа фосфорилирование NF-κB, а также индуцированное ИЛ23 фосфорилирование СТАТ3 в клетках DB.

Таблица 8

Идентификатор соединения	IC ₅₀ IC ₉₀	Двойные Фосфо Jurkat-φNf-Kb пМ Среднее геометрическое*	Двойные Фосфо DB-φСТАТ3 пМ Среднее геометрическое*
Соединение M	IC ₅₀	290	190
Соединение M	IC ₉₀	680	580
Соединение A	IC ₅₀	300	200
Соединение A	IC ₉₀	480	500
Соединение N	IC ₅₀	300	210
Соединение N	IC ₉₀	620	760
Соединение D	IC ₅₀	270	170
Соединение D	IC ₉₀	810	560
Соединение O	IC ₅₀	210	210
Соединение O	IC ₉₀	740	580
Соединение E	IC ₅₀	260	230
Соединение E	IC ₉₀	340	770
Соединение P	IC ₅₀	290	340
Соединение P	IC ₉₀	340	630
Соединение F	IC ₅₀	280	360
Соединение F	IC ₉₀	760	980
Контрольное антитело 1 (ФНОα)	IC ₅₀	360	НА
Контрольное антитело 1 (ФНОα)	IC ₉₀	660	НА
Контрольное антитело 2 (ФНОα)	IC ₅₀	260	НА
Контрольное антитело 2 (ФНОα)	IC ₉₀	420	НА
Контрольное антитело 3 (ИЛ23А)	IC ₅₀	НА	89
Контрольное антитело 3 (ИЛ23А)	IC ₉₀	НА	230

* Результаты являются полуколичественными и оптимизированы для считывания ФНО.

НА: Нет Активности

Пример 8. Ингибирование индуцированного ИЛ23 фосфорилирования СТАТ3 в клетках DB

Взаимодействие ИЛ23 с его гетеродимерным рецепторным комплексом (ИЛ12Рβ1-ИЛ23Р) приводит к нисходящему фосфорилированию сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 3 (СТАТ3). Анти-ИЛ23 исследуемые образцы были оценены на предмет их способности ингибировать зависящее от ИЛ23 фосфорилирование в человеческой клеточной линии DB.

Материалы и способы

Кратко, 100 мкл человеческой линии клеток DB (ATCC), которые доращивали к лог-фазе, было добавлено в каждую лунку в 96-луночном планшете для микротитрования в концентрации 1X 10⁷ клеток/мл. Реагенты для анализа готовили в полной среде (ПС; RPMI1640 с (объем/объем) 10% фетальной бычьей сывороткой и 1X пенициллином-стрептомицином (Invitrogen)). Титры исследуемых образцов подготавливали в 4-кратных концентрациях и предварительно инкубировали с 4-кратной концентрацией рекомбинантного человеческого ИЛ23 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.) в течение 1 часа при температуре 37°C. После этой предварительной инкубации, 100 мкл смеси цитокин/исследуемое соединение добавляли к 100 мкл клеток DB и инкубировали при 37°C с 5% CO₂ увлажненным воздухом в течение 30 мин. Контрольные образцы получали или ПС (не стимулированные контроли), или рекомбинантный ИЛ23, разведенный в ПС (стимулированные контроли). После инкубации готовили клеточные лизаты и фСТАТ3 был оценен в соответствии с инструкцией производителя (MesoScale Discovery). Начальные значения фСТАТ3 определяли для каждого образца и конвертировали в процент от контроля

(ПОК). ПОК был нанесен на график в зависимости от концентрации исследуемого образца, и были рассчитаны значения IC_{50} и IC_{90} , применяя 4 Parameter Logistic Model, которая была доступна через Excel XLfit (Activity Base software, ID Business Solutions, Ltd.). Исследуемые соединения были проанализированы с учетом IC_{50}/IC_{90} , как описано выше, и средние геометрические были рассчитаны по нескольким экспериментами для каждого исследуемого образца, и продемонстрированы в табл. 9.

Результаты

Результаты в табл. 9 показывают, что средние геометрические значения IC_{50} и IC_{90} для исследуемых соединений были похожи на средние геометрические значения IC_{50} и IC_{90} для контрольного антитела анти-ИЛ23Ap19. Данные показывают, что исследуемые соединения дозозависимо ингибировали индуцированное ИЛ23 фосфорилирование СТАТ3 в клетках DB.

Таблица 9

Идентификатор соединения	IC_{50} IC_{90}	челИЛ23 фСТАТ3 DB анализ пМ среднее геометрическое
Соединение M	IC_{50}	190
Соединение M	IC_{90}	530
Соединение A	IC_{50}	210
Соединение A	IC_{90}	420
Соединение N	IC_{50}	240
Соединение N	IC_{90}	510
Соединение D	IC_{50}	280
Соединение D	IC_{90}	560
Соединение O	IC_{50}	300
Соединение O	IC_{90}	720
Соединение E	IC_{50}	300
Соединение E	IC_{90}	700
Соединение P	IC_{50}	300
Соединение P	IC_{90}	620
Соединение F	IC_{50}	260
Соединение F	IC_{90}	600
Контрольное антиило3 (ИЛ23А)	IC_{50}	160
Контрольное антиило3 (ИЛ23А)	IC_{90}	310

Пример 9. Анализ спленоцитов мыши зависимый от ИЛ-23 человека (АМС)

Анализ на базе спленоцитов мыши был применен для оценки способности анти-человеческий-ИЛ23 исследуемых образцов ингибировать индукцию мышшиного ИЛ17 с помощью рекомбинантного ИЛ23 человека и рекомбинантного ИЛ23 яванского макака в культуре спленоцитов мыши.

Материалы и способы

Коротко, мононуклеарные клетки с мышшиных селезинок (самки мышшей C57BL/6 в возрасте менее 13 недель JAX) были изолированы, промыты, подсчитаны и ресуспендированны до 4×10^6 клеток/мл в стандартной Т-клеточной среде (ТКС). Сто микролитров суспензии мИЛ2/спленоцитов добавляли в 96-луночные плашки для микротитрования. Рекомбинантный человеческий ИЛ23 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.) или рекомбинантный ИЛ23 яванского макака (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.) разводили в ТКС и предварительно инкубировали в течение 2 ч при температуре 37°C только в ТКС, или с титрами исследуемых образцов. После преинкубации исследуемый образец + ИЛ23, 100 мкл смеси добавляли к клеткам и тестовые плашки инкубировали при 37°C с 5% CO_2 увлажненным воздухом в течение 48 ч. Контрольные образцы получали или ТКС (не стимулированные контроли), или рекомбинантный человеческий ИЛ23 разведенный в ТКС (стимулированные контроли). После инкубации, уровни мышшиного ИЛ17 определяли из супернатанта, применяя Quantikine® Mouse ИЛ17 Immunoassay согласно инструкции производителя (R&D Systems). Интерполированные значения мИЛ17 пг/мл были определены для каждого образца и конвертированы в процент от контроля (ПОК). ПОК был нанесен на график в зависимости от концентрации исследуемого образца, и были рассчитаны значения IC_{50} и IC_{90} , применяя 4 Parameter Logistic Model, которая была доступна через Excel Xlfit (Activity Base software, ID Business Solutions, Ltd.). Анти-ИЛ23 исследуемые образцы были проанализированы с учетом IC_{50}/IC_{90} , как описано выше, и средние геометрические были рассчитаны по нескольким экспериментами для каждого исследуемого образца, и продемонстрированы в табл. 10.

Результаты

Результаты в табл. 10 показывают, что исследуемые соединения были способны подавлять высвобождение ИЛ17 с мышшиных спленоцитов, которое было индуцировано ИЛ23 человека или яванского макака.

Таблица 10

Идентификатор соединения	IC ₅₀ IC ₉₀	челИЛ23 АМС пМ среднее геометрическое	макИЛ23 АМС пМ среднее геометрическое
Соединение М	IC ₅₀	140	120
Соединение М	IC ₉₀	1600	890
Соединение А	IC ₅₀	180	120
Соединение А	IC ₉₀	1700	730
Соединение N	IC ₅₀	230	140
Соединение N	IC ₉₀	2000	940
Соединение D	IC ₅₀	190	160
Соединение D	IC ₉₀	2200	1100
Соединение O	IC ₅₀	210	120
Соединение O	IC ₉₀	2200	800
Соединение E	IC ₅₀	200	77
Соединение E	IC ₉₀	1700	1200
Соединение P	IC ₅₀	200	97
Соединение P	IC ₉₀	1400	1500
Соединение F	IC ₅₀	170	69
Соединение F	IC ₉₀	2300	1500
Контрольное антитело 3 (ИЛ23А)	IC ₅₀	53	17
Контрольное антитело 3 (ИЛ23А)	IC ₉₀	350	240

Пример 10. Ингибирование индуцированного ИЛ23 фосфорилирования СТАТ3

Взаимодействие ИЛ23 с его гетеродимерным рецепторным комплексом (ИЛ12Рβ1-ИЛ23Р) приводит к нисходящему фосфорилированию Сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 3 (СТАТ3). Соединения были испытаны на способность подавлять индуцированную ИЛ23 активацию СТАТ3 в стабильно трансфицированных клетках DB.

Материалы и способы

Клетки были стимулированы конечной концентрацией 15 нг/мл белка ИЛ23. Эта доза была оценена как EC60 по данным предыдущих экспериментов, в то же время позволяющая ингибирование исследуемым соединением. Клетки были перенесены на плашки, соединения дозировали, и добавляли ИЛ-23 (в указанном порядке) и инкубировали ночь. Если соединение ингибировало стимуляцию клеток, СТАТ3 подавлялся, что приводило к снижению активности люциферазы. Результаты

Результаты, представленные в табл. 11, показывают, что исследуемые соединения были способны подавлять индуцированное ИЛ23 фосфорилирование СТАТ3.

Таблица 11

Идентификатор соединения	IC ₅₀ IC ₉₀	ИЛ23А фСТАТ3 (MG) пМ среднее геометрическое
Соединение М	IC ₅₀	120
Соединение М	IC ₉₀	300
Соединение А	IC ₅₀	130
Соединение А	IC ₉₀	1100
Соединение O	IC ₅₀	160
Соединение O	IC ₉₀	650
Соединение E	IC ₅₀	140
Соединение E	IC ₉₀	830
Соединение P	IC ₅₀	69
Соединение P	IC ₉₀	480
Соединение F	IC ₅₀	90
Соединение F	IC ₉₀	650
Контрольное антитело 3 (ИЛ23А)	IC ₅₀	35
Контрольное антитело 3 (ИЛ23А)	IC ₉₀	140

Пример 11. Дополнительные анализы ИЛ23-А СТАТ3

Дополнительные эксперименты проводили подобным примеру 8 образом для проверки ингибирования индуцированной ИЛ23 активации СТАТ3.

Способы и материалы

Суспензионные клетки DB-СТАТ3Luc10 Clone 10 выращивали в RPMI1640 + 10% ФБС. Добавляли 20,000 клеток в каждую лунку 96-луночных планшетов 80 мкл/лунка суспензии клеток. 10 мкл одного из последовательно разведенных соединений добавляли в каждую лунку. 15 нг/мл рекомбинантного человеческого ИЛ-23 добавляли в каждую лунку, при этом определенные лунки содержали только исследуе-

мые соединения и не содержали ИЛ-23, для сравнения. Плашки инкубировали ночь при 37°C/5% CO₂. Активность люцефифразы оценивали, применяя Steady-Glo (Promega and One-Glo), и результаты были считаны на Envision Reader.

Результаты

IC₅₀ и IC₉₀ для исследуемых соединений представлены в табл. 12 и 13. Эти таблицы показывают, что соединения ингибируют ИЛ-23-зависимую активацию СТАТ3 в зависимости от дозы.

Таблица 12

Идентификатор соединения	IC ₅₀ (нМ)	IC ₉₀ (нМ)
Соединение N	235,2	873,7
Контрольное антитело 3 (ИЛ23А)	96,5	192,6
Соединение D	18,6	871,6
Соединение E	211,9	965,1
Контрольное антитело 3 (ИЛ23А)	104,3	198,8
Соединение G	220,2	1151,0
Соединение C	162,7	620,4
Контрольное антитело 3 (ИЛ23А)	80,3	181,3

Таблица 13

Идентификатор соединения	Первое тестирование		Второе тестирование		Среднее геометрическое	
	IC ₅₀ (нМ)	IC ₉₀ (нМ)	IC ₅₀ (нМ)	IC ₉₀ (нМ)	IC ₅₀ (нМ)	IC ₉₀ (нМ)
Контрольное антитело 3 (ИЛ23А)			96,5	192,6	93,1	190,8
			104,3	198,8		
			80,3	181,3		
Соединение N	178,6	856,4	235,2	873,7	205,0	865,0
Соединение D	178,1	657,2	185,6	871,6	181,8	756,8
Соединение E	170,2	764,9	211,9	965,1	189,9	859,2
Соединение G	187,1	600,5	220,2	1151,0	203,0	831,4
Соединение C	134,9	352,6	162,7	620,4	148,1	467,7

Пример 12. Ингибирование индуцированного рекомбинантным ИЛ23 человека высвобождения ИЛ17А и ИЛ22 мыши

Исследуемые соединения оценивали по их способности ингибировать индуцированное человеческим ИЛ23 цитокиновое высвобождение у мышей C57/B16. Секрецию ИЛ17А и ИЛ22 измеряли после внутривоковой инъекции ИЛ23.

Материалы и способы

Коротко, мышинные самки C57BL/6 (7-10 недель, Charles River) были случайным образом разделены на 8 групп, 8 животных/группа и им делали внутривоковую инъекцию 100 мкл, или цитратного буфера (20мм NaCitrates, 115 мМ хлорида натрия, pH 6,0), или исследуемых соединений в эквивалентной молярной дозе 1,3, 0,4 и 0,13 мг/кг против 1,3 и 0,1 мг/кг соответственно. Через час после приема тестового соединения мышей обезболивали с помощью изофлурана (Butler Schein) и делали 20 мкл внутривоковую инъекцию, или 0,1% БСА (Sigma) контроля, или 15 мкг/мл (0,3 мкг) rh-ИЛ23 (собственное производство), разведенного в физиологическом растворе (Invitrogen), в оба уха. Внутривоковые введения антигенных стимулов повторяли ежедневно в течение 2 дней подряд. Через 24 ч удаляли каждое ухо. Ткани уха гомогенизировали в 1 мл буфера для гомогенизации (HBSS (Gibco) 0,4% Triton X-100 (Sigma) 1X SigmaFast Protease Inhibitor (Sigma)) применяя MP Biomedicals Fast-Prep 24 гомогенизатор. Гомогенизированные образцы центрифугировали при 4°C в течение 10 мин и собирали супернатант. Супернатанты анализировали на наличие мышинных ИЛ17А и ИЛ22, применяя Quantikine® Mouse ИЛ-17 и мышинные ИЛ-22 Immunoassays в соответствии с инструкциями производителя (R&D Systems). Интерполированные значения цитокина пг/мл определяли для каждого образца. Были определены средние уровни пг/мл для каждой обработанной группы, и была рассчитана статистическая значимость по сравнению с контролем, применяя однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Дуннетта. Результаты проиллюстрированы на фиг. 4.

Результаты

Результаты в фиг. 4 показывают, что обработка единственной внутривоковой дозой исследуемого соединения была достаточной для значительного ингибирования высвобождения мышинных ИЛ17 и ИЛ22 в коже под действием двухдневных последовательных внутривоковых инъекций рекомбинантного человеческого ИЛ23.

Пример 13. Ингибирования цитокинового высвобождения, зависящего от экзогенного человеческого ФНО-альфа, у мышей C57/B16

Исследуемые соединения оценивали по их способности ингибировать индуцированное с помощью

ФНО человека высвобождения цитокинов у мышей C57/B16 после экзогенного влияния человеческим ФНО. Секрецию КС и ИЛ-6 в сыворотке измеряли после внутрибрюшного введения человеческого ФНО.

Материалы и способы

Коротко, мыши-самки C57BL/6 (возраст 8-9 недель, Jackson Labs) были случайным образом разделены на 8 групп, 8 животных/группа, и им делали внутрибрюшную инъекцию 200 мкл, или физиологического раствора с фосфатным буфером (Sigma), или исследуемого соединения в эквивалентной молярной дозе 13,3, 4 и 1,3 мг/кг против 10, 3 и 1 мг/кг соответственно.

Через 2 ч после введения дозы тестового соединения, мышей обезболивали с помощью изофлурана (Butler Schein) и делали 200 мкл внутривенную инъекцию, или 0,1% БСА контроля, или 15 мкг/мл (3 мкг) rh-ФНО (R&D Systems), разведенного в солевом растворе (Sigma). Два часа после стимуляции ФНО, мыши были обезболены с помощью изофлурана, цельная кровь была собрана, и тогда мышью забивали с помощью цервикальной дислокации. Цельную кровь центрифугировали при 12,000 об/мин в течение 10 мин и плазму собирали. Плазму анализировали на наличие мышинных КС и ИЛ-6, применяя Multiplex® Mouse КС и мышинный ИЛ-6 Immunoassays в соответствии с инструкциями производителя (MSD). Интерполированные значения цитокина пг/мл определяли для каждого образца. Были определены средние уровни для каждой обработанной группы, и рассчитывали статистическую значимость по сравнению с контролем, применяя однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Дуннетта. Результаты показаны на фиг. X.

Результаты

Результаты на фиг. 5 показывают, что обработкой единственной внутрибрюшной дозой исследуемого соединения удалось значительно ингибировать высвобождение мышинных КС и ИЛ-6 в сыворотке крови, при этом высвобождение индуцировали с помощью внутрибрюшного введения рекомбинантного человеческого ФНО.

Пример 14. Фармакокинетика соединений в яванского макака

Материалы и способы

Исследования с единственной внутривенной дозой (ВВ) для двух пар соединений (Соединение М и Соединение А; Соединение О и Соединение Е) проводились на самцах яванских обезьян (N=3 в каждой группе), которым не вводили биопрепараты, и в соответствии с правилами Институционального комитета по уходу за животными и их использованием. ВВ дозы вводили в количестве 1 мг/кг в виде 10 мин ВВ инфузии. Образцы сыворотки крови собирали перед введением дозы, 1, 4, 8 ч в день введения дозы, и 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 35 и 42 (1008 ч) дней после введения дозы для соединения М и соединения А; и только до 14-го дня для соединения О и соединения Е. Сывороточные концентрации введенных в качестве дозы молекул были измерены с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Образцы для стандартной калибровочной кривой и контроля качества (КК) готовили в 100% сыворотке для каждого исследуемого вещества. Каждая стандартная кривая состояла из семи ненулевых точек, начиная с 10240 нг/мл, которые затем последовательно разбавляли в 3 раза. Также был включен пустой образец (матрица без исследуемого образца). Были подготовлены четыре образца КК в низком, среднем и высоком диапазонах начиная с 2560 нг/мл, которые затем последовательно разбавляли в четыре раза. Образцы для стандартной кривой и КК хранились в замороженном виде до проведения анализа проб, при котором их разводили в 20 раз, чтобы имитировать образцы исследования. Образцы для стандартной кривой и КК были включены в двух повторах при каждой аналитической серии. Нижние и верхние пределы количественного определения были определены как самая низкая и самая высокая точки стандартной кривой для того, чтобы иметь возвратно-рассчитанную концентрацию, которую можно воспроизвести, что не превышает 25 процентов (%) от номинальной концентрации. Критерий принятия для стандартных точек кривой и образцов КК был 25 процентов (%) от номинальной концентрации.

Плашки Nunc-ELISA покрывали 1 мкл обезьяно-адсорбированного козьего антитела к IgG человека (Southern Biotech), в качестве реагента захвата, и инкубировали ночь при 2-8°C. После промывки и блокировки плашек промывочным буфером (0,05% (объем/объем) Tween 20 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ)) и блокирующим буфером (5% бычий сывороточный альбумин (БСА) в ФСБ), стандарт, КК, и неизвестные образцы, разведенные 1:20, 1:400, 1:8000 с 5% сывороткой обезьяны (обезьянья сыворотка от Innovative Research) были добавлены в лунки плашки и инкубированы в течение 1 ч при комнатной температуре. Лунки плашки промывали промывочным буфером и добавляли обезьяний-адсорбированный биотинилированный козьему антителу к IgG человека (Southern Biotech) как вторичный реагент, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Плашки промывали 3 раза и добавляли 100 мкл 1 мкг/мл пероксидаз-конъюгированного стрептавидина на 15 мин при комнатной температуре, после чего следовали дополнительные 3 промывки и добавления 100 мкл 3,3', 5,5'-Тетраметилбензидинового (ТМВ, BioFX) субстрата на 3-4 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали путем добавления 100 мкл стоп-раствора (BioFX) и абсорбцию измеряли устройством считывания плашек Molecular Devices с программным обеспечением SoftmaxPro, версия 5.4.1.

Результаты

Исследования фармакокинетики (ФК) с единственной внутривенной дозой (ВВ) для двух пар со-

единений (Соединение М и Соединение А; Соединение О и Соединение Е) проводились на самцах яванского макака (N=3 на группу), которым до этого ни разу не вводили биопрепараты. Тестовые соединения вводили в количестве 1 мг/кг, в виде 10 мин ВВ инфузии. Образцы сыворотки крови собирали перед введением дозы, 1, 4, 8 ч, в день введения дозы, и 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 35 и 42 (1008 ч) дней после введения дозы для соединения М и соединения А; и только до 14-го дня для соединения О и соединения Е. Концентрации введенных в качестве доз молекул были измерены с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Концентрации в сыворотке крови (среднее и стандартное отклонение) для каждой из молекул представлены в табл. 14.

Таблица 14. концентрации в сыворотке крови (среднее \pm SD (стандартное отклонение), N=3) исследуемых соединений в яванских обезьян

Время (сутки)	Соединение М		Соединение А		Соединение О		Соединение Е	
	Среднее (нМ)	SD (нМ)						
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,042	89,62	26,41	115,60	15,44	96,69	23,15	107,57	10,43
0,167	75,30	17,97	108,03	22,92	92,29	19,75	102,36	4,81
0,333	69,71	9,19	89,15	16,32	65,27	11,53	86,45	10,65
1	54,49	13,94	63,68	6,69	30,10	12,41	52,87	8,85
2	35,17	8,93	49,95	6,04	7,44	3,22	32,51	6,30
3	18,58	6,66	43,51	6,64	4,14	0,70	24,65	6,49
4	13,86	5,61	40,02	8,50	2,76	0,25	19,02	4,84
5	9,55	3,40	43,69	19,63	1,96	0,09	13,98	3,84
7	3,76	1,31	27,84	3,29	1,08	0,21	8,49	3,38
10	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО
14	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО
21	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО				
28	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО				
35	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО				
42	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО				

НПКО: ниже предела количественного определения

НВ: не вычислено, N=1

Фармакокинетические (ФК) параметры исследуемых соединений были рассчитаны с применением программного обеспечения WinNonlin Phoenix 6.1 (Certara, Мэриленд, США), с применением модель-независимого подхода для ВВ инфузионной дозы. Образцы сыворотки, которые показали резкий спад концентрации в любой момент времени после дозирования, и все последующие образцы в том конкретном животном, были исключены из оценки параметров ФК. Дополнительный анализ показал, что причиной этого внезапного падения концентрации после первых нескольких дней было появление антител к соединению для гуманизированных биологических молекул в обезьяне. В ФК анализ были включены данные только первых семи дней, которые были получены от отдельных животных. Графики концентрация-время проиллюстрированы на фиг. 2 и 3 для двух пар исследуемых соединений. Ключевые ФК параметры (среднее \pm SD) для двух пар тестируемых соединений представлены в табл. 15.

Таблица 15. Ключевые ФК параметры (среднее \pm SD, N=3) двух пар исследуемых соединений яванской обезьяны после 1 мг/кг ВВ вливания в течение 10 мин

Идентификатор соединения	АУЦ (нМ/сутки)	КЛ (мл/сутки/кг)	Vss (мл/кг)	T1/2 (сутки)	MRT (сутки)
Соединение М	186 \pm 48,3	28,2 \pm 7,8	62,4 \pm 13,7	1,6 \pm 0,04	2,2 \pm 0,1
Соединение А	592 \pm 68,3	8,5 \pm 1,1	71,5 \pm 8,9	6,2 \pm 0,5	8,4 \pm 1,0
Соединение О	98,0 \pm 14,7	51,8 \pm 7,8	76,1 \pm 30,3	2,3 \pm 0,8	1,4 \pm 0,4
Соединение Е	244 \pm 54,6	21,2 \pm 4,5	65,0 \pm 3,9	2,5 \pm 0,3	3,1 \pm 0,5

Соединение А, исследуемое соединение с мутацией YTE, продемонстрировало 3,3-кратное снижение клиренса (КЛ) и 3,9-кратное увеличение времени полувыведения (T1/2) по сравнению с соответствующими исследуемыми соединениями, которые не содержат мутации YTE (Соединение М). Соединение Е, исследуемое соединение с мутацией YTE, продемонстрировало 2,4-кратное снижение КЛ по сравнению с соответствующими исследуемыми соединениями, которые не содержат мутации YTE (Соединение О).

Пример 15. Предсказания ФК и дозы иллюстративного соединения для человека

Предсказания человеческой ФК:

Предсказания человеческой ФК Соединения Е было сделано с помощью аллометрического масштабирования от ФК параметров, полученных в яванской обезьяны, применяя фактор 2-кратного снижения

клиренса у человека по сравнению с обезьяной при сохранении одинакового объема распределения. Таким образом, прогнозируемый клиренс в организме человека составляет 12,1 мл/сутки/кг с конечным полураспадом в 7,4 суток.

Прогнозирование дозы для человека:

Прогнозирование дозы для человека было сделано на основе обширных данных эффективности экспозиции, полученных из клинических исследований препарата голимумаб в различных популяциях пациентов. Голимумаб (Simponi®) одобрен для лечения ревматоидного артрита (РА), анкилозирующего спондилита (АС), и псориазического артрита (ПА) у пациентов с помощью 50 мг ежемесячных подкожных (ПЖ) доз, и язвенного колита (ЯК) у пациентов с помощью 100 мг ежемесячных ПЖ доз. Simponi® достигает минимального уровня около 3,2 нМ у пациентов с РА (50 мг ежемесячные ПЖ дозы) и 9,7 нМ (100 мг ежемесячные ПЖ дозы) у пациентов с ЯК (Simponi® BLA 2009; Sandborn 2013). Эти данные применяют в качестве ориентиров для терапевтических минимальных уровней для АС и CD соответственно. Минимальные уровни при клинически одобренных дозах Stelara составляют около 6 нМ. На основании наблюдений в три раза выше эффективности соединения Е по сравнению с устекинумаб (Stelara®), для того, чтобы Соединение Е покрыло ИЛ23, значение низких уровней соединения должны составлять ~ 2 нМ. Так как концентрация минимального уровня соединения для покрытия ФНО является большей, чем для покрытия ИЛ23, минимальный уровень соединения равный 9,7 нМ для Simponi® был применен для предсказаний дозы.

Компартментное моделирование данных ФК в яванской обезьяны (2-компартментная модель) с последующим моделированием Монте-Карло с применением 2-кратного снижения масштабирования КЛ, 73% биодоступность, и одновременные изменения клиренса и распределения констант скорости с номинальным КЛ равным 30%, и логарифмическое нормальное распределение показывают, что 54 мг (90% доверительные интервалы 31-90 мг) ПЖ дозы, которые вводили каждые 2 недели, будут поддерживать минимальный уровень соединения на уровне 9,7 нМ.

Пример 16. Очистка соединений

Способы

Соединения очищали с помощью Mab Select SuRe, в качестве стадии аффинной очистки. Промывки с высокой концентрацией соли избегали для того, чтобы предотвратить агрегацию. Элюцию выполняли с применением ацетат-натриевого буфера, pH 3,5. После очистки с помощью Mab Select SuRE, образцы были нейтрализованы, и были применены в отношении гидроксиапатитной смолы первого типа, и элюированы применяя различные концентрации фосфатного буфера. Пик вымывания для мономеров был при ~140 mM NaPhosphate 100 mM NaCl pH 7,0, и пик вымывание для агрегатов был при ~200 mM NaPhosphate 100 mM NaCl pH 7,0. После гидроксиапатита, образец был постоянно >95% мономером.

Исследования с применением скоростной седиментации (СС) с помощью Аналитического Ультра Центрифугирование (АУЦ) применяли для получения информации о чистоте образца и его агрегатных состояниях. Образцы центрифугировали в оптимальных условиях в XL-I (Beckman Coulter, Фуллертон, Калифорния) 20°C с помощью Ap60Ti ротора с четырьмя отверстиями, на скорости 40000 оборотов/мин. Процесс осаждения контролировали с помощью ультрафиолетового поглощения при 280 нм, применяя соответствующий буфер для разведения как референсный буфер. Изменения в распределении концентраций в ячейке ультрацентрифуги регистрировали с ходом времени, используя операционное программное обеспечение XL-I, и анализировали с применением c(S) модели непрерывного распределения в программном обеспечении SEDFIT (версия 14.1), чтобы получить распределение коэффициента седиментации. Процент мономера был рассчитан на основе интегрированной площади пика.

Результаты

Результаты очистки соединений приведены в табл. 16. Данные показывают, что соединения имеют высокую чистоту и однородность, которые указывают на хорошую стабильность.

Таблица 16

Параметр	Соединение А	Соединение Е
Процент мономера (скоростная седиментация)	99,4	99,0

Пример 17. Масс-спектрофотометрический профиль соединений

Способы

Нативные образцы

Эта процедура предоставляет данные относительно интактной массы соединения или белка. 2 мкл образца вводили в колонку Agilent PoroShell 300SB-C8, 5 мкм, (75×1,0 мм). Температура колонки составляла 80°C и скорость потока составляла 50 мкл/мин. Соединение или белок элюировали с колонки с градиентом от 20%В на 0 минуте к 85%В на 10 мин. Подвижная фаза А представляла собой смесь Вода/Ацетонитрил/Муравьиная кислота (99/1/0,1), и подвижная фаза В представляла собой смесь Ацетонитрил/Вода/Муравьиная кислота (95/5/0,1). Сток был направлен в Agilent 6210 TOF масс-спектрометр, который (сток) был просканирован от массы 600 до массы 3200. Сырые данные были восстановлены с помощью программы MassHunter.

Образец с удаленными дисульфидными связями

Эта процедура предоставляет данные относительно массы белка, или легкой цепи и массы тяжелой цепи. 2 мкл 50 мМ ТСЕР (Tris 2-карбокситетил фосфин) добавляли к 10 мкл образца и 10 мкл 8М гуанидина, и инкубировали 15 мин при 37°C. 2 мкл этого образца вводили, как указано выше, но с такими отличиями: температура колонки составляла 60°C, а диапазон масс составлял 600-2000.

Дегликозилированный образец

Эта процедура предоставляет данные относительно дегликозилированной массы белка, или легкой цепи и тяжелой цепи. 10 мкл образца, 10 мкл 200 мМ NH₄HCO₃, 2 мкл 50 мМ ТСЕР и 1 мкл (1:10) PNGase F (или 1 мкл QA дегликозилирующей смеси, если имелось O-связанное гликозилирование) инкубировали в течение 3 ч при 37°C. Инкубацию удлиняли к одной ночи для сильно гликозилированных образцов. Затем добавляли 25 мкл 8М гуанидина и 4 мкл 50 мМ ТСЕР и инкубировали 15 мин при 37°C. Этот образец был введен тем же путем, что и образец с удаленными дисульфидными связями, указанный выше.

Картирование белкового пептида с помощью масс-спектрометрии

25 мкл образца добавляли к 25 мкл 8 М мочевины в 400 мМ бикарбоната аммония. 5 мкл 50 мМ ТСЕР затем добавляли и образец инкубировали в течение 15 мин при 60°C. После охлаждения образца до комнатной температуры, добавляли 5 мкл 150 мМ йодоцетамида, и образец инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. После добавления 40 мкл воды, добавляли 5 мкл трипсина в 1 мМ HCl, чтобы получить конечное соотношение фермент:субстрат 1:50. Пробы инкубировали при 37°C в течение ночи. Тогда 5 мкл вводили в колонку Thermo Purify C18, 100×1,0 мм. Скорость потока составляла 80 мкл/мин. Белок элюировали с колонки с помощью градиента от 0%В на 0 минуте до 40%В на 33 минуте. Подвижная фаза А представляла собой смесь вода/ацетонитрил/муравьиная кислота (99/1/0,1), и подвижная фаза В представляла собой смесь ацетонитрил/вода/муравьиная кислота (95/5/0,1). Сток был направлен в Thermo Orbitrap Velos масс-спектрометр. Первое событие сканирования было в FT (Fourier Transform), и сканирование проводили от массы 300 до массы 2000 с разрешением от 30000. Со второго по седьмое событие сканирования были в IT (ion trap, ионная ловушка), и фрагментировали 6 наиболее интенсивных ионов с первого события сканирования. Пептиды, содержащие гликозилирование, были профилированы ручным выделением, и проценты рассчитывали на основе высоты пиков.

Результаты

Результаты продемонстрированы в табл. 17. Данные, которые обозначают предсказанную аминокислотную последовательность и структуру, были отражены и восстановлены без неожиданной разнородности. Шаблон гликозилирования является типичным для обычных антител, экспрессированных в клетках CHO, и не демонстрирует каких-либо атипичных структур.

Таблица 17

Параметр	Соединение А	Соединение Е
Масс-спектрометрия: Профиль молекулярного веса интактной молекулы	Интактная/Совпадает с последовательностью	Интактная/Совпадает с последовательностью
Масс-спектрометрия: Профиль гликозилирования	Не определено	Аналогичный CHO-экспрессированному IgG

Пример 18. Термическая стабильность соединений

Способы

Отслеживали термическое разворачивания и агрегацию 2 мг/мл растворов соединений в фосфатном буфере от 20 до 110°C при темпе сканирования 60°C/ч с помощью автоматического капиллярного дифференциального сканирующего калориметра (ДСК) (MicroCal, LLC, Бостон). Было выполнено два сканирования с соответствующим буфером для того, чтобы настроить термическую историю прибора и получить базовую линию для каждого образца, при этом среднее этих сканирований вычитается из следующей белковой термограммы для получения настоящей теплоемкости. Нормированные результаты сканирования впоследствии анализировали с помощью Origin 7.0. Базовые линии до начала перехода отнимали для каждой результирующей термограммы теплоемкости для того, чтобы получить результирующую избыточную теплоемкость (Cp, ex) как функцию от температуры. Указанные значения температур перехода (Tm) представляют позиции пиковых максимумов, определенных при визуальном осмотре экспериментальных термограмм.

Результаты

Результаты представлены в табл. 18. Данные показывают, что соединения являются стабильными, и предполагают, что соединения могут сохраняться длительное время.

Таблица 18

Параметр	Соединение А	Соединение Е
Термостабильность (°C)	57,9, 72,1, 82,9	67,6, 83,1

Пример 19. Растворимость соединений

Способы

Образцы соединений постепенно концентрировали к наиболее возможной высокой концентрации,

не наблюдая при этом преципитации, применяя фильтр центрифугирования Amicon Ultra с молекулярной массой отсечения 50000 Дальтон (Millipore, Биллерике). Затем, концентрированные растворы белка анализировали в эксперименте скорости седиментации (СС) с помощью аналитического ультрацентрифугирования (АУЦ) для получения информации по чистоте образца и агрегатным состояниям (см. Пример 16 по очистке, для деталей способа).

Результаты

Результаты продемонстрированы в табл. 19. Данные показывают, что соединения являются растворимыми и стабильно сохраняют высокий процент мономера без подбора состава или добавления вспомогательных веществ.

Таблица 19

Параметр	Соединение А	Соединение Е
Растворимость (концентрация)	48 мг/мл	51 мг/мл
Процент мономера	98,6	97,0

Пример 20. Валентность соединений

Способы

Измерение валентности для образцов соединений в 50 мМ КСl и 10 мМ натрий-ацетатном буфере при рН 5,0 выполняли на инструменте ProteomeLab PA800™ Beckman Coulter (Фуллerton, Калифорния), который оснащен детектором поглощения ультрафиолета (УФ), с рабочей длиной волны равной 214 нм. Систему поддерживали при 20°C и применяли eCap amino-капилляр с внутренним диаметром 50 мкм (Beckman Coulter, номер партии # 477431). Капилляр промывали 100 мМ NaOH, раствором восстановления амина (Beckman Coulter, номер партии # 477433) и рабочим буфером перед впрыском каждого образца. Промежутки времени прохождения образцов измеряли при напряжениях 10 кВ, 14 кВ и 18 кВ. Был применен диметилформамид (ДМФА) (0,005%) (Pierce) как маркер электроосмотического потока (ЭОП). Были получены данные применяя программное обеспечение 32 Karat™ (v7.0). Коэффициент диффузии определяли из эксперимента СС с помощью АУЦ.

Результаты

Данные валентности (см. табл. 20) указывают на коллоидную стабильность соединений в растворе, то есть сетевое взаимодействие белок-белок в растворе. Соединения с валентностью больше чем 15 имеют сильную сеть взаимодействия отталкивания и высокий потенциал для того, чтобы быть приготовленными в высоких концентрациях.

Таблица 20

Параметр	Соединение А	Соединение Е
Валентность, рН 5,0	20,9	24,4

Пример 21. Предсказанная *in silico* иммуногенности

Способы

Иммуногенность белковых лекарственных средств была предсказана *in silico*, применяя вычислительный инструмент EpiMatrix, который был разработан EpiVax, Инк. (Провиденс, Род-Айленд). EpiMatrix включает предсказания Т-хелперного эпитопа, а также эпитопа регуляторных Т-клеток, из которых первый вызывает иммунный ответ, в то время как второй является ингибирующим. Коротко, последовательность белка была сначала разбита на белковые рамки длиной 9 аминокислот, которые, как было доказано, являются ядром связывания белков генов HLA класса II. Потенциал связывания пептидов длиной 9 аминокислот с каждым из восьми распространенных аллелей HLA класса II оценивается на основе экспериментальных данных или вычислительного прогнозирования. Начисляются баллы для отображения потенциала связывания пептидов длиной 9 аминокислот с каждым аллелем HLA, и выполняется нормирование для того, чтобы сделать возможным сравнение связывания любого 9-аминокислотного полипептида с любым из многих аллелей HLA, и прогнозирования иммуногенности в глобальном масштабе. В итоге, программа генерирует общий "бал иммуногенности", tReg Adjusted Epx Score, который вместе с другими детерминантами иммуногенности помогает принять обоснованное решение о вероятности того, что соединения будут вызывать иммунный ответ *in vivo*.

Результаты

Результаты приведены в табл. 21. Общие баллы иммуногенности для этих соединений являются низкими, и предполагают, что эти соединения скорее всего не вызывают сильного иммунного ответа *in vivo*.

Таблица 21

Параметр	Соединение А	Соединение Е
EpiVax	-37,7, -35,6	-31,1, -46,8

Нормирование аллель-специфичных баллов

Пример 22. Стабильность соединений в цельной крови

Способы

Анализ интерференции цельной крови был выполнен на Octet RED96, для того чтобы выявить эффекты неспецифического связывания или нецелевого связывания соединений в присутствии цельной крови (ЦК). Растворы соединений в цельной крови и 1x кинетическом рабочем буфере (1xkb) инкубировали при температуре 37°C в течение 48 ч. Кинетические измерения для инкубированных образцов соединений были выполнены на Octet RED96, оборудованном стрептавидиновым (SA) биосенсорным датчиком (ForteBio, Менло-Парк, Калифорния) при 27°C. Были описаны соотношение скорость ассоциации/сигналы связывания в буфере и цельной крови. Соотношение <2 рассматривалось как такое, что указывает на отсутствие интерференции.

Результаты

Результаты приведены в табл. 22.

Таблица 22

Параметр	Соединение А	Соединение Е
Соотношение сигнала связывания в цельной крови/кинетическом буфере к челФНОа	1,5	1,4
Соотношение сигнала связывания в цельной крови/кинетическом буфере	1,8	1,3

Пример 23. Краткое изложение исследуемых параметров

Сводные данные параметров для определенных соединений приведены в табл. 23 ниже.

Таблица 23

Параметр	Соединение А	Соединение Е
Процент мономера после двух этапов очистки	99,4%	99%
Масс-Спектрометрический Профиль	Интактный	Интактный
pI как определено с помощью IEF (гетерогенность)	~ 8,8	~ 8,8
Термическая стабильность (дифференциальная сканирующая калориметрия)	57,9, 72,1, 82,9	67,6, 83,1
Растворимость	48 мг/мл	51 мг/мл
Валентность при pH 5,0	20,9	24,4
Предсказанная иммуногенность (EpiVax Бал)	-37,69, -35,57	-31,1, -46,8
Стабильность в цельной крови (человеческая ЦК, 48 ч при 37 °C); поддержание связывания с ИЛ23 и ФНОа	Поддерживается	Поддерживается

Последовательности

SEQ ID NO	Последовательность
1	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSS
2	DIQMTQSPSLSASVGRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIK
3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLWVAFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSS
4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK
5	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWVAFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGG

	NYYYYGMDVWGQTTVTSS
6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK
7	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYIYP RDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSGYAWFI YWGQGLTVTVSS
8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIK
9	GGSGGG
10	LGGGSG
11	FNRGES
12	VEPKSS
13	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADVEGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAKVS LSTASSLDYWGQGLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSFNRESASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH

	QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSEVGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
17	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSEVGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLYITREPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
18	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFDQTTHWMRQAPGQGLEWIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSGYAWFIYWGQGLTVTVSSGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
19	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSEVGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSFNRESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLYITREPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW

	QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK
20	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQ SGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
21	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPNGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGNYYYYGMDVWGQTTTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD LYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK
22	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
23	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPNGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGNYYYYGMDVWGQTTTVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK
24	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA

	TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
25	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDLYITREPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
26	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDNAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWVGQTTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
27	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSFNRESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDLYITREPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWV

	AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGGLEWI GYIYPRDDSPKYENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDFAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITYITREPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
31	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD ITYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGGLEWI GYIYPRDDSPKYENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDFAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN

	FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEHKVV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
33	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
34	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADY EHKVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
35	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
36	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEHKVVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

37	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
38	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
39	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
40	EPKSCDKTHTCP
41	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQEQ SVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
42	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKCDKTHTCP PCPAEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
43	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKCDKTHTCP PCPAEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
44	DIQMTQSPSLSASVGRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQ SGVPSRFSGSGTDFLTISSLPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKEIKGGG

	<p>SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFDQTIHWMRQAPGGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
45	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS LSTASSLDYWGQGLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYKHK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
46	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS LSTASSLDYWGQGLTVTVSSFNRESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
47	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQ SGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFDQTIHWMRQAPGGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
48	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG</p>

	IAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
49	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDFAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGTLVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
50	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWA HTRVPSRFSGSGSRDFTLTISSLPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSFNRESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPPSVFLFPPKPKD LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
51	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDFAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGTLVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
52	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDFAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGTLVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD

	HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
53	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
54	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDSDPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
55	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
56	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDSDPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL

	<p>NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG</p>
57	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWVGQTTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKA DYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
58	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGTLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG</p>
59	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWVGQTTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKA DYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
60	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGTLTVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ</p>

	QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
61	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
62	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYFTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSFNRESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
63	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
64	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYFTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSFNRESASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVN HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
65	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR

	HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLWEV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
66	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSFNRESASTKGPSVFPLAPCSRTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV HKPSNTKVDKRVEPKYPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSSEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
67	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLWEV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
68	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLWEV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
69	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI

	GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGQTLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLISKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
70	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWVGQTTTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLRSLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
71	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSRTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGQTLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLISKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
72	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWVGQTTTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYI TREPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLRSLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
73	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSRTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGQTLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN

	FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
74	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPNGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQTTTVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
75	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSRTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
76	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPNGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQTTTVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
77	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSRTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

78	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPNGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWQGTTTVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDLYI TREPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG</p>
79	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGQTLTVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
80	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGQTLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
81	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWQGTTTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
82	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG</p>

	SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPG
83	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWVGQTTTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
84	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVN HKPSNTKVDKRVEPKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKLSLSLG
85	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWVGQTTTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
86	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG

	<p>YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG</p>
87	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
88	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSFNRESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPTE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
89	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
90	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSFNRESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN</p>

	HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
91	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWA HTGVPSRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLTKA DYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
92	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGGGLEWI GYIYPRDSDPKYENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSFNRESASTKGPSVFPLAAPSRSSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVEPKYGPCCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
93	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWA HTGVPSRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLTKA DYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
94	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGGGLEWI GYIYPRDSDPKYENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSFNRESASTKGPSVFPLAAPSRSSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVEPKYGPCCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL

	NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSDSGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
95	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
96	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSDSGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
97	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSDTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
98	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSDSGSFFLYSKL

	TVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG
99	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSRTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
100	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCVSMHEALHNHYTQKSLSLSLG
101	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSRTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
102	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLYI TREPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCVSMHEALHNHYTQKSLSLSLG
103	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA

	TGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGQTLVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
104	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
105	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGQTLVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
106	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
107	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI

	GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAIPDRSG YAWFIYWGGTLVTVSSVEPKSSRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
108	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT KTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPETCVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
109	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA VYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAIPDRSG YAWFIYWGGTLVTVSSVEPKSSRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
110	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVVRQAPGDGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT KTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYI TREPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
111	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA VYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAIPDRSG YAWFIYWGGTLVTVSSVEPKSSRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMF

	YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
112	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSRTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
113	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYGMDVWGQGTTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
114	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQ SGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ GNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
115	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGGLEW VSAITWNSGHIDYADSEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS LSTASSLDYWGQGLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

116	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSTLQ SGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVVYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG
117	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSEVGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVVYCAKVS LSTASSLDYWGQGLVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
118	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSTLQ SGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVVYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG
119	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSEVGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVVYCAKVS LSTASSLDYWGQGLVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
120	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSTLQ SGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG

	SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTDQTIHWMRQAPGGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGTLVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
121	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWA STRHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS YLSASSLDYWGQGLVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
122	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA ASTLQSGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTDQTIHWMRQAPGGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGTLVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
123	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWA STRHTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS YLSASSLDYWGQGLVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
124	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA ASTLQSGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTDQTIHWMRQAPGGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG

	YAWFIYWGGTLVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
125	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSVGRFTISRDNANKSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKVSYS LSTASSLDYWGQTLVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
126	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQ SGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRPAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGTLVTVSSFNREGESASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
127	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSVGRFTISRDNANKSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKVSYS LSTASSLDYWGQTLVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
128	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSVGRFTISRDNANKSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKVSYS LSTASSLDYWGQTLVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSVVTVPSSSLGTQTYICN

	VNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
129	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGTLVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
130	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSEVGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS LSTASSLDYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
131	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGGTLVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
132	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSEVGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS LSTASSLDYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD

	WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
133	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQ SGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
134	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSEVGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS LSTASSLDYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLITREPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
135	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQ SGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
136	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ

	GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
137	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPNGLEWV AFMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRG IAAGGNYYYYGMDVWQGTTVTVSSLLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
138	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSVGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS LSTASSLDYWGQGLTVTVSSFNRESASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
139	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTTHWVRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLTVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
140	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSVGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS LSTASSLDYWGQGLTVTVSSFNRESASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
141	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQ

	SGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
142	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSRTDFLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGG SGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS LSTASSLDYWGQGLVTVSSFNREGESATKGPSVFPLAPCSRTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLG
143	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQ SGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKGGG SGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFDQTIHWMRQAPGQGLEWI GYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSG YAWFIYWGQGLVTVSSVEPKSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
144	MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTLFCLL HFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQA VRSSSRTPSDKPV AHV VANPQAEGL QWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVL LTHISRIVASYQTKVNLSSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYILGGVFQL EKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL
145	MLGSRAVMLLLLLPWT AQGRAVPGGSSPAWTQCQQLSQKCLCTLAWSAH PLVGHMDLREEGDEETNDVPHIQCGDGDPPQGLRDNSQFCLQRIHQGLI FYEKLLGSDIFTGEPSELLPDSVPGQLHASLLGLSLLQPEGHHWETQQIPS LSPSQPWQRLLLRFKILRSLQAFVAVAAARVFAHGAATLSP
146	DYAMH
147	AITWNSGHIDYADSVEG
148	VSYLSTASSLDY
149	RASQGIRNYLA
150	AASTLQS
151	QRYNRAPYT
152	SYAMH
153	FMSYDGSNKKYADSVKG
154	NYYYYGMDV
155	RASQSVYSYLA
156	DASNRAT
157	QQRSNWPPFT
158	DQTIH
159	YIYPRDDSPKYNENFKG
160	PDRSGYAWFIY
161	KASRDVAIAVA
162	WASTRHT
163	HQYSSYPFT

Другие варианты реализации изобретения

Все описанные свойства, раскрытые в данной спецификации, могут быть объединены в любой комбинации. Каждое свойство, раскрытое в данной спецификации, может быть заменено на альтернативное свойство, которое служит той самой, эквивалентной или аналогичной цели. Таким образом, если не указано иначе, каждое свойство раскрывается в данном изобретении только для примера общего ряда эквивалентных или аналогичных свойств.

Из приведенного выше описания специалист в данной области может легко определить существенные характеристики данного раскрытия изобретения, и без отхода от сущности и объема этого изобретения, может выполнить различные изменения и модификации изобретения для того, чтобы адаптировать его к различным применениям и условиям. Таким образом, другие варианты реализации изобретения также находятся в пределах формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, содержащее первый полипептид и второй полипептид, причем:
 - (A) указанный первый полипептид содержит:
 - (i) переменный домен легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), специфический к первому целевому белку;
 - (ii) переменный домен тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), специфический ко второму целевому белку;
 - (iii) шарнирную область, константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и константную область 3 тяжелой цепи (CH3); и
 - (B) указанный второй полипептид содержит:
 - (i) переменный домен легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), специфический к указанному второму целевому белку;
 - (ii) переменный домен тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), специфический к указанному первому целевому белку;
 при этом:
 - (i) указанные VL1 и VH1 объединяются, чтобы сформировать сайт связывания, связывающий указанный первый целевой белок;
 - (ii) указанные VL2 и VH2 объединяются, чтобы сформировать сайт связывания, связывающий указанный второй целевой белок;
 - (iii) указанная константная область 2 тяжелой цепи (CH2) содержит тирозин в позиции 252, треонин в позиции 254 и глутаминовую кислоту в позиции 256, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat; и
 - (iv) указанный первый целевой белок представляет собой ФНО-альфа и указанный второй целевой белок представляет собой ИЛ-23А или указанный первый целевой белок представляет собой ИЛ-23А, и указанный второй целевой белок представляет собой ФНО-альфа, при этом:
 - (i) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 8, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 7, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 6 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3 или 5 или
 - (ii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 6, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3 или 5, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 8 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 7.
2. Соединение по п.1, где указанный первый полипептид дополнительно содержит первый линкер между указанным VL1 и указанным VH2, а указанный второй полипептид дополнительно содержит второй линкер между указанными VL2 и указанным VH1.
3. Соединение по п.2, где указанный первый линкер или указанный второй линкер содержит аминокислотную последовательность GGGSGGG (SEQ ID NO: 9).
4. Соединение по п.2, где указанный первый линкер и указанный второй линкер содержат аминокислотную последовательность GGGSGGG (SEQ ID NO: 9).
5. Соединение по п.1, где указанный первый полипептид дополнительно содержит домен константной области 1 тяжелой цепи (CH1), а указанный второй полипептид дополнительно содержит домен константной области легкой цепи (CL), причем указанный CL и указанный CH1 объединены через дисульфидную связь для того, чтобы сформировать C1 домен.
6. Соединение по п.5, где указанный первый полипептид дополнительно содержит третий линкер между указанным VH2 и указанным CH1, а указанный второй полипептид дополнительно содержит четвертый линкер между указанным VH1 и указанным CL.
7. Соединение по п.6, где указанный третий линкер содержит аминокислотную последовательность FNRGES (SEQ ID NO: 11).
8. Соединение по п.6, где указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность VEPKSS (SEQ ID NO: 12).
9. Соединение по п.6, где указанный третий линкер содержит аминокислотную последовательность FNRGES (SEQ ID NO: 11) и указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последователь-

18. Соединение по п.16 или 17, где указанное соединение содержит два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, при этом каждый из указанных первых полипептидов содержит СН1, СН2 и СН3 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит СL, и при этом СН2 и СН3 одного с первых полипептидов объединяется с СН2 и СН3 другого из первых полипептидов и СН1 каждого из указанных первых полипептидов объединяется с СL одного из указанных вторых полипептидов для того, чтобы сформировать тетравалентную молекулу.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-18.

20. Способ лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, включающий введение соединения по любому из пп.1-18 или фармацевтической композиции, содержащей это соединение, субъекту.

21. Способ по п.20, отличающийся тем, что указанное заболевание является аутоиммунным заболеванием.

22. Применение фармацевтической композиции, содержащей соединение по любому из пп.1-18, в медицине.

23. Применение по п.22, отличающееся тем, что указанное применение предназначено для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания.

24. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую соединение по любому из пп.1-18.

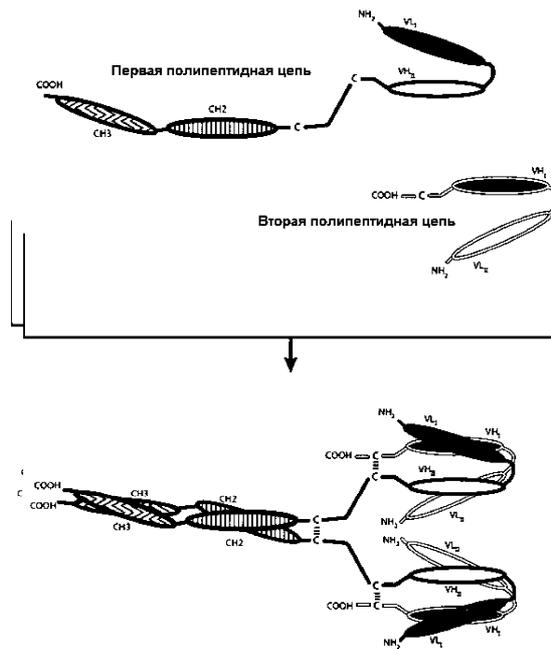
25. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.24.

26. Вектор экспрессии по п.25, дополнительно содержащий промотор, функционально соединенный с указанной нуклеиновой кислотой.

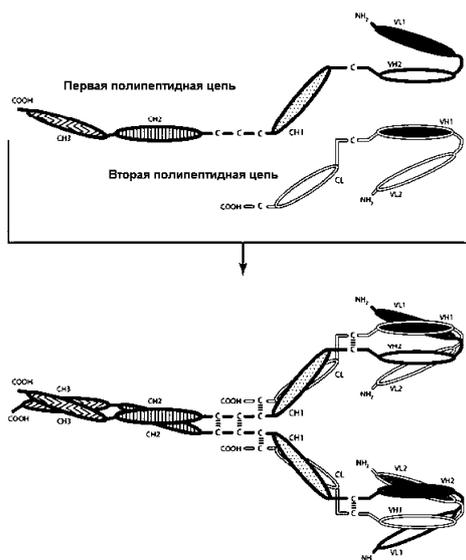
27. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.24 или вектор экспрессии по п.25 или 26.

28. Способ получения соединения по любому из пп.1-18, включающий получение клетки-хозяина по п.27 и экспрессию указанной нуклеиновой кислоты в указанной клетке-хозяине.

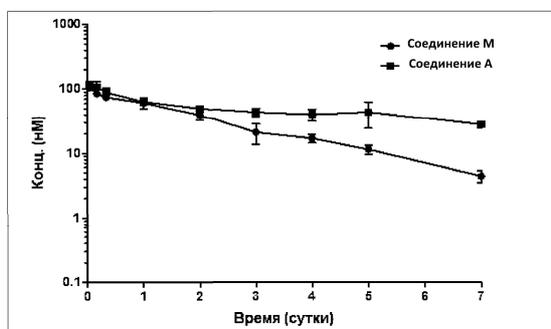
29. Способ по п.28, дополнительно включающий выделение и очистку указанного соединения.



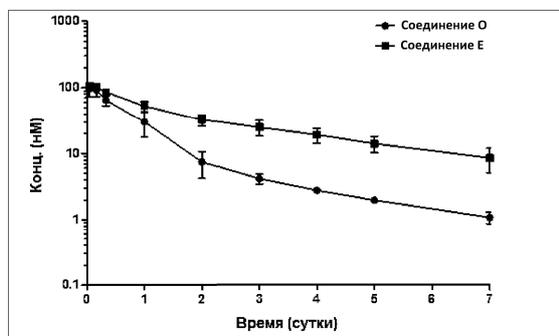
Фиг. 1А



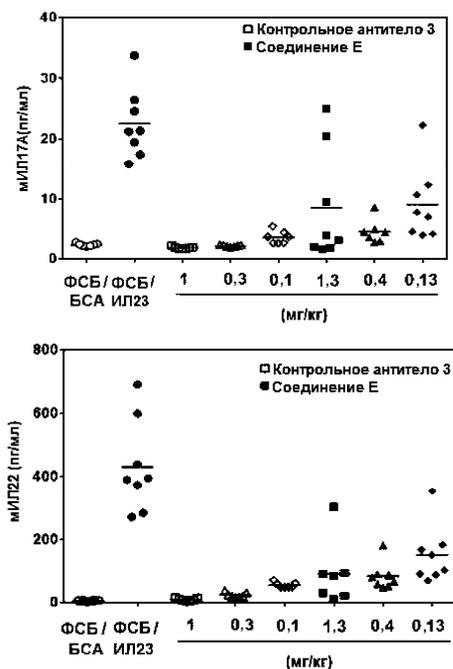
Фиг. 1Б



Фиг. 2



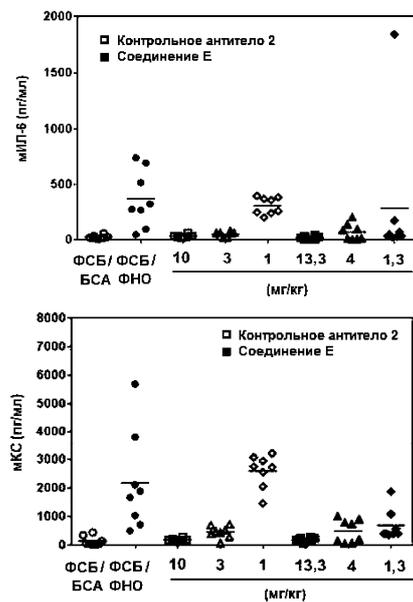
Фиг. 3



Средние уровни сыворотки (нМ + SD) на 49 час после IP дозирования (дозы нормированы по МВ)

Доза (мг/кг)	Контрольное антитело 3	SD	Соединение E	SD
0,1	4	1	3	1
0,3	19	4	16	6
1	62	20	42	6

Фиг. 4



Средние уровни сыворотки (нМ + SD) на 4 час после IP дозирования (дозы нормированы по МВ)

Доза (мг/кг)	Контрольное антитело 2	SD	Соединение E	SD
1	26	8	33	15
3	81	27	229	100
10	1103	296	497	256

Фиг. 5

