

(19) საქართველოს
ინტელექტუალური
საკუთრების
ეროვნული ცენტრი
საქპატენტი



(11) **GE P 2013 5931 B**

(10) AP 2013 12280 A

(51) Int. Cl. (2006)

C 07 K 16/00

C 07 K 16/28

C 07 K 16/46

A 61 K 39/395

A 61 P 35/00

(12) **გამომონებაზე პატენტის აღწერილობა**

(21) AP 2009 12280

(31) IB2008/055664; 61/184,406

(44) 2013 06 25 №12

(85) 2011 07 01

(22) 2009 12 02

(32) 2008 12 02; 2009 06 05

(45) 2013 10 10 №19

(86) PCT/EP 2009/066205, 2009 12 02

(24) 2009 12 02

(33) IB; US

(73) პიერ ფაბრ მედიკამენტ (FR)
45, პლას აბელ განს, 92100 ბულონ-
ბილანკური (FR)

(72) ლილიან გოეთშ (FR);
ტიერი ვურშ (FR)

(74) გიორგი მეიფარიანი

(56) 1. DALL'ACQUA W.F., et al.,
"Modulation of the effector
functions of a human IgG1 through
engineering of its hinge region",
JOURNAL OF IMMUNOLOGY,
AMERICAN ASSOCIATION OF
IMMUNOLOGISTS, US, 2006,
vol. 177, no. 2, pages 1129-1138;
2. WO 2006/116260 (MEDIMUNE
INC (US)), 02.11.2006.

(54) *მონოკლონური ანტისხეულის ანტაგონისტური აქტივობის
მოღუწაციის ხერხი*

(57) მოცემულია IgG1 მონოკლონური ანტისხეულის ანტაგონისტური აქტივობის გაუმჯობესების ხერხი, რომელიც ითვალისწინებს ანტისხეულის სახსრული უბნის რეკონფიგურაციის ეტაპს, რომელიც ხორციელდება სახსრული უბნის ამინომჟავური თანამიმდევრობის მოდიფიკაციის გზით.

მუხლები: 3 დამოუკიდებელი

6 დამოკიდებული

ფიგურა: 17

GE P 2013 5931 B

gamogonebaze patent is aRweri loba

წინამდებარე გამოგონება ეხება ანტისხეულების ინჟინერიის სფეროს და უფრო ზუსტად, ანტისხეულების სკრინინგის და/ან ანტისხეულების აგონისტური/ანტაგონისტური აქტივობის მოდულაციის ხერხს. უფრო ზუსტად, გამოგონება ეხება მონოკლონური ანტისხეულის, ან მისი ორვალენტური ფუნქციური ფრაგმენტის ან მისი წარმოებულის ანტაგონისტური აქტივობის მოდულაციის ხერხს გენეტიკური ინჟინერიის მეშვეობით. გამოგონება ასევე ეხება პოლიპეპტიდებს, რომლებიც გამოსადეგია მოდულაციის ასეთი ხერხისათვის და მიღებული ანტისხეულებისათვის.

ტერმინები “ანტისხეული”, “ანტისხეულები” ან “იმუნოგლობულინი” გამოყენებულია ურთიერთშენაცვლებად ფართო გაგებით და შეიცავს მონოკლონურ ანტისხეულებს (მაგ., სრული სიგრძის ან ინტაქტურ მონოკლონურ ანტისხეულებს), პოლიკლონურ ანტისხეულებს, მრავალვალენტურ ანტისხეულებს ან მრავალსპეციფიკურ ანტისხეულებს (მაგ., ბისპეციფიკურ ანტისხეულებს, რამდენადაც ისინი ამჟღავნებენ საჭირო ბიოლოგიურ აქტივობას).

უფრო ზუსტად, ასეთ მოლეკულას შეესაბამება გლიკოპროტეინი, რომელშიც შედის, სულ მცირე, ორი მძიმე (H) ჯაჭვი და ორი მსუბუქი (L) ჯაჭვი, რომლებიც ურთიერთდაკავშირებულია დისულფიდური ბმებით. თითოეული მძიმე ჯაჭვი შეიცავს მძიმე ჯაჭვის ვარიანტულ უბანს (ან დომენს) (აქ აღინიშნება აბრევიატურით HCVR ან VH) და მძიმე ჯაჭვის მუდმივ უბანს. მძიმე ჯაჭვის მუდმივ უბანში შედის სამი დომენი: CH1, CH2 და CH3. თითოეული მსუბუქი ჯაჭვი შეიცავს მსუბუქი ჯაჭვის ვარიანტულ უბანს (აქ აღინიშნება აბრევიატურით LCVR ან VL) და მსუბუქი ჯაჭვის მუდმივ უბანს. მსუბუქი ჯაჭვის მუდმივ უბანში შედის ერთი დომენი CL. შესაძლებელია VH და VL უბნების დამატებით დაყოფა ჰიპერვარიანტულ ქვეუბნებად, ე.წ. კომპლემენტარულობის განმსაზღვრელ უბნებად (CDR), რომელთა შორის ჩართულია უფრო დაცული, ე.წ. კარკასული უბნები (FR). თითოეული VH და VL შედგება სამი CDR და ოთხი FR უბნისგან, რომლებიც განლაგებულია ამინოჟგუფიანი ბოლოდან კარბოქსიდჟგუფიან ბოლომდე შემდეგი რიგით: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. მძიმე და მსუბუქი

ჯაჭვების ვარიანტული უბნები შეიცავს ბმის (მაკავშირებელ) დომენს, რომელიც ანტიგენთან ურთიერთმოქმედებს. ანტისხეულების მუდმივ უბნებს შეუძლია მედიატორობა გაუწიოს იმუნოგლობულინის ბმას მასპინძელ ქსოვილებთან ან ფაქტორებთან, რომლებშიც იმუნური სისტემის სხვადასხვა უჯრედები (მაგ., ეფექტორული უჯრედები) და კლასიკური კომპლემენტი სისტემის პირველი კომპონენტი (C1q) შედის.

იმუნოგლობულინების მძიმე ჯაჭვები შეიძლება დაიყოს სამ ფუნქციურ უბნად: Fd უბნად, სახსრულ უბნად, Fc უბნად (კრისტალიზებადი ფრაგმენტი). Fd და Fc უბნების მაკავშირებელია დრეკადი სახსრული უბანი. Fd უბანი შედგება VH და CH1 დომენებისაგან და მსუბუქ ჯაჭვთან ერთად ქმნის Fab – ანტიგენ-მბმელ ფრაგმენტს. Fc ფრაგმენტი პასუხისმგებელი არის იმუნოგლობულინის ეფექტორულ ფუნქციებზე, რომლებშიც შედის, მაგალითად, კომპლემენტის ფიქსაცია და ბმა მონათესავე Fc რეცეპტორებთან ეფექტორული უჯრედებისა. იმუნოგლობულინის IgG, IgA და IgD კლასებში აღმოჩენილი სახსრული უბანი მოქმედებს დრეკადი შუასაღების მაგვარად, რაც საშუალებას აძლევს Fab ნაწილს თავისუფლად გადაადგილდეს სივრცეში Fc უბნის მიმართ. მუდმივი უბნების საპირისპიროდ, სახსრული დომენი სტრუქტურულად განსხვავებულია და იცვლება როგორც თანამიმდევრობის, ისე სიგრძის მიხედვით იმუნოგლობულინების კლასებსა და ქვეკლასებს შორის.

კრისტალოგრაფიური გამოკვლევების თანახმად, იმუნოგლობულინის სახსრული უბანი შეიძლება სტრუქტურულად და ფუნქციურად დამატებით დაყოფილ იქნეს სამ ქვეუბნად: ზედა სახსრად, ცენტრალური და ქვედა სახსრად (Shin et al., Immunological Reviews 130:87, 1992). ზედა სახსარში შედის ამინომჟავები CH1-ის კარბოქსილბოლოდან, სახსარში მოძრაობის შემზღუდველ პირველ ნაშთამდე, ძირითადად პირველ ცისტეინის ნაშთამდე, რომელიც ქმნის ორ მძიმე ჯაჭვს შორის ჯაჭვთაშორის დისულფიდურ ბმას. ზედა სახსარის სიგრძეზე არის დამოკიდებული ანტისხეულის სეგმენტური დრეკადობა. ცენტრალური სახსარის უბანი შეიცავს მძიმე ჯაჭვთაშორის დისულფიდურ ხიდებს. ქვედა სახსარის უბანი ესაზღვრება CH2 დომენის ამინო ტერმინალურ ბოლოს და შეიცავს მის ნაშთებს. ადამიანის IgG1-ის ცენტრალური სახსრული უბანი შეიცავს Cys-Pro-Pro-Cys (ცისტეინი-პროლინი-

პროლინი-ცისტეინი) თანამიმდევრობას, რომლის დისულფიდური ბმების ფორმირების საშუალებით დიმერიზაციის შედეგად მიიღება ციკლური ოქტაპეპტიდი, რომელიც მიაჩნიათ, რომ მოქმედებს როგორც ბრუნვის ღერძი და ამრიგად უზრუნველყოფს იმუნოგლობულინის დრეკადობას. კონფორმაციულმა ცვლილებებმა, რომლებიც დაშვებულია იმუნოგლობულინის სახსრული უბნის პოლიპეპტიდური თანამიმდევრობის სტრუქტურისა და დრეკადობის გამო, შეიძლება რომ გავლენა მოახდინონ ანტისხეულის Fc ნაწილის ეფექტორულ ფუნქციებზე.

ზოგადად, თავის წარმომავლობის მონოკლონური ანტისხეულების ან მათი ფუნქციური ფრაგმენტების დასამზადებლად შეიძლება მივმართოთ ტექნიკას, კერძოდ, რომელიც აღწერილია სახელმძღვანელოში “ანტისხეულები” (Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) ან ჰიბრიდომებიდან დამზადების ტექნიკას, რომელიც აღწერილია Kohler-ის და Milstein-ის მიერ (*Nature*, 256:495-497, 1975). ამის შემდეგ, შესაძლებელია, მაგალითად, მონოკლონური ანტისხეულების გასუფთავება აფინური ქრომატოგრაფიის სვეტში, რომელშიც წინასწარ არის იმობილიზებული აღნიშნული მონოკლონური ანტისხეულების მიერ სპეციფიკურად ამოცნობილი ეპიტოპის შემცველი საინტერესო რეცეპტორი ან მისი ერთ-ერთი ფრაგმენტი. უფრო ზუსტად, მონოკლონური ანტისხეულები შეიძლება გასუფთავებულ იქნეს ქრომატოგრაფიით პროტეინ A-ზე და/ან G-ზე, რასაც შეიძლება მოსდევდეს ან არ მოსდევდეს იონური-მიმოცვლის ქრომატოგრაფია, რომლის მიზანია ნარჩენი პროტეინებით, ასევე μ m და LPS-ით დაბინძურების გამორიცხვა. ამას თავისთავად მოჰყვება ან არ მოჰყვება ელიმინაციური ქრომატოგრაფია Sepharose გელზე, რათა გამორიცხულ იქნეს დიმერების ან სხვა მულტიმერების თანამყოფობით განპირობებული პოტენციალური აგრეგატები. უფრო უპირატესად, მთელი ეს ტექნიკა შეიძლება გამოყენებულ იქნეს ერთდროულად ან თანამიმდევრობით.

მოცემული გამოგონების მიხედვით, ანტისხეულის ფუნქციური ფრაგმენტი, არის ანტისხეულის ფრაგმენტები, როგორიცაა Fv, scFv (sc აღნიშნავს ერთ ჯაჭვიანს), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc ფრაგმენტები ანუ დიმერები, ან ნებისმიერი ფრაგმენტი, რომლის სიცოცხლის ხანგრძლივობის ნახევარპერიოდი გაზრდილ იქნა ქიმიური მოდიფიკაციის შედეგად,

როგორიცაა პოლი(ალკილენ)გლიკოლის, მაგალითად, პოლი(ეთილენ)გლიკოლის დამატება (“PEGილირება”) (პეგილირებულ ფრაგმენტებს აღნიშნავენ Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG ან Fab'-PEG) (“PEG” პოლი(ეთილენ)გლიკოლის აღსანიშნავად), ან აღნიშნული ფრაგმენტების, რომლებსაც გააჩნია, საწყისი ანტისხეულის მახასიათებელი CDR-ებიდან, სულ მცირე, ერთი მაინც, ლიპოსომში ჩადგმის შედეგად.

უპირატესად, ეს ფუნქციური ფრაგმენტები არის Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc ტიპის ანუ დიმერები, რომლებსაც ძირითადად ბმის იგივე სპეციფიკურობა გააჩნია, რაც იმ ანტისხეულს, რომლისგანაც ისინი წარმოიშვა. მოცემული გამოგონების მიხედვით, გამოგონებით მოცემული ფრაგმენტების მიღება შესაძლებელია ზემოაღწერილი ანტისხეულების ენზიმებით, როგორიცაა პეპსინი ან პაპაინი, დამუშავების მეთოდით და/ან დისულფიდური ხიდების გახლეჩით ქიმიური აღდგენის საშუალებით. გამოგონებაში შემავალი ანტისხეულის ფრაგმენტების სხვაგვარად მიღება შესაძლებელია გენეტიკური რეკომბინაციის მსგავსი მეთოდების გამოყენებით, რომლებიც კარგად არის ცნობილი დარგის სპეციალისტებისათვის, ან პეპტიდების სინთეზის საშუალებით, მაგალითად, პეპტიდის ავტომატური სინთეზატორების საშუალებით, რომლების მოწოდება ხდება კომპანიის Applera-ს მიერ.

ტერმინი “ანტაგონისტი” აქ აღნიშნავს მოლეკულას, რომელსაც გააჩნია სამიზნე მოლეკულის ერთი ან მეტი ბიოლოგიური აქტივობის ინჰიბირების უნარი, როგორიცაა უჯრედგარე ან ტრანსმემბრანული რეცეპტორი. ანტაგონისტებს შეუძლიათ იმოქმედონ ლიგანდთან რეცეპტორის ბმის ხელისშეშლის საშუალებით და პირიქით, რეცეპტორის ფოსფორილების დაქვეითების საშუალებით და/ან ლიგანდით აქტივირებული მკველელი უჯრედების გაუვნებელოფით. ანტაგონისტს შეუძლია მთლიანად დაბლოკოს რეცეპტორ-ლიგანდის ურთიერთქმედებები ან არსებითად შეასუსტოს ასეთი ურთიერთქმედებები კონკურენციის, კონფორმაციის ცვლილების ან ქვემოთკენ რეგულირების საშუალებით. ანტაგონისტის ინტერვენციის ყველა ეს სახეობა მოცემული გამოგონების მიზნებისათვის ეკვივალენტურებად უნდა იქნეს განხილული.

ტერმინი “აგონისტი” აქ გამოყენებულია აღსანიშნავად ნებისმიერი ნაერთის, პროტეინის, პოლიპეპტიდის, პეპტიდის, ანტისხეულის, ანტისხეულის

ფრაგმენტის, კონიუგატის, დიდი მოლეკულის, მცირე ზომის მოლეკულის, რომლებსაც გააჩნია სამიზნე მოლეკულის ერთი ან მეტი ბიოლოგიური აქტივობის აქტივაციის უნარი.

თერაპიული ანტისხეულების კვლევებში ხშირად გულისხმობენ, შეძლებისდაგვარად, ანტაგონისტური ანტისხეულების მიღებას.

ანტაგონისტი ანტისხეულების კლასიკური მაგალითებია Herceptin, Pertuzumab, Cetuximab, ანტი-VEGFR ან ანტი-IGF-1R ანტისხეულები.

განსაკუთრებულ ნიმუშად შეიძლება აღნიშნულ იქნეს ანტი-cMet 5D5 ანტისხეული, წარმოქმნილი Genentech-ის [WO 96/38557] მიერ, რომელიც სხვადასხვა მოდელებში ცალკე დამატებისას იქცევა როგორც ძლიერი აგონისტი. ამ ტექნიკური პრობლემის მოსაგვარებლად საჭირო გახდა გენური ინჟინერიის საშუალებით ამ ანტისხეულის Fab ფრაგმენტად ანუ მონოკლენტურ ანტისხეულად (ერთ-მხარიან 5D5-ად) გადაქცევა იმისათვის, რომ მას ანტაგონისტური აქტივობის უნარი შეეძინა. ამის შედეგად, ასეთი ანტისხეული არ შეიძლება განხილულ იქნეს როგორც ანტისხეული, არამედ ითვლება ფრაგმენტად და არ ავლენს “სრული ანტისხეულის” ფორმატისათვის დამახასიათებელ ყველა უპირატესობას (არავითარი ეფექტორული ფუნქციები, შემცირებული კლირენსი და არსებობის ნახევარპერიოდი [2-ჯერ უფრო მცირე, ვიდრე აქვთ ტრადიციულ ორვალენტური ანტისხეულებს, როგორც აღწერილი იყო Poster 411-ში მე20 EORTC-NCI-AACR სიმპოზიუმზე, ქენევა, ოქტომბერი 21-24, 2008]).

დარგის სპეციალისტებისათვის ცნობილია, რომ ეფექტორულ ფუნქციებში შედის, მაგალითად, C1q ბმა; კომპლემენტდამოკიდებული ციტოტოქსიკურობა; Fc რეცეპტორის ბმა; ანტისხეულზე-დამოკიდებული უჯრედ-მედიატორობით განხორციელებული ციტოტოქსიკურობა (ADCC); ფაგოციტოზი; და უჯრედის ზედაპირის რეცეპტორების (მაგ., B უჯრედის რეცეპტორის; BCR) ქვემოთკენ რეგულირება და არსებობის ნახევარპერიოდის გახანგრძლივება გადარჩენის რეცეპტორის მაკავშირებელი ლიგანდის (FcRn) ჩართვით, როგორც აღწერილია, მაგალითად, U.S. Patent No. 5,739,277-ში, გაცემულს 1998 წლის 14 აპრილს.

მოცემული გამოგონების, ერთ-ერთი ასპექტია ასეთი ტექნიკური პრობლემის გადაჭრა, ე.ი. ანტისხეულის ანტაგონისტური აქტივობის გაუმჯობესება, “სრული ორვალენტიანი” ფორმატის შენარჩუნებით.

უნდა აღნიშნულ იქნეს აქ, რომ გამოგონების გამოყენება შესაძლებელია “ჰუმანური თავგების” (გენეტიკურად მოდიფიცირებული თავგები, რომლების საშუალებითაც იწარმოება ადამიანის იმუნოგლობულინები) იმუნიზაციის მოცემული გამოგონების შედეგად მიღებული ადამიანის ანტისხეულების აგონისტური/ანტაგონისტური აქტივობის მოდულირებისათვის ან ფაგების დისპლეი-ტექნიკის გამოყენებით სრული ანტისხეულების აგებისათვის, არჩეული scFv, Fab ან ნებისმიერი სხვა, ეკვივალენტური ფრაგმენტებიდან.

სხვა კლასიკური ტექნიკური პრობლემა შეიძლება შეგვხვდეს თავის ანტისხეულის ქიმერიზაციის და/ან ჰუმანიზაციის პროცესში. დარგის სპეციალისტებისათვის კარგად არის ცნობილი, რომ თუ თავის ანტისხეულის ქიმერიზაციის და/ან ჰუმანიზაციის პროცესი სავსებით იოლია თეორიულად, ადვილი არ არის თავის ასეთი ანტისხეულის ქიმერიზაციის და/ან ჰუმანიზაციის წარმართვა ყველა საწყისი თავისებურების ან ნაწილის დაკარგვის გარეშე. ქიმერულმა ან ჰუმანიზებულმა ანტისხეულმა შესაძლოა დაკარგოს მისი ADCC, CDC, ანტაგონისტურ/აგონისტური, ბმის, (TBC) ... აქტივობები. მოცემული გამოგონებისათვის განსაკუთრებულ ინტერესს წარმოადგენს თავის ანტისხეულის აგონისტური/ანტაგონისტური აქტივობის მოდიფიკაცია ქიმერიზაციის და/ან ჰუმანიზაციის პროცესის შემდეგ.

განსაკუთრებულ ნიმუშად შეიძლება მოყვანილ იქნეს ანტი-c-Met ანტისხეულების ნაკრები, რომლებიც ამის შემდეგ აღწერილი იქნება როგორც 224G11, 2274H1 და 11E1, რომლებიც ძლიერი ანტაგონისტური თვისების თავის ანტისხეულები იყო და ნაწილობრივი აგონისტები გახდა ადამიანის IgG1 ფორმატზე ქიმერიზაციის შემდეგ. ძლიერი ანტაგონისტებიდან ნაწილობრივი აგონისტებისაკენ ეს წანაცვლება გამოიხატა *in vivo* აქტივობის სრულ დაკარგვაში ქსენოტრანსპლანტანტურ მოდელებში.

მოცემული გამოგონების მიზანია ამ პრობლემების გადაჭრა და იგი განსაკუთრებით ეხება სპეციფიკური სამიზნე მოლეკულის წინააღმდეგ მიმართული მონოკლონური ანტისხეულის, ან მისი ორვალენტიანი ფუნქციური ფრაგმენტის ან წარმოებულის ანტაგონისტური აქტივობის გაუმჯობესების პროცესს, ამასთან აღნიშნულ ანტისხეულს გააჩნია აღნიშნული სამიზნე

მოლეკულის ერთი ან მეტი ბიოლოგიური აქტივობის ინჰიბირების უნარი, ხოლო აღნიშნულ პროცესში შედის ანტისეხულის სახსრული უბნის რეკონფიგურაციის ეტაპი, რომელიც შეიცავს აღნიშნული სახსრული უბნის ამინომჟავების თანამიმდევრობის მოდიფიკაციას, სულ მცირე, ერთი მაინც ამინომჟავას დელეციის, დამატების ან ჩანაცვლების საშუალებით.

ნათელია, რომ გამოთქმა “ანტაგონისტური აქტივობის გაუმჯობესება” უნდა ინტერპრეტირებულ იქნეს ყველაზე ფართო გაგებით, ე.ი. როგორც სასურველი შედეგის მიღება. მექანიკურად, ასეთი შედეგის მიღება შესაძლებელია ანტისეხულის დამახასიათებელი ანტაგონისტური აქტივობის გაუმჯობესების და/ან არსებული აგონისტური აქტივობის შემცირების საშუალებით.

უფრო ზუსტად, ტერმინების ძირითადი განსაზღვრებები რაოდენობრივ ფარმაკოლოგიაში დაფუძნებულია განახლებულ რეკომენდაციებზე, რომლებიც მოცემულია International Union of Pharmacology (IUPHAR) Committee on receptor Nomenclature (იხილეთ Neubig et al., 2003)-ში.

ტერმინი “აგონისტი” აღნიშნავს ლიგანდს (ნებისმიერი ტიპის მოლეკულას), რომელიც ბმაში შედის რეცეპტორთან და ცვლის რეცეპტორის მდგომარეობას, რაც გამოიხატება მის სტიმულატორულ ან გაზრდილ ბიოლოგიურ რეაქციაში. აგონისტებს შეუძლიათ სრული აგონისტებივით ან ნაწილობრივი აგონისტებივით მოქმედება:

- სრული აგონისტი: როდესაც აგონისტის მიერ ინდუცირებული რეცეპტორის გაღიზიანება აღწევს სისტემისათვის დამახასიათებელი რეაქციის უნარის მაქსიმუმს, მაშინ მიიღება სისტემის მაქსიმალური რეაქცია და აგონისტი არის სრული აგონისტი ამ სისტემაში. რამოდენიმე აგონისტმა შესაძლებელია რომ გამოამჟღავნოს ერთნაირი მაქსიმალური რეაქცია, მაშინ ისინი ყველა არის სრული აგონისტი ამ ექსპერიმენტულ სისტემაში.

- ნაწილობრივი აგონისტი: არის მოლეკულა, რომელიც მოცემულ ქსოვილში, სპეციფიკურ პირობებში, ვერ ამჟღავნებს დიდ ზეგავლენას (იმ შემთხვევაშიც კი, როდესაც გამოყენებულია ისეთი მაღალი კონცენტრაციით, რომ ყველა რეცეპტორი უნდა იყოს დაკავებული), როგორიც შეუძლია გამოავლინოს იგივე სისტემაში იმავე რეცეპტორების საშუალებით მოქმედმა სრულმა აგონისტმა. ნაწილობრივი აგონისტები, ძირითადად, ნაწილობრივი ანტაგონისტებიც არიან, ვინაიდან სრული აგონისტის თანამყოფობისას ისინი

ამცირებენ აღნიშნული სრული აგონისტის მაქსიმალურ რეაქციას საკუთარ მაქსიმალურ რეაქციამდე. სრული და ნაწილობრივი აგონისტის ეს განსაზღვრა სისტემა-დამოკიდებულია და ერთ სისტემაში ან ერთი გაზომვის დროს სრული აგონისტი შეიძლება ნაწილობრივი აგონისტი იყოს სხვა სისტემაში.

ტერმინი “ანტაგონისტი” აღნიშნავს მოლეკულას, რომელიც ასუსტებს სხვა სამკურნალო საშუალების, ძირითადად აგონისტის, მოქმედებას. მრავალი ანტაგონისტი იმავე რეცეპტორის მაკრომოლეკულაზე მოქმედებს, რაც აგონისტი.

- ანტაგონიზმის ეფექტურობა შეიძლება რომ იყოს სრული იქ, სადაც სისტემის რეაქცია ანტაგონისტისა და აგონისტის თანამყოფობისას შეესაბამება ამ სისტემის ბაზალურ (ნებისმიერი ლიგანდის გარეშე) აქტივობას.

- ანტაგონისტი შეიძლება მოქმედებდეს როგორც ნაწილობრივი ანტაგონისტი, როდესაც მაქსიმალური ინჰიბირება (იმ შემთხვევაშიც კი, როდესაც გამოყენებულია ისეთი მაღალი კონცენტრაციით, რომ ყველა რეცეპტორი უნდა იყოს დაკავებული ამ ანტაგონისტით), გამომჟღავნებული ანტაგონისტისა და აგონისტის თანამყოფობის საშუალებით, სისტემის ბაზალურ აქტივობაზე მეტია.

- ანტაგონიზმი შეიძლება იყოს კონკურენტული, როდესაც აგონისტისა და ანტაგონისტის ბმა ურთიერთგამომრიცხავია. ეს შეიძლება მოხდეს იმის გამო, რომ აგონისტი და ანტაგონისტი კონკურირებს ერთი და იგივე ადგილისათვის ან გაერთიანებულად ერთმანეთის გადამფარავ მომიჯნავე ადგილებისათვის. მესამე შესაძლებლობა იმაში მდგომარეობს, რომ ჩართული არის ბმის სხვადასხვა ადგილები, მაგრამ ისინი ისე მოქმედებს რეცეპტორის მაკრომოლეკულაზე, რომ აგონისტ და ანტაგონისტ მოლეკულებს არ შეუძლიათ ერთი და იმავე დროს ბმა.

არაკონკურენტულ ანტაგონიზმს ადგილი აქვს, როდესაც აგონისტს და ანტაგონისტს შეუძლიათ რეცეპტორთან ერთდროულად ბმა; ანტაგონისტის ბმა ამცირებს ან ხელს უშლის აგონისტის მოქმედებას აგონისტის ბმაზე რაიმე გავლენით ან მის გარეშე.

დედუციის, დამატების ან ჩანაცვლების განხორციელება შესაძლებელია კლასიკურად, დარგის სპეციალისტისათვის ცნობილი ნებისმიერი ხერხით.

დარგის სპეციალისტებმა მოცემულ dnm-ის თანამიმდევრობაში დამატებების, დელეციებისა და ინსერციების წარმოსაქმნელად შეიძლება რომ გამოიყენონ რამოდენიმე მეთოდი. შეზღუდვების გარეშე, შეიძლება აღინიშნოს dnm-ის ნაწილობრივი დამუშავება პანკრეატული dnmse I-ით, dnm-ის ნაწილობრივი დამუშავება რესტრიქციის ენზიმებით, ლინკერ-დაფუძნებული ჩართვების მუტანტები, დელეციების ჩართული სიმრავლის მუტანტები BAL31 ნუკლეაზას, dnmse I ან ეკზონუკლეაზა III გამოყენებით. ეს მეთოდები ყოველმხრივ არის აღწერილი ლაბორატორიულ სახელმძღვანელოებში, როგორიცაა Molecular Cloning, A Laboratory manual (Sambrook, Fritsch and Maniatis). dnm მოლეკულაში დელეციების, ინსერციების ან ადგილზე-მიმართული მუტაგენზის განხორციელებისათვის ასევე შეიძლება გამოყენებულ იქნეს PCR-დაფუძნებული მეთოდები, როგორიცაა გადაფარვა-გაფართოებული PCR (Wurch et al., 1998), და ეს მეთოდები ამით არ შემოიფარგლება. ადგილზე მიმართული მუტაგენზის განხორციელებისათვის შესაძლებელია რამოდენიმე სხვა ხერხის გამოყენებაც, მაგალითისათვის და არა შეზღუდვის მიზნით, შეიძლება დასახელებულ იქნეს ოლიგონუკლეოტიდ-დაფუძნებული მუტაგენზი, რომელიც ეფუძნება ერთ- ან ორმაგი-პრაიმერის მეთოდებს, Kunkel-ის მეთოდი, რომელიც დაფუძნებულია ურაცილის ჩართვაზე (Kunkel, 1985). ეს მეთოდები დეტალურად არის აღწერილი ლაბორატორიულ სახელმძღვანელოებში, როგორიცაა Molecular Cloning, A Laboratory manual (Sambrook, Fritsch and Maniatis).

დამატების არაშემზღუდველ მაგალითად შეიძლება დასახელებულ იქნეს პროლინის დამატება სახსრულ უბანში ან მის მიმდებარედ.

გამოგონებით მოცემული პროცესის უპირატესი განხორციელების ნიმუშში აღნიშნული მოდიფიკაცია არჩეულია:

- i) აღნიშნული სახსრული უბნის ამინომჟავების თანამიმდევრობის, სულ მცირე, ერთი მაინც ამინომჟავას დელეციიდან; და/ან
- ii) აღნიშნულ სახსრულ უბანში, სულ მცირე, ერთი მაინც დისულფიდური ხიდის დამატებიდან.

გამოგონების ნათლად განმარტების მიზნით, პირველ რიგში დეტალიზებული იქნება პირველი ასპექტი (i), ხოლო შემდეგ მეორე (ii) ასპექტი. გასაგები უნდა იყოს, რომ ასეთი რიგითობა მხოლოდ ფორმალურია

და ორივე ეს ასპექტი ერთნაირი მნიშვნელობისაა, რაც ცხადი გახდება ამის შემდეგ.

განსაკუთრებულ განხორციელების ნიმუშში სახსრული უბნის ამინომჟავების თანამიმდევრობის მოდიფიცირების გზა მდგომარეობს აღნიშნული სახსრული უბნის ამინომჟავების თანამიმდევრობის, არა უმეტეს, ვიდრე 2, 3 ან 4 ამინომჟავას დელეციაში.

გამოგონების განსაკუთრებული ასპექტი იმაში მდგომარეობს, რომ აღნიშნული მონოკლონური ანტისხეული ორვალენტიანი ანტისხეულია. რეალურად, როგორც ქვემოთ იქნება ნაჩვენები, შესაძლებელია ანტისხეულის აგონისტური/ანტაგონისტური აქტივობის მოდულაცია აღნიშნული ანტისხეულის სტრუქტურის მოდულაციის საშუალებით. ჯერ გადმოცემული იქნება ასეთი აგონისტური/ანტაგონისტური აქტივობის მოდულაციის ორიგინალური გზა ანტისხეულის ორვალენტიანი ფორმის იმავდროული შენარჩუნებით, რისი მიზანია ისეთი სასარგებლო თვისებების შენარჩუნება, როგორიცაა არსებობის ხანგრძლივობის დიდი ნახევარპერიოდი ან ეფექტორული ფუნქციები.

აქ შეიძლება ასევე აღნიშნულ იქნეს, რომ იმ შემთხვევაში, თუ დარგში უკვე მოხსენიებული იყო ეფექტორული ფუნქციების გაზრდის მიზნით სახსრული უბნის მოდიფიკაციის შესახებ, პირიქით, მონოკლონური ანტისხეულის აგონისტური/ანტაგონისტური აქტივობის მოდულაციის მიზნით სახსრული უბნის მოდიფიკაციის შესახებ არსად არასდროს არ ყოფილა მოხსენიებული. ეს აშკარად მოცემული გამოგონების საგანია, რომელიც სრულიად ახალია დარგში.

გამოგონებით მოცემული პროცესის ერთი ასპექტის მიხედვით, მონოკლონური ანტისხეული არის ქიმერული ანტისხეული.

“ქიმერული” ანტისხეული ისეთი ანტისხეულია, რომელიც შეიცავს მოცემული სახეობის ანტისხეულიდან მიღებულ ბუნებრივ ვარიანტულ (მსუბუქი ჯაჭვი და მძიმე ჯაჭვი) უბანს, აღნიშნული მოცემული სახეობის ჰეტეროლოგიური სახეობის (მაგ., თაგვის, ცხენის, ბოცვერის, ძაღლის, ძროხის, წიწილის და ა.შ.) მსუბუქი და მძიმე ჯაჭვის მუდმივ უბნებთან კომბინაციაში.

გამოგონების მიხედვით ქიმერული ტიპის ანტისხეულების ან მათი ფრაგმენტების დამზადება შესაძლებელია გენეტიკური რეკომბინაციის

ტექნიკის გამოყენებით. მაგალითად, ქიმერული ანტისხეული შეიძლება წარმოებულ იქნეს რეკომბინანტული dnm-ის კლონირებით, რომელიც შეიცავს პრომოტორს და თანამიმდევრობას, რომლითაც კოდირებულია გამოგონებით მოცემული არაჰუმანური, კერძოდ, თაგვის მონოკლონური ანტისხეულის ვარიანტული უბანი, და თანამიმდევრობას, რომლითაც კოდირებულია ადამიანის ანტისხეულის მუდმივი უბანი. ასეთი რეკომბინანტული გენით კოდირებული გამოგონებით მოცემული ქიმერული ანტისხეული იქნება, მაგალითად, თაგვი-ადამიანის ქიმერა და ამ ანტისხეულის სპეციფიკურობა განისაზღვრება თაგვის dnm-იდან მიღებული ვარიანტული უბნით, ხოლო მისი იზოტიპი განისაზღვრება ადამიანის dnm-იდან მიღებული მუდმივი უბნით. რაც შეეხება ქიმერული ანტისხეულების დამზადების მეთოდებს, ამისათვის შეიძლება მივმართოთ დოკუმენტებს Verhoeyn et al. (BioEssays, 8:74, 1988), Morrison et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6851-6855, 1984) ან US Patent No. 4,816,567.

გამოგონებით მოცემული პროცესის მეორე ასპექტის მიხედვით, მონოკლონური ანტისხეული არის ჰუმანიზებული ანტისხეული.

“ჰუმანიზებული ანტისხეული” ისეთი ანტისხეულია, რომელიც შეიცავს CDR უბნებს, მიღებულს არაჰუმანური წარმომავლობის ანტისხეულიდან, ხოლო ანტისხეულის მოლეკულის სხვა ნაწილები წარმოებულია ერთი (ან რამოდენიმე) ადამიანის ანტისხეულებიდან ან ჩანასახის ხაზის თანამიმდევრობებიდან. გარდა ამისა, შესაძლებელია ანტისხეულის ჩონჩხის სეგმენტების (ე.წ. FR) ზოგიერთი ნაშთის მოდიფიცირება, რათა შენახულ იქნეს ბმის აფინურობა (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988).

გამოგონების მიხედვით ჰუმანიზებული ანტისხეულების ან მათი ფრაგმენტების დამზადება შესაძლებელია დარგის სპეციალისტებისათვის ცნობილი ხერხებით (როგორიცაა, მაგალითად, აღწერილი დოკუმენტებში Singer et al., J. Immun. 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992; ან Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992).

ჰუმანიზაციის სხვა მეთოდი, რომელიც ცნობილია დარგის სპეციალისტებისათვის, არის “CDR დამცნობის” მეთოდი, რომელიც აღწერილია Protein Design Lab (PDL) მიერ, პატენტის განაცხადებში EP 0 451 216,

EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 ან US 5,530,101, US 6,180,370, US 5,585,089 და US 5,693,761. შეიძლება ასევე აღინიშნოს მომდევნო პატენტის გამნაცხადებიც: US 5,639,641; US 6,054,297; US 5,886,152 და US 5,877,293.

გამოგონებით მოცემული პროცესის კიდევ სხვა ასპექტის მიხედვით, მონოკლონური ანტისხეული არის ადამიანის ანტისხეული.

ტერმინში “ადამიანის ანტისხეული” შედის ყველა ანტისხეული, რომელსაც გააჩნია ერთი ან მეტი ვარიანტული და მუდმივი უბანი, რომელიც წარმოებულია ადამიანის იმუნოგლობულინის თანამიმდევრობებიდან. გამოგონების უპირატესი განხორციელების ნიმუშში ყველა ვარიანტული და მუდმივი დომენები (ან უბნები) წარმოებულია ადამიანის იმუნოგლობულინის თანამიმდევრობიდან (ადამიანის სრული ანტისხეული). სხვა სიტყვებით რომ ვთქვათ, მასში შედის ყველა ანტისხეული, რომელსაც გააჩნია ვარიანტული და მუდმივი უბნები (თუ გააჩნია), რომლებიც ნაწარმოებია ადამიანის ჩანასახის ხაზის იმუნოგლობულინის თანამიმდევრობებიდან, ე.ი. რომელსაც გააჩნია თანამიმდევრობა, შესაბამისი ადამიანის მიერ ნაწარმოები ანტისხეულის ამინომჟავების თანამიმდევრობისა და/ან დამზადებულია დარგის სპეციალისტებისათვის ცნობილი ადამიანის ანტისხეულების დამზადების ნებისმიერი ტექნიკის გამოყენებით.

ერთ-ერთ განხორციელების მაგალითში ადამიანის მონოკლონური ანტისხეულები ნაწარმოებია ჰიბრიდომას საშუალებით, რომელიც შეიცავს B უჯრედს, მიღებულს ტრანსგენული ცხოველისაგან, გარდა ადამიანისა, მაგალითად, ტრანსგენული თაგვისაგან, რომელსაც გააჩნია გაუკვდავებულ უჯრედთან შერწყმული ადამიანის მძიმე ჯაჭვის ტრანსგენი და მსუბუქი ჯაჭვის ტრანსგენი.

ასეთი ტრანსგენული თაგვის მაგალითად შეიძლება აღნიშნულ იქნეს XENOMOUSETM, რომელიც წარმოადგენს გენური ინჟინერიის საშუალებით გამოყვანილი თაგვის შტამს. იგი შეიცავს ადამიანის იმუნოგლობულინის ლოკუსების დიდ ფრაგმენტებს და იგი არასრულყოფილია თაგვის ანტისხეულების საწარმოებლად (Green et al., 1994, Nature Genetics, 7:13-21). XENOMOUSETM-ის საშუალებით ხდება მოზრდილი ადამიანის სრული ანტისხეულების მთელი რეპერტუარის წარმოება და ადამიანის მონოკლონური ანტიგენ-სპეციფიკური ანტისხეულების წარმოქმნა. XENOMOUSETM-ის მეორე

თაობა შეიცავს ადამიანის ანტისხეულების რეპერტუარის დაახლოებით 80%-ს (Green & Jakobovits, 1998, J. Exp. Med., 188:483-495).

გამოგონებით მოცემული ადამიანის ანტისხეულების წარმოქმნისათვის შესაძლებელია აგრეთვე დარგის სპეციალისტებისათვის ცნობილი ნებისმიერი სხვა ტექნიკის, როგორიცაა, მაგალითად, ფაგების დისპლეი, გამოყენებაც.

გამოგონებით მოცემული პროცესის გამოყენება შესაძლებელია სახსრული უბნის შემცველი ნებისმიერი ტიპის იმუნოგლობულინებისათვის, ე.ი. IgA, IgD და IgG-თვის.

მაგალითისათვის, IgA იზოტიპისათვის IgA1-ის სახსრული უბანი შეიცავს ამინომჟავების თანამიმდევრობას PSTPPTSPSTPPTSPS (SEQ ID NO. 8) და IgA2-ის სახსრული უბანი შეიცავს თანამიმდევრობას PPPPP (SEQ ID No. 9).

ამის მსგავსად, IgD-ს სახსრული უბანი შეიცავს ამინომჟავების თანამიმდევრობას SPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTRGGEEKKKEK EKEEQEERETKTP (SEQ ID No. 10).

გამოგონების განსაკუთრებული განხორციელების ნიმუშად უპირატესია IgG-ს გამოყენება, IgG1, IgG2, IgG3 ან IgG4-ის ჩათვლით.

IgG-ის სხვადასხვა იზოტიპის სახსრული უბნის შესაბამისი ამინომჟავების თანამიმდევრობებია:

PKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID No. 11) IgG1-თვის,

RKCCVECP (SEQ ID No.7) IgG2-თვის,

LKTPPLFTGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP (SEQ ID No. 12) IgG3-თვის, და

SKYGPCCPSCP (SEQ ID No. 13) IgG4-თვის.

კიდევ უფრო უკეთესია უპირატესად IgG1-ის გამოყენება. თერაპიული ანტისხეულების სფეროში, და უფრო ზუსტად კი კიბოს სამკურნალოდ, უპირატესია IgG1-ის წარმოქმნა ისეთი ეფექტორული ფუნქციების მისაღებად, როგორიცაა ADCC და CDC, სამიზნე ანტიგენთან სპეციფიკურ ბმასთან დაკავშირებულ ფუნქციებთან ერთად.

გამოგონებით მოცემული პროცესი განსხვავდება იმით, რომ აღნიშნული მონოკლონური ანტისხეული არის IgG1.

“სამიზნე მოლეკულა”, გამოგონების მიხედვით, არის ნებისმიერი მოლეკულა, რომელთანაც მონოკლონურ ანტისხეულს შეუძლია

სპეციფიკურად ბმა ან მისი აქტივობის მოდულაცია. ზოგადად, ასეთ სამიზნე მოლეკულას შეიძლება “ანტიგენი” ეწოდოს.

სამიზნე მოლეკულის არაშემზღუდავ მაგალითად შეიძლება აღნიშნულ იქნეს ხსნადი ლიგანდები, რეცეპტორები, როგორცაა ტრანსმემბრანული რეცეპტორები, კიბოს მემბრანული მარკერები და ა.შ.

გამოგონების უპირატესი განხორციელების ნიმუშში აღნიშნული სამიზნე მოლეკულა არის ტრანსმემბრანული რეცეპტორი.

გამოთქმა “ტრანსმემბრანული რეცეპტორი” ეხება ისეთ პროტეინს, რომელიც ვრცელდება უჯრედის პლაზმის მემბრანაში უჯრედგარე პროტეინის დომენით, რომელსაც ლიგანდთან ბმის უნარი გააჩნია, და უჯრედშიგა დომენით, რომელსაც ლიგანდის ბმისას აქტივობის (როგორცაა პროტეინ კინაზა) ცვლილების (ან ზრდის ან შემცირების) უნარი გააჩნია. სხვა სიტყვებით რომ ვთქვათ, ტრანსმემბრანული რეცეპტორები არის ინტეგრალური მემბრანული პროტეინები, რომლებიც იმყოფება და ჩვეულებრივ მოქმედებს უჯრედის პლაზმის მემბრანის შიგნით, მაგრამ ასევე სუბუჯრედულ ნაწილებისა და ორგანოლების მემბრანებში. მემბრანის ერთ მხარეზე მასიგნალბელ მოლეკულასთან, ან ზოგჯერ ასეთი მოლეკულების წყვილთან ბმისას, ტრანსმემბრანული რეცეპტორი ინიცირებს რეაქციას მეორე მხარეზე. ამ გზით ისინი ასრულებენ უნიკალურ და მნიშვნელოვან როლს უჯრედოვან კომუნიკაციებში და სიგნალების გადაცემაში.

მრავალი ტრანსმემბრანული რეცეპტორი შედგება ორი ან მეტი პროტეინული სუბერთეულისგან, რომლებიც კოლექტიურად მოქმედებს და შეუძლიათ დისოციაცია ლიგანდების ბმის, მოცილების ან მათი “აქტივაციის” ციკლის სხვა ეტაპებზე. მათი კლასიფიკაცია ხშირად ხდება მათი მოლეკულური სტრუქტურის საფუძველზე ან, რადგანაც მათი სტრუქტურა დეტალურად უცნობია, ზოგი რეცეპტორის გამოკლებით, მათ ჰიპოთეზურ (ზოგჯერ ექსპერიმენტულად დადასტურებული) მემბრანის ტოპოლოგიის საფუძველზე. არის ნაწინასწარმეტყველები, რომ უმარტივესი რეცეპტორის პოლიპეპტიდური ჯაჭვები მხოლოდ ერთხელ ჰკვეთს ლიპიდურ ბიფენას, მაშინ როცა სხვები არანაკლებ ვიდრე შვიდჯერ (ეგრეთწოდებული G-პროტეინთან ბმული რეცეპტორები ან GPCR-ები) და მეტადაც.

ნებისმიერი ინტეგრალური მემბრანული პროტეინის მსგავსად, ტრანსმემბრანული რეცეპტორი შეიძლება დაიყოს სამ ნაწილად, ანუ

დომენებად, უჯრედგარე დომენად, ტრანსმემბრანულ დომენად და უჯრედშიგა დომენად.

უჯრედგარე დომენი არის რეცეპტორის ის ნაწილი, რომელიც გამოშვებულია მემბრანიდან უჯრედის ან ორგანელას გარეთ. თუ რეცეპტორის პოლიპეპტიდური ჯაჭვი რამოდენიმეჯერ ჰკვეთს ბიფენას, მაშინ გარე დომენი შეიძლება შეიცავდეს მემბრანიდან გამოშვებულ რამოდენიმე “მარყუქს”. განსაზღვრის მიხედვით, რეცეპტორის მთავარი ფუნქციაა სპეციფიკური ლიგანდის ამოცნობა და რეაგირება, მაგალითად, ნეიროტრანსმიტერის ან ჰორმონის (თუმცა, ზოგი რეცეპტორი რეაგირებს ასევე ტრანსმემბრანული პოტენციალის ცვლილებაზეც), ხოლო მრავალ რეცეპტორში ეს ლიგანდები უკავშირდება უჯრედგარე დომენს.

იმ რეცეპტორების უმრავლესობის შემთხვევაში, რომლების სტრუქტურა დამტკიცებულია, ტრანსმემბრანული ალფა სპირალები წარმოადგენს ტრანსმემბრანული დომენების უმეტესობას. ზოგიერთი რეცეპტორის შემთხვევაში, როგორიცაა ნიკოტინის აცეტილქოლინის რეცეპტორი, ტრანსმემბრანული დომენი ქმნის მემბრანაში გამავალ პროტეინ-ამოგებულ ფორს ანუ იონურ არხს. შესაფერის ლიგანდთან ბმის საშუალებით უჯრედგარე დომენის აქტივაციისას, ფორი იონებისათვის გასავალი ხდება და ისინი მასში გაივლიან. სხვა რეცეპტორებში ფიქრობენ, რომ ტრანსმემბრანული დომენები ბმისას განიცდიან კონფორმაციულ ცვლილებებს, რაც გავლენას ახდენს უჯრედის შიგნით მდგომარეობაზე. ზოგიერთ რეცეპტორებში, როგორიცაა 7TM სუპეროჯახის წევრები, ტრანსმემბრანული დომენი შეიძლება შეიცავდეს ლიგანდის ბმის ჯიბეს.

რეცეპტორის უჯრედშიგა (ან ციტოპლაზმური) დომენი ურთიერთქმედებს რა უჯრედის ან ორგანელას შიგა ნაწილთან, უზრუნველყოფს სიგნალის გადაცემას. არსებობს ამ ურთიერთქმედების ფუნდამენტალურად განსხვავებული ორი გზა: ა) უჯრედშიგა დომენი სპეციფიკური პროტეინ-პროტეინ ურთიერთქმედებების საშუალებით უკავშირდება *ეფექტორ პროტეინებს*, რომლებიც თავის მხრივ აგზავნიან სიგნალს მასიგნალბეული ჯაჭვის გასწვრივ დანიშნულების ადგილას, და ბ) ენზიმ-დაკავშირებული რეცეპტორებით უჯრედშიგა დომენს გააჩნია *ენზიმატური აქტივობა*. ხშირად ეს არის ტიროზინკინაზას აქტივობა.

ენზიმატურ აქტივობას შეიძლება ასევე ადგილი ჰქონდეს უჯრედშიგა დომენთან ასოცირებულ ენზიმზე.

უჯრედისათვის არსებობს ტრანსმემბრანული დომენის რეგულირების რამოდენიმე გზა. მათი უმეტესობა მოქმედებს უჯრედშიგა დომენის მეშვეობით. ყველაზე მნიშველოვანი გზებია ფოსფორილება და ინტერნალიზაცია (იხილეთ უბიკვინი) ან მეორადი მესენჯერ კასკადების, როგორიცაა cAMP, IP, Ca^{2+} ან cGMP, აქტივაცია.

ყველა მემბრანული პროტეინი, რომელიც ამჟღავნებს ენზიმურ აქტივობას, შეიძლება გახდეს გამოგონებით აღწერილი მოდიფიკაციების მქონე ანტისხეულების სამიზნე. მაგალითისათვის და არა შეზღუდვის მიზნით, შეიძლება აღნიშნულ იქნეს მატრიცულ მეტალოპროტეაზას (MMP) ოჯახი, დეზინტეგრინის და მეტალოპროტეაზას დომენის პროტეაზას (ADAM) ოჯახი, ადენილატ ციკლაზები, ...

ყველა მემბრანული პროტეინი, რომლებიც მოქმედებს როგორც იონური არხები, ფორები და ტრანსპორტერები, შეიძლება იყოს წინამდებარე გამოგონებაში აღწერილი მოდიფიკაციების მქონე ანტისხეულების სამიზნე. მაგალითისათვის და არა შეზღუდვის მიზნით, შეიძლება დასახელებულ იქნეს ნატრიუმის არხების ოჯახი, კალიუმის არხების ოჯახი, ნიკოტინის აცეტილქოლინის რეცეპტორის ოჯახი, სიგმა რეცეპტორები, მონოამინის ტრანსპორტერის ოჯახი.

უფრო ფართოდ შეიძლება აღინიშნოს, რომ ყველა მემბრანული პროტეინი, რომელიც კი იდენტიფიცირებულია როგორც მოცემული დაავადების მარკერი, ასევე შეიძლება გახდეს ანტისხეულებით მკურნალობის სამიზნე და ეს ანტისხეულებიც ასევე შეიძლება რომ გაუმჯობესებულ იქნეს გამოგონებაში აღწერილი მოდიფიკაციების საშუალებით.

გამოგონების უპირატესი განხორციელების ნიმუშში აღნიშნული ტრანსმემბრანული რეცეპტორი არჩეულია ჯგუფიდან, რომელშიც შედის: ტიროზინკინაზას რეცეპტორი, ტეტრასპანი და GPCR-ები.

უფრო უპირატეს განხორციელების ნიმუშში აღნიშნული ტრანსმემბრანული რეცეპტორი არის ტიროზინკინაზას რეცეპტორი, რომელიც უპირატესად არჩეულია ჯგუფიდან, რომელშიც შედის IGF-1R, c-Met, RON, Ax1, VEGF, VEGFR, Her-2neu, ErbB ოჯახის ჰომოდიმერები და ჰეტეროდიმერები და ა.შ.

მოცემულ განაცხადში, და უფრო ზუსტად მომდევნო სპეციფიკაციაში, თანამიმდევრობები განსაზღვრული იქნება IMGT-ს მიხედვით. IMGT-ს ნუმერაციის უნიკალური სისტემა განსაზღვრულია ნებისმიერი ანტიგენის რეცეპტორის ვარიანტური დომენის, ჯაჭვის ტიპის ან სახეობების შედარებისათვის [Lefranc M.-P. Immunology Today 18, 509 (1997); Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc M.-P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier E., Truong, L., Thouvenin-Contet V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. IMGT-ს უნიკალური ნუმერაციით შენახულ ამინომჟავებს ყოველთვის ერთი და იგივე პოზიცია აქვთ, მაგალითად, ცისტეინ 23 (1st-CYS), ტრიფტოფან 41 (CONSERVED-TRP), ჰიდროფობული ამინომჟავა 89, ცისტეინ 104 (2nd-CYS), ფენილალანინი ან ტრიფტოფანი 118 (J-PHE ან J-TRP). IMGT-ს ნუმერაციის უნიკალური სისტემა უზრუნველყოფს კარკასული უბნების (FR1-IMGT: პოზიციები 1-დან 26-მდე, FR2-IMGT: 39-დან 55-მდე, FR3-IMGT: 66-დან 104-მდე და FR4-IMGT: პოზიციები 118-დან 128-მდე) და კომპლემენტარულობის განმსაზღვრელი უბნების: CDR1-IMGT: 27-დან 38-მდე, CDR2-IMGT: 56-დან 65-მდე და CDR3-IMGT: 105-დან 117-მდე, სტანდარტიზებული საზღვრების განსაზღვრას. ვინაიდან შუალედები (ცარიელი ადგილები) დაუკავებელ პოზიციებს აღნიშნავს, CDR-IMGT სიგრძეები (რომლებიც მოცემულია ფრჩხილებს შორის და გამოყოფილია წერტილებით, მაგალითად, [8.8.13]), კრიტიკულ ინფორმაციად გვევლინება. IMGT უნიკალური ნუმერაცია გამოყენებულია 2D გრაფიკულ წარმოდგენებში, რომლებსაც IMGT-ს Colliers de Perles-მარგალიტის ყელსაბამს უწოდებენ [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002); Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)] და 3D სტრუქტურებში, IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

დარგის სპეციალისტებს შეუძლიათ IMGT სისტემის მიხედვით აღწერილი გამოგონების ტრანსპონირება ნუმერაციის ნებისმიერ სხვა სისტემაში, როგორცაა, მაგალითად, Kabat-ის ნუმერაციის სისტემა.

IMGT-ს ნუმერაციის უნიკალური სისტემა ყველა სახეობის IG და TR V-REGION-თვის ეფუძნება ვარიანტური უბნის სტრუქტურის მაღალ კონსერვაციას. ამ ნუმერაციით შექმნილია, დარეგულირების შემდეგ, 5 000-ზე

მეტი თანამიმდევრობა, მხედველობაშია მიღებული და გაერთიანებულია კარკასული (FR) და კომპლემენტარულობის განმსაზღვრელი (CDR) უბნები, სტრუქტურული მონაცემები, X-სხივებით დიფრაქციული კვლევებიდან და ჰიპერვარიაციული მარყუქების მახასიათებლები. განსაზღვრულ იქნა FR-IMGT და CDR-IMGT საზღვრები. მსგავსად ამისა, IMGT-ს ნუმერაციის უნიკალური სისტემა გამოყენებულ იქნა C-DOMAIN-თვის და Ig-მსგავს დომენების ზუსტი დელიმიტაციის (საზღვრების განსაზღვრის) საშუალებას იძლევა. იმუნოგლობულინის (IG) ტიპისგან დამოკიდებულებით, C-DOMAIN (C-დომენი) შეესაბამება სრულ C-REGION-ს (C-უბანს), C-უბნის უმეტესობას ან მხოლოდ C-უბნის ნაწილს.

IMGT ნუმერაცია C-DOMAIN-თვის (IG და TR) ნაწარმოებია როგორც IMGT-ს უნიკალური ნუმერაცია V-DOMAIN-თვის, პრინციპიდან IMGT-ს უნიკალური ნუმერაციისა V-REGION-თვის (უბნისათვის), 104 პოზიციამდე. ამიტომ, ადვილად არის შესაძლებელი ამინომჟავების პოზიციების შედარება C-DOMAIN-ს (დომენს) და V-DOMAIN (დომენს) შორის.

სახსრული უბნების ზუსტი განლაგების მიზნით, C-დომენისათვის IMGT ნუმერაცია გამოყენებულ იქნა CH1 და CH2 დომენების ზუსტი განლაგებისათვის. სახსრული უბანი შეიცავს ყველა ამინომჟავას ნაშთს IMGT-CH1 ბოლო ნაშთსა და IMGT-CH2 პირველ ნაშთს შორის.

მოცემულ გამოგონებაში ჩართულია აგრეთვე ერთი და იგივე სახსრული დომენის გადამფარავი ყველა სხვა ნუმერაციის სქემები, როგორიცაა Kabat-ის ან A. Honegger-ის.

როგორც გამოგონების უპირატესი განხორციელების ნიმუში, ზემოაღწერილი IMGT ნუმერაციის სისტემაზე დაყრდნობით, IgG1-ის სახსრული უბნის ამინომჟავების თანამიმდევრობა შეიცავს ნაშთებს H1-დან H14-მდე, სეგმენტით H1-დან H9-მდე, რომელიც შეესაბამება ზედა სახსრულ უბანს და სეგმენტით H10-დან H14-მდე, რომელიც შეესაბამება ცენტრალურ სახსრულ უბანს. უფრო ზუსტად, ადამიანის IgG1-ის სახსრული უბანი შეიცავს ამინომჟავების თანამიმდევრობას PKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID No. 11), ხოლო თაგვის IgG1-ის სახსრული უბანი შეიცავს ამინომჟავების თანამიმდევრობას PRDCGCKPCICT (SEQ ID No. 14).

ცხრილი 1

სახსრული უბანი	ნუმერაცია	ადამ.-IgG1 (SEQ ID No.11)	თაგვ.-IgG1 (SEQ ID No.14)	ადამ.-IgG1 (SEQ ID No.7)	ადამ.-IgG1 (SEQ ID No.11)
ზედა სახსარი	H1	P	P	-	-
	H2	K	R	R	S
	H3	S	D	K	K
	H4	C	C	C	Y
	H5	D	G	-	-
	H6	K	-	-	-
	H7	T	C	C	G
	H8	H	K	V	P
	H9	T	P	E	P
ცენტრალური სახსარი	H10	C	C	C	C
	H11	P	I	P	P
	H12	P	-	P	S
	H13	C	C	C	C
	H14	P	T	P	P

გამოგონების უპირატეს განხორციელებაში განხილულია მოდიფიკაცია, რომელიც მიზნად ისახავს იმ პროტეინული თანამიმდევრობის სიგრძის შემცირებას, რომელითაც კოდირებულია ორვალენტიანი ანტისხეულის სახსრული უბანი. უფრო ზუსტად, გამოგონებით მოცემული პროცესი შეიცავს სახსრულ უბანში, სულ მცირე, ერთი მაინც ამინომჟავას დელეციის ეტაპს.

როგორც აღნიშნული იყო, აღნიშნულ სახსრულ უბანში უპირატესია არაუმეტეს ვიდრე 2 ამინომჟავას დელეცია.

როგორც აღნიშნული იყო, აღნიშნულ სახსრულ უბანში უპირატესია არაუმეტეს ვიდრე 3 ამინომჟავას დელეცია.

როგორც აღნიშნული იყო, აღნიშნულ სახსრულ უბანში უპირატესია არაუმეტეს ვიდრე 4 ამინომჟავას დელეცია.

გამოგონებით მოცემული პროცესის გამოყენების განსაკუთრებულ შემთხვევაში, მოდიფიკაციაში შედის, სულ მცირე, დელეცია მაინც

ამინომჟავასი, რომელიც არჩეულია ამინომჟავებიდან პოზიციაში H1, H2, H3, H5, H6, H7, H8, H9, H11, H12 ან H14.

უფრო ზუსტად, გამოგონებაში ნაჩვენებია, რომ მისი განსაკუთრებული ასპექტი მდგომარეობს განსაზღვრული ნაშთების არჩევაში.

IgG1-ის უპირატეს შემთხვევაში, ამინომჟავა პოზიციაზე H1 წარმოადგენს პროლინს; ამინომჟავა პოზიციაზე H2 წარმოადგენს ლიზინს ადამიანის ვერსიაში და არგინინს თაგვის ვერსიაში; ამინომჟავა პოზიციაზე H3 წარმოადგენს სერინს ადამიანის ვერსიაში და ასპარტატს თაგვის ვერსიაში; ამინომჟავა პოზიციაზე H5 წარმოადგენს ასპარტატს ადამიანის ვერსიაში და გლიცინს თაგვის ვერსიაში; ამინომჟავა პოზიციაზე H6 წარმოადგენს ლიზინს; ამინომჟავა პოზიციაზე H8 წარმოადგენს ჰისტიდინს ადამიანის ვერსიაში და ლიზინს თაგვის ვერსიაში; ამინომჟავა პოზიციაზე H9 წარმოადგენს თრეონინს ადამიანის ვერსიაში და პროლინს თაგვის ვერსიაში; ამინომჟავა პოზიციაზე H11 წარმოადგენს პროლინს ადამიანის ვერსიაში და იზოლეიცინს თაგვის ვერსიაში; და ამინომჟავა პოზიციაზე H12 წარმოადგენს პროლინს ადამიანის ვერსიაში.

უპირატესი განხორციელების ნიმუშის მიხედვით, ეს დელეცია უნდა შესრულებულ იქნეს “ზედა სახსარის” უბანში.

უფრო უპირატეს განხორციელების ნიმუშში ეს დელეცია წარმოადგენს “ზედა სახსარის” ნაწილს, რომელიც IgG1-თვის შედგება, მაგალითად, ამინომჟავებიდან H1-დან H9-მდე, განსხვავებით “ცენტრალური სახსარისაგან”, რომელიც შედგება ამინომჟავებისაგან H10-დან H14-მდე.

ზემოაღწერილის თანახმად, წარმოდგენილ განაცხადში ამინომჟავების ნუმერაცია განხორციელებულია IMGT სისტემაში. ცხადია, რომ ნებისმიერი სხვა ნუმერაციის სისტემა, ნუმერაციის, მაგრამ არა სახსრულ უბანში ჩართული ნაშთების ბუნების მოდიფიკაციით, უნდა განხილულ იქნეს, როგორც ეკვივალენტური. მაგალითისათვის, გამოგონების იდენტიფიცირებული ამინომჟავების ნაწილის (IMGT სისტემის მიხედვით) რენუმერაცია Kabat-ის სისტემაში უნდა ეკვივალენტურად იქნეს განხილული.

გამოგონების სხვა ასპექტი დაფუძნებულია, სულ მცირე, ერთი მაინც ცისტეინის დელეციაზე “ზედა სახსარის” უბანში, უპირატესად, პოზიციაზე H4 მდებარე ცისტეინისა.

გამოგონების კიდევ სხვა ასპექტი დაფუძნებულია, სულ მცირე, ერთი მაინც დისულფიდური ხიდის დამატებაზე სახსრულ უბანში.

უფრო ზუსტად, გამოგონებით მოცემული პროცესი განსხვავდება იმით, რომ მოდიფიკაცია მდგომარეობს, სულ მცირე, ერთი მაინც ცისტეინის შეყვანაში “ზედა სახსარის” უბანში.

გამოგონების მიხედვით ამის ახსნა ეფუძნება სახსრული უბნის შესაძლო “გახისტებას” სიგრძის შემცირების და/ან კიდევ სხვა დისულფიდური ხიდის შეყვანის შედეგად. ასეთი “გახისტება” ანტისხეულის შესაფერისი სივრცული კონფორმაციის საშუალებას იძლევა გაუმჯობესებული ანტაგონისტური აქტივობის შედეგით.

აშკარაა, რომ ნებისმიერი სხვა ხერხი, რომელიც მიზნად ისახავს სახსრული უბნის გახისტებას, უნდა განხილულ იქნეს გამოგონებით მოცემული პროცესის ეკვივალენტურ მეთოდად.

ცისტეინის შეყვანა შეიძლება განხორციელდეს იქნეს ასეთი ამინომჟავას დამატების საშუალებით და ამ დამატების განხორციელება შესაძლებელია დარგის სპეციალისტებისათვის ცნობილი ნებისმიერი ხერხით.

სახსრულ უბანში ცისტეინის შეყვანის მეორე უპირატესი გზაა, სულ მცირე, ერთი მაინც ამინომჟავას ჩანაცვლება.

უფრო ზუსტად, სახსრულ უბანში ცისტეინის შეყვანის უპირატესი გზაა, სულ მცირე, H1-დან H9-მდე პოზიციების ამინომჟავებიდან არჩეული ამინომჟავას ჩანაცვლება. ასეთი ჩანაცვლების შესრულება შესაძლებელია დარგის სპეციალისტებისათვის ცნობილი ნებისმიერი მეთოდით.

უფრო ზუსტად, გამოგონებით მოცემულ პროცესში შედის “ზედა სახსარის” უბანში თრეონინის ჩანაცვლება H7 პოზიციაზე ცისტეინით.

გამოგონების განხორციელების სხვა ნიმუშში გამოგონებით მოცემულ პროცესში შედის “ზედა სახსარის” უბანში ლიზინის ჩანაცვლება H6 პოზიციაზე ცისტეინით.

გამოგონების განხორციელების კიდევ სხვა ნიმუშში გამოგონებით მოცემულ პროცესში შედის “ზედა სახსარის” უბანში პროლინის ჩანაცვლება H1 პოზიციაზე ცისტეინით.

გამოგონების განხორციელების კიდევ სხვა ნიმუშში გამოგონებით მოცემულ პროცესში შედის “ზედა სახსარის” უბანში ლიზინის ჩანაცვლება H2 პოზიციაზე ცისტეინით.

გამოგონების განხორციელების კიდევ სხვა ნიმუშში გამოგონებით მოცემულ პროცესში შედის “ზედა სახსარის” უბანში სერიის ჩანაცვლება H3 პოზიციაზე ცისტეინით.

გამოგონების განხორციელების კიდევ სხვა ნიმუშში გამოგონებით მოცემულ პროცესში შედის “ზედა სახსარის” უბანში ასპარტატის ჩანაცვლება H5 პოზიციაზე ცისტეინით.

გამოგონების განხორციელების კიდევ სხვა ნიმუშში გამოგონებით მოცემულ პროცესში შედის “ზედა სახსარის” უბანში ჰისტიდინის ჩანაცვლება H8 პოზიციაზე ცისტეინით.

გამოგონების განხორციელების კიდევ სხვა ნიმუშში გამოგონებით მოცემულ პროცესში შედის “ზედა სახსარის” უბანში თრეონინის ჩანაცვლება H9 პოზიციაზე ცისტეინით.

სხვა განხორციელების ნიმუშის მიხედვით, ასევე შესაძლებელია სახსრული უბნის სიგრძის შემცირება და/ან დისულფიდური ხიდის დამატება მთლიანად იმ ამინომჟავების თანამიმდევრობის შეცვლით, რომლითაც კოდირებულია სახსრული უბანი.

უპირატესი ნიმუშის სახით, გამოგონებით მოცემული პროცესის მოდიფიკაცია მდგომარეობს IgG1-ის სახსრულ უბანში ამინომჟავების H1-დან H14-მდე შეცვლა IgG2-ის სახსრული უბნის ამინომჟავებით H1-დან H14-მდე, უპირატესად მაშინ, როდესაც ანტაგონისტური აქტივობის გასაუმჯობესებლად განსაზღვრული ანტისხეული არის IgG1 ანტისხეული.

სხვა განაცხადში გამოგონება ეხება სპეციფიკური სამიზნე მოლეკულის წინააღმდეგ მიმართული ანტაგონისტური მონოკლონური ანტისხეულის, ან მისი ორვალენტური ფუნქციური ფრაგმენტის ან მისი წარმოებულის სკრინინგის პროცესს, აღნიშნულ ანტისხეულს გააჩნია აღნიშნული სამიზნე მოლეკულის ერთი ან მეტი ბიოლოგიური აქტივობის ინჰიბირების უნარი, ამასთან აღნიშნულ პროცესში შედის:

(a) საწყისი ანტისხეულის არჩევა აღნიშნული სამიზნე მოლეკულის აღნიშნული ერთი ან მეტი ბიოლოგიური აქტივობის ინჰიბირების საწყისი დონით,

(b) აღნიშნული საწყისი ანტისხეულის სახსრული უბნის ამინომჟავების თანამიმდევრობის მოდიფიკაცია გამოგონებით მოცემული პროცესის საშუალებით,

(c) ეტაპზე (b) მიღებული მოდიფიცირებული ანტისხეულის აღნიშნული სამიზნე მოლეკულის ერთი ან მეტი ბიოლოგიური აქტივობის ინჰიბირების უნარის შეფასება, და

(d) დადებით შედეგად ეტაპის (c) ისეთი ანტისხეულის არჩევა, რომლის აღნიშნული სამიზნე მოლეკულის აღნიშნული ერთი ან მეტი ბიოლოგიური აქტივობის ინჰიბირების დონე მეტია, ვიდრე აღნიშნული ინჰიბირების საწყისი დონე.

საწყის ანტისხეულებად შეიძლება არჩეულ იქნეს არსებული ანტისხეულები როგორიცაა, შეზღუდვის გარეშე, IGF-1R, c-Met, RON, Axl, CD151, VEGF, VEGFR, Her-2neu-ის ანტაგონისტი ანტისხეულები, ErbB ოჯახის ჰომოდიმერები და ჰეტეროდიმერები. როგორც არაშემზღუდველი უპირატესი მაგალითი, აღნიშნული ანტისხეულები შეიძლება შედგებოდეს ჰერცეპტინიდან, პერტუზუმაბიდან, ცეტუქსიმაბიდან, ანტი-VEGFR ან ანტი-IGF-1R ანტისხეულებიდან.

“ინჰიბირების დონე” გამოგონების მიხედვით ილუსტრირებს ანტისხეულის ანტაგონისტურ აქტივობას. ინჰიბირების ამ დონის განსზღვრა შესაძლებელია დარგის სპეციალისტებისათვის ცნობილი ნებისმიერი მეთოდით, როგორიცაა, შეზღუდვის გარეშე, ა) უჯრედების უშუალო დათვლა ან პროლიფერაციის შეფასებისათვის განკუთვნილი ^3H თიმიდინის, ტეტრაზოლინის მარილების ან სხვა ფლუორესცენტული ნივთიერებების გამოყენება, ბ) სიგნალის ტრანსდუქციისათვის western blotting-ის, ფოსფო-ELISA-ს ან ალფა-სკრინის ანალიზების გამოყენება, გ) BRET ან FRET ანალიზი დიმერიზაციის გამოსაკვლევად, დ) მიკროსკოპიის ან ფლუორესცენციური მეთოდები მიგრაციის, ინვაზიის, ანგიოგენეზის ან მორფოგენეზის კონტროლისათვის და ე) კალიპერის (შტანგენფარგალის) გამოყენებით სიმსივნეების გაზომვა *in vivo* შეფასებებისათვის.

სკრინინგის ამ პროცესის გამოყენება შესაძლებელია შემოწმებული ანტისხეულების გასაუმჯობესებლად ან ანტისხეულების წინაკლინიკური შერჩევის ეტაპად.

გამოგონების სხვა ასპექტი ეხება სპეციფიკურ სამიზნე მოლეკულაზე მიმართულ მონოკლონურ ანტისხეულს ან მის ორვალენტიან ფუნქციურ ფრაგმენტებს ან წარმოებულებს, რომლების მიღებაც შესაძლებელია გამოგონებით მოცემული პროცესით, აღნიშნული ანტისხეული განსხვავდება

იმით, რომ იგი შეიცავს სახსრული უბნის ამინომჟავების თანამიმდევრობას არჩეულს ჯგუფიდან, რომელშიც შედის: SEQ ID No.1 (PRDCGCKPCICT), SEQ ID No. 2 (PKSCGCKPCICT), SEQ ID No.3 (PKSCGCKPCICP), SEQ ID No.4 (PRDCGCKPCPPCP), SEQ ID No.5 (PRDCGCHTCPPCP), SEQ ID No. 6 (PKSCDCHCPPCP), SEQ ID No. 7 (RKCCVECP)CP, SEQ ID No. 22 (CKSCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 23 (PCSCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 24 (PKCCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 25 (PKSCCKTHTCPPCP), SEQ ID No. 26 (PKSCDCTHTCPPCP), SEQ ID No. 27 (PKSCDKCHTCPPCP), SEQ ID No. 28 (PKSCDKTCTCPPCP), SEQ ID No. 29 (PKSCDKTHCCPPCP), SEQ ID No. 30 (PKSCDKTHTCCCP), SEQ ID No. 31 (PKSCDKTHTCPCCP), SEQ ID No. 32 (PKSCDKTHTCPPCC), SEQ ID No. 33 (PSCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 34 (PKSCDTHTCPPCP), SEQ ID No. 35 (PKSCDKTHCPPCP), SEQ ID No. 36 (KCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 37 (PSCKTHTCPPCP), SEQ ID No. 38 (PKSCDTHCPPCP), SEQ ID No. 39 (PKSCTHTCPPCP), SEQ ID No. 40 (PKSCDKTTCPPCP), SEQ ID No. 41 (PKSCDKTHCPPC), SEQ ID No. 42 (PKSCDCHTCPPCP), SEQ ID No. 43 (PKSCDCTHCPPCP), SEQ ID No. 44 (PCSCKHTCPPCP), SEQ ID No. 45 (PSCCTHTCPPCP), SEQ ID No. 46 (PSCDKHCCPPCP), SEQ ID No. 47 (PKSTHTCPPCP), SEQ ID No. 48 (PKSCTCPPCP) ან SEQ ID No. 49 (PKSCDKCVECP)CP).

გამოგონებით მოცემული პროცესის განხორციელების შედეგად მიღებული უპირატესი მონოკლონური ანტისხეული შეიძლება განსხვავდებოდეს იმით, რომ იგი შეიცავდეს ამინომჟავების თანამიმდევრობას, რომელიც არჩეულია ჯგუფიდან, რომელშიც შედის: SEQ ID No. 1 (PRDCGCKPCICT), SEQ ID No. 2 (PKSCGCKPCICT), SEQ ID No.3 (PKSCGCKPCICP), SEQ ID No.4 (PRDCGCKPCPPCP), SEQ ID No.5 (PRDCGCHTCPPCP), SEQ ID No. 6 (PKSCDCHCPPCP), SEQ ID No. 7 (RKCCVECP)CP, SEQ ID No. 22 (CKSCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 23 (PCSCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 24 (PKCCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 25 (PKSCCKTHTCPPCP), SEQ ID No. 26 (PKSCDCTHTCPPCP), SEQ ID No. 27 (PKSCDKCHTCPPCP), SEQ ID No. 28 (PKSCDKTCTCPPCP), SEQ ID No. 29 (PKSCDKTHCCPPCP), SEQ ID No. 30 (PKSCDKTHTCCCP), SEQ ID No. 31 (PKSCDKTHTCPCCP), SEQ ID No. 32 (PKSCDKTHTCPPCC), SEQ ID No. 33 (PSCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 34 (PKSCDTHTCPPCP), SEQ ID No. 35 (PKSCDKTHCPPCP), SEQ ID No. 36

(KCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 37 (PSCKTHTCPPCP), SEQ ID No. 38 (PKSCDTHCPPCP), SEQ ID No. 39 (PKSCTHTCPPCP), SEQ ID No. 40 (PKSCDKTTCPCP), SEQ ID No. 41 (PKSCDKTHCPCP), SEQ ID No. 42 (PKSCDCHTCPPCP), SEQ ID No. 43 (PKSCDCTHCPPCP), SEQ ID No. 44 (PCSCKHTCPPCP), SEQ ID No. 45 (PSCCTHTCPPCP), SEQ ID No. 46 (PSCDKHCCPPCP), SEQ ID No. 47 (PKSTHTCPPCP), SEQ ID No. 48 (PKSCTCPPCP) ან SEQ ID No. 49 (PKSCDKCVECPCP).

უპირატესი განხორციელების ნიმუში აღნიშნული მონოკლონური ანტისხეული არის ადამიანის ანტისხეული, უფრო უპირატესია IgG1 ანტისხეული.

გამოგონება ასევე ეხება იზოლირებულ ნუკლეინმჟავას, რომლითაც როგორც ადრე იყო აღწერილი, კოდირებულია მონოკლონური ანტისხეული, ე.ი. რომელიც შეიცავს სახსრული უბნის ამინომჟავების თანამიმდევრობას, არჩეულს ჯგუფიდან, რომელშიც შედის: SEQ ID No. 1 (PRDCGCKPCICT), SEQ ID No. 2 (PKSCGCKPCICT), SEQ ID No.3 (PKSCGCKPCICP), SEQ ID No.4 (PRDCGCKPCPPCP), SEQ ID No.5 (PRDCGCHTCPPCP), SEQ ID No. 6 (PKSCDCHCPPCP), SEQ ID No. 7 (RKCCVECPCP), SEQ ID No. 22 (CKSCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 23 (PCSCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 24 (PKCCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 25 (PKSCCKTHTCPPCP), SEQ ID No. 26 (PKSCDCTHTCPPCP), SEQ ID No. 27 (PKSCDKCHTCPPCP), SEQ ID No. 28 (PKSCDKTCTCPPCP), SEQ ID No. 29 (PKSCDKTHCCPPCP), SEQ ID No. 30 (PKSCDKTHTCCPCP), SEQ ID No. 31 (PKSCDKTHTCPCCP), SEQ ID No. 32 (PKSCDKTHTCPPCC), SEQ ID No. 33 (PSCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 34 (PKSCDTHTCPPCP), SEQ ID No. 35 (PKSCDKTHCPCP), SEQ ID No. 36 (KCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 37 (PSCKTHTCPPCP), SEQ ID No. 38 (PKSCDTHCPPCP), SEQ ID No. 39 (PKSCTHTCPPCP), SEQ ID No. 40 (PKSCDKTTCPCP), SEQ ID No. 41 (PKSCDKTHCPCP), SEQ ID No. 42 (PKSCDCHTCPPCP), SEQ ID No. 43 (PKSCDCTHCPPCP), SEQ ID No. 44 (PCSCKHTCPPCP), SEQ ID No. 45 (PSCCTHTCPPCP), SEQ ID No. 46 (PSCDKHCCPPCP), SEQ ID No. 47 (PKSTHTCPPCP), SEQ ID No. 48 (PKSCTCPPCP) ან SEQ ID No. 49 (PKSCDKCVECPCP).

კიდევ ერთი სხვა ასპექტის თანახმად, მოცემული გამოგონება ეხება იზოლირებულ ნუკლეინმჟავას, რომელიც განსხვავდება იმით, რომ შერჩეულია მომდევნო ნუკლეინმჟავეებიდან:

a) ნუკლეინმჟავა, dnm ან rnm , რომლითაც კოდირებულია ხელოვნური სახსრული უბანი მოცემული გამოგონების მიხედვით, მათი შესაბამისი rnm ნუკლეინმჟავა ან კომპლემენტარული თანამიმდევრობა;

b) იზოლირებული ნუკლეინმჟავეების თანამიმდევრობა, რომელიც შეიცავს ნუკლეინთანამიმდევრობას შერჩეულს ჯგუფიდან, რომელშიც შედის SEQ ID No. 15-დან SEQ ID No. 21-მდე, SEQ ID No. 50-დან SEQ ID No. 77-მდე, მათი შესაბამისი rnm ნუკლეინმჟავა და კომპლემენტარული თანამიმდევრობა; და

c) სულ მცირე, 18 ნუკლეოტიდიანი ნუკლეინმჟავა, რომელსაც გააჩნია ჰიბრიდიზაციის უნარი უმკაცრეს პირობებში, სულ მცირე, ერთ მაინც თანამიმდევრობასთან თანამიმდევრობებიდან SEQ ID No. 15-დან 21-მდე და 50-დან 77-მდე.

უპირატესად, გამოგონებაში შედის იზოლირებული ნუკლეინმჟავა, რომელიც შეიცავს ნუკლეინთანამიმდევრობას, შერჩეულს ჯგუფიდან, რომელშიც შედის SEQ ID No. 15-დან SEQ ID No. 21-მდე და SEQ ID No. 50-დან SEQ ID No. 77-მდე.

გამოგონების ნაწილს ასევე წარმოადგენს ექსპრესიის ვექტორი ან ტრანსფორმირებული მასპინძელი უჯრედი, რომელიც შეიცავს ადრე აღწერილ იზოლირებულ ნუკლეინმჟავას და უფრო ზუსტად, იზოლირებულ ნუკლეინმჟავას, რომელიც შეიცავს ნუკლეინთანამიმდევრობას, შერჩეულს ჯგუფიდან, რომელშიც შედის SEQ ID No. 15-დან SEQ ID No. 21-მდე, SEQ ID No. 50-დან SEQ ID No. 77-მდე, მათი შესაბამისი rnm ნუკლეინმჟავა და კომპლემენტარული თანამიმდევრობა.

ნუკლეინმჟავა, ნუკლეინ ან ნუკლეინმჟავეების თანამიმდევრობა, პოლინუკლეოტიდი, ოლიგონუკლეოტიდი, პოლინუკლეოტიდების თანამიმდევრობა, ნუკლეოტიდების თანამიმდევრობა, ეს არის ტერმინები, რომლებიც დამოუკიდებლად არის გამოყენებული მოცემულ გამოგონებაში, გამიზნულია ნუკლეოტიდების ზუსტი კავშირის მითითებისათვის, რომელიც მოდიფიცირებულია ან არამოდიფიცირებულია და ნუკლეინმჟავას ფრაგმენტის ან უბნის განსაზღვრის საშუალებას იძლევა, რომელიც შეიცავს ან არ შეიცავს არაბუნებრივ ნუკლეოტიდებს და შეუძლია რომ შეესაბამებოდეს

ზუსტად როგორც ორსპირადიან dnm-ს, ერთსპირადიან dnm-ს, ისე აღნიშნული dnm-ების ტრანსკრიფციის პროდუქტებს.

გასაგები უნდა იყოს აგრეთვე, რომ მოცემული გამოგონების ინტერესის სფეროში არ შედის ნუკლეოტიდების თანამიმდევრობები მათ ბუნებრივ ქრომოსომულ გარემოში ანუ, ასე ვთქვათ, მათ ბუნებრივ მდგომარეობაში. გამოგონება ეხება თანამიმდევრობებს, რომლებიც იზოლირებულ და/ან გასუფთავებულ იქნა, ანუ, ასე ვთქვათ, არჩეულ იქნა პირდაპირ ან არაპირდაპირ, მაგალითად, ასლის გადაღების საშუალებით და მათი გარემო, სულ მცირე, ნაწილობრივ მაინც არის მოდიფიცირებული. აქ აღსანიშნავია აგრეთვე იზოლირებული ნუკლეინმჟავები, მიღებული გენეტიკური რეკომბინაციით, მაგალითად, მასპინძელი უჯრედის საშუალებით ან ქიმიური სინთეზით მიღებული ნუკლეინმჟავები.

უმკაცრეს პირობებში ჰიბრიდიზაცია ნიშნავს, რომ ტემპერატურული პირობები და იონური ძალის პირობები ისეა შერჩეული, რომ კომპლემენტარულ dnm-ს ორ ფრაგმენტს შორის ჰიბრიდიზაციის საშუალებას იძლევა. ილუსტრაციის მიზნით ზემოაღწერილი პოლინუკლეოტიდური ფრაგმენტების განსაზღვრისათვის საჭირო ჰიბრიდიზაციის ეტაპის უმკაცრესი პირობები უპირატესად არის შემდეგი:

dnm-dnm ან dnm-rnm ჰიბრიდიზაცია ხორციელდება ორ ეტაპად: (1) წინასწარი ჰიბრიდიზაცია 42°C ტემპერატურის პირობებში 3 საათის განმავლობაში ფოსფატის ბუფერში (20 მმოლი, pH 7.5), რომელიც შეიცავს 5 x SSC (1 x SSC შეესაბამება 0.15 მოლი NaCl + 0.015 მოლი ნატრიუმციტრატის ხსნარს), 50% ფორმამიდს, 7% ნატრიუმდოდეცილსულფატს (SDS), 10 x Denhardt's, დექსტრანსულფატის 5% და ორაგულის სკერმის dnm 1%; (2) რეალური ჰიბრიდიზაცია მიმდინარეობს 20 საათის განმავლობაში, ტემპერატურაზე, რომელიც დამოკიდებულია ზონდის ზომაზე (მაგ.: 42°C ზონდის ზომისათვის > 100 ნუკლეოტიდზე), რასაც მოსდევს ორი გარეცხვა 20 წუთის განმავლობაში 20°C ტემპერატურაზე 2 x SSC + 2% SDS-ში, 1 გარეცხვა 20 წუთის განმავლობაში 0.1 x SSC + 0.1% SDS-ში. ბოლო გარეცხვა სრულდება 0.1 x SSC + 0.1% SDS-ში 30 წუთის განმავლობაში 60°C ტემპერატურაზე ზონდის ზომისათვის > 100 ნუკლეოტიდზე. განსაზღვრული ზომის პოლინუკლეოტიდისათვის ზემოთ აღწერილი ჰიბრიდიზაციის უმაღლესი

სიმკაცრის პირობები დარგის სპეციალისტების მიერ შეიძლება მორგებულ იქნეს უფრო დიდი ან უფრო მცირე ზომის ოლიგონუკლეოტიდებზე Sambrook et al. (1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor) სახელმძღვანელოს ინსტრუქციების თანახმად.

გამოგონება ასევე ეხება ვექტორს, რომელიც შეიცავს გამოგონებით მოცემულ ნუკლეინმჟავას.

გამოგონება განსაკუთრებით მიმართულია კლონირებაზე და/ან ექსპრესიის ვექტორებზე, რომლებიც შეიცავს ნუკლეოტიდების თანამიმდევრობას გამოგონების მიხედვით.

გამოგონებით მოცემული ვექტორები უპირატესად შეიცავს ისეთ ელემენტებს, რომლებიც ტრანსლირებული ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობების ექსპრესიის და/ან სეკრეციის საშუალებას იძლევა განსაზღვრულ მასპინძელ უჯრედში. ამიტომ, ვექტორი უნდა შეიცავდეს პრომოტორს, ტრანსლაციის ინიციაციისა და დამთავრების სიგნალს და ასევე ტრანსკრიფციის რეგულირების შესაფერის უბნებს. მას უნდა ჰქონდეს მასპინძელ უჯრედში სტაბილურად ყოფნის უნარი და, არასავალდებულოდ, შეიძლება გააჩნდეს ცალკე სიგნალები, რომლებიც განსაზღვრავს ტრანსლირებული პროტეინის სეკრეციას. ამ სხვადასხვა ელემენტს ირჩევს და ოპტიმიზირებას ახდენს დარგის სპეციალისტი გამომდინარე გამოყენებული მასპინძელი უჯრედიდან. ამ მიზნით, გამოგონებით მოცემული ნუკლეოტიდების თანამიმდევრობები შეიძლება შეტანილ იქნეს ავტონომიურ რეპლიკაციის ვექტორებში შერჩეულ მასპინძელში ან შეიძლება იყოს შერჩეული მასპინძელი უჯრედის განუყოფელი ვექტორები.

ასეთი ვექტორების დამზადება ხდება დარგის სპეციალისტების მიერ ჩვეულებრივ გამოსაყენებელი მეთოდების დახმარებით და შედეგად მიღებული კლონები შეიძლება შეყვანილ იქნეს შესაფერის მასპინძელში სტანდარტული ხერხებით, როგორიცაა ლიპოფექცია, ელექტროფორეზი, თერმული შოკი ან ქიმიური მეთოდები.

გამოგონებით მოცემული ვექტორები არის, მაგალითად, პლაზმიდური ან ვირუსული წარმოშობის ვექტორები. ისინი გამოსადეგია მასპინძელი უჯრედის ტრანსფორმაციისათვის, რათა კლონირებულ ან ექსპრესირებულ იქნეს გამოგონებით მოცემული ნუკლეოტიდების თანამიმდევრობები.

გამოგონებაში ასევე შედის ტრანსფორმირებული მასპინძელი უჯრედები ან მასპინძელი უჯრედები, რომლებიც შეიცავს გამოგონებით მოცემულ ვექტორს.

მასპინძელი უჯრედი შერჩეულია პროკარიოტული ან ეუკარიოტული სისტემებიდან, მაგალითად, ბაქტერიული უჯრედებიდან, ასევე საფუარის ან ცხოველური უჯრედებიდან, კერძოდ ძუძუმწოვრების უჯრედებიდან. ასევე შესაძლებელია მწერებისა და მცენარეების უჯრედების გამოყენება.

გამოგონების სხვა მახასიათებლები და უპირატესობები ჩანს დანარჩენი აღწერილობიდან მაგალითებზე და ფიგურებზე დაყრდნობით, სადაც:

ფიგურებზე 1A და 1B ნაჩვენებია თავის და შესაბამისი ქიმერული ანტი-c-Met Mab-ების სერიების, რომლებიც წარმოებულია როგორც ადამიანის IgG1/კაპა იზოტიპი, გავლენა c-Met რეცეპტორის ფოსფორილებაზე A549 უჯრედებში.

ფიგურა 1A: აგონისტური ეფექტი, გამოთვლილი როგორც პროცენტი HGF-ით [100 ნგ/მლ] გამოწვეული c-Met ფოსფორილების მაქსიმალურ სტიმულაციასთან შედარებით.

ფიგურა 1B: ანტაგონისტური ეფექტი, გამოთვლილი როგორც HGF-ით [100 ნგ/მლ] გამოწვეული c-Met ფოსფორილების მაქსიმალური სტიმულაციის ინჰიბირების პროცენტი.

ფიგურებზე 2A და 2B ნაჩვენებია თავის 224G11 Mab-ის და ინჟინერიის საშუალებით მიღებული სხვადასხვა სახსრული უბნების შემცველი ქიმერული 224G11 Mab-ების გავლენის შედარება C-Met რეცეპტორის ფოსფორილებაზე A549 უჯრედებში.

ფიგურა 2A: აგონისტური ეფექტი, გამოთვლილი როგორც პროცენტი HGF-ით [100 ნგ/მლ] გამოწვეული c-Met ფოსფორილების მაქსიმალურ სტიმულაციასთან შედარებით.

ფიგურა 2B: ანტაგონისტური ეფექტი, გამოთვლილი როგორც HGF-ით [100 ნგ/მლ] გამოწვეული c-Met ფოსფორილების მაქსიმალური სტიმულაციის ინჰიბირების პროცენტი.

ფიგურებზე 3A და 3B, 4 და 5 ნაჩვენებია c-Met დიმერიზაციისა და აქტივაციის BRET მოდელები.

ფიგურებზე 6A და 6B ნაჩვენებია ქიმერული და ჰუმანიზებული 224G11 ფორმების მიერ c-Met-ის ამოცნობა.

ფიგურებზე 7A, 7B და 7C ნაჩვენებია თავის და ქიმერული ანტისხეულების გავლენა HGF-ით ინდუცირებულ NCI-H441 უჯრედების პროლიფერაციაზე *in vitro*. NCI-H441 უჯრედები დათესილ იქნა შრატისგან თავისუფალ მკვებავ გარემოში. დათესვიდან 24 საათის შემდეგ დამატებულ იქნა: (ფიგ.7A) m11E1 და [11E1]chim-ქიმერული, (ფიგ.7B) m227H1 და [227H1]chim-ქიმერული, ან (ფიგ.7C) m224G11 და [224G11]chim-ქიმერული HGF-ის თანაობის ან თანაობის გარეშე. ისრები მიუთითებს მხოლოდ უჯრედებათესილ ფოსოებს HGF-ის თანაობის გარეშე $\blacktriangle$ ან თანაობისას $\blacktriangledown$. თავის IgG1 (mIgG1) შეტანილ იქნა როგორც იზოტიპის კონტროლი.

ფიგურაზე 8 ნაჩვენებია თავისა და ქიმერული 224G11 Mab-ების შედარება *in vivo* NCI-H441-ის ქსენოტრანსპლანტანტურ მოდელზე.

ფიგურებზე 9A და 9B ნაჩვენებია თავის 224G11 Mab-ის და ამ ანტისხეულის სხვადასხვა ქიმერული და ჰუმანიზებული ვერსიების გავლენა NCI-H441 უჯრედების HGF-ით ინდუცირებულ პროლიფერაციაზე *in vitro*. NCI-H441 უჯრედები დათესილ იქნა შრატისგან თავისუფალ მკვებავ გარემოში. დათესვიდან 24 საათის შემდეგ დამატებულ იქნა სატესტო ანტისხეულები HGF-ის თანაობის გარეშე ან თანაობისას. ჩამონათვალში (ფიგ.9A) ნაჩვენებია თავის m224G11, ქიმერული IgG1 [224G11]chim, ჰუმანიზებული IgG1 [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2], [224G11] [Hz3] ვერსიები. ჩამონათვალში (ფიგ.9B) მოცემულია თავის m224G11 და ქიმერული IgG1-ის სხვადასხვა ფორმები ([224G11]chim, [224G11] [MH chim], [224G11] [MUP9H chim], [224G11] [MMCH chim], [224G11] [TH7 chim]. ისრები მიუთითებს მხოლოდ უჯრედებათესილ ფოსოებს HGF-ის თანაობის გარეშე $\blacktriangle$ ან თანაობისას $\blacktriangledown$. თავის IgG1 შეტანილ იქნა როგორც უარყოფითი კონტროლი აგონისტური აქტიურობისათვის. M5D5 გამოყენებული იყო როგორც დოზა-დამოკიდებული სრული აგონისტ-კონტროლი.

ფიგურაზე 10 ნაჩვენებია თავის 224G11 Mab-ის და ამ ანტისხეულის სხვადასხვა ქიმერული და ჰუმანიზებული ვერსიების გავლენა NCI-H441 უჯრედების HGF-ით ინდუცირებული პროლიფერაციაზე *in vitro*. NCI-H441 უჯრედები დათესილ იქნა შრატისგან თავისუფალ მკვებავ გარემოში.

დათესვიდან 24 საათის შემდეგ დამატებულ იქნა სატესტო ანტისხეულები HGF-ის თანაობის გარეშე ან თანაობისას. მოცემულია თავის m224G11, [224G11]chim, [224G11] [TH7 chim] IgG1-ის ქიმერული ფორმები და [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz3]. ისრები მიუთითებს მხოლოდ უჯრედებათესილ ფოსებს HGF-ის თანაობის გარეშე ან თანაობისას. თავის IgG1 შეტანილ იქნა როგორც უარყოფითი კონტროლი აგონისტური აქტივობისათვის. M5D5 გამოყენებული იყო როგორც დოზა-დამოკიდებული სრული აგონისტ-კონტროლი.

ფიგურებზე 11A-11B და 12A-12B ნაჩვენებია ანტი-c-Met Mab-ების სერიების, რომლებსაც გააჩნიათ ინჟინერიის საშუალებით მიღებული გამოგონებით მოცემული სხვადასხვა სახსრული უბნები, გავლენა C-Met რეცეპტორის ფოსფორილებაზე A549 უჯრედებში. ფიგურა 11A და 11B: აგონისტური ეფექტი, გამოთვლილი როგორც პროცენტი HGF-ით [100 ნგ/მლ] გამოწვეული c-Met ფოსფორილების მაქსიმალურ სტიმულაციასთან შედარებით. ფიგურა 12A და 12B: ანტაგონისტური ეფექტი, გამოთვლილი როგორც HGF-ით [100 ნგ/მლ] გამოწვეული c-Met ფოსფორილების მაქსიმალური სტიმულაციის ინჰიბირების პროცენტი.

ფიგურებზე 13A და 13B, ნაჩვენებია c-Met დიმერიზაციისა და აქტივაციის BRET მოდელები.

ფიგურაზე 14A ნაჩვენებია აგონისტური ეფექტი, გამოთვლილი როგორც პროცენტი HGF-ით [100 ნგ/მლ] გამოწვეული c-Met ფოსფორილების მაქსიმალურ სტიმულაციასთან შედარებით.

ფიგურაზე 14B ნაჩვენებია ანტაგონისტური ეფექტი, გამოთვლილი როგორც HGF-ით [100 ნგ/მლ] გამოწვეული c-Met ფოსფორილების მაქსიმალური სტიმულაციის ინჰიბირების პროცენტი.

ფიგურაზე 15 ნაჩვენებია c-Met დიმერიზაციისა და აქტივაციის BRET მოდელები.

ფიგურა 16: Mab 214B2-ის სხვადასხვა ფორმების PC3 უჯრედების ადჰეზიაზე ზეგავლენის მიკროსკოპული ანალიზი.

ფიგურა 17: Mab 214B2-ის სხვადასხვა ფორმების PC3 უჯრედების ადჰეზიაზე ზეგავლენის ანალიზი ATP-ანალიზის გამოყენებით. თითოეულ ფოსოში ადჰეზირებული უჯრედები განსაზღვრული იყო PC3 სტანდარტული

მრუდების გამოყენებით, 0-დან 200 000-მდე უჯრედი/ფოსოზე. შედეგები შემდეგნაირად არის წარმოდგენილი: დაუმუშავებელი უჯრედები მიღებულია ეტალონად (100%), ხოლო დამუშავებული უჯრედები – როგორც ეტალონურის პროცენტი.

მაგალითი 1: ქიმერული Mab-ების კონსტრუირება და c-Met რეცეპტორის ფოსფორილების სტატუსის ფუნქციური შეფასება

თაგვის რამოდენიმე Mab, რომლების სამიზნე იყო პროტოტიპული ტიროზინ კინაზას რეცეპტორი (c-Met რეცეპტორი), რეფორმირებულ იქნა ქიმერულ Mab-ებად, რომლებიც ატარებდა თაგვის ვარიანტულ დომენებს და ადამიანის მუდმივ დომენებს. მათი შიგა აქტივობა გაანალიზებული იყო ფუნქციურ ანალიზზე დაყრდნობით, რომელიც აკონტროლებდა ლიგანდ (HGF)-დამოკიდებულ c-Met რეცეპტორის ფოსფორილებას.

თაგვის ვარიანტული დომენის თანამიმდევრობების (VH, VL) PCR-კლონირების შემდეგ ქიმერული Mab-ები კონსტრუირებული იყო თაგვის VH ან VL თანამიმდევრობების მატარებელი {*Nhe1-Bcl1*} რესტრიქციის ფრაგმენტის ლიგირებისას pCEP4 ვექტორში (Invitrogen, US), რომელიც ატარებდა IgG1 იმუნოგლობულინის ადამიანის მსუბუქი ჯაჭვის Cკაპა ან ადამიანის მძიმე ჯაჭვის [CH1-სახსარი-CH2-CH3] მუდმივი დომენის მთლიან მაკოდირებელ თანამიმდევრობას. კლონირების ყველა ეტაპი შესრულებული იყო ჩვეულებრივი მოლეკულური ბიოლოგიის ტექნიკის მიხედვით, რომელიც აღწერილია ლაბორატორიულ სახელმძღვანელოში (Sambrook and Russel, 2001) ან მომწოდებლის ინსტრუქციების მიხედვით. თითოეული გენეტიკური ნაგებობა სრულად იყო შემოწმებული ნუკლეოტიდების თანამიმდევრობის განსაზღვრის საშუალებით Big Dye terminator cycle კომპლექტით (Applied Biosystems, US) და ანალიზირებული 3100 Genetic Analyzer-ის გამოყენებით (Applied Biosystems, US). შესაბამისი ქიმერული Mab-ების წარმოება სრულდებოდა სუსპენზია-ადაპტირებულ HEK293 EBNA უჯრედების გამოყენებით (Invitrogen, US), რომლებიც გაზრდილი იყო შრატისგან თავისუფალ მკვებავ გარემოში Excell 293 (SAFC Biosciences), რომელშიც ჩამატებული იყო 6 მმოლი გლუტამინი. დროებითი ტრანსფექცია განხორციელებული იყო ხაზოვანი 25 კდალტონი პოლიეთილენიმიდის (PEI)

(Polyscience) გამოყენებით. კულტივაციის პროცესის მონიტორინგი ხდებოდა უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობისა და Mab წარმოების საფუძველზე. Mab-ები გასუფთავებულ იქნა ჩვეულებრივი ქრომატოგრაფიის მეთოდის გამოყენებით პროტეინ A ფისზე (GE Healthcare, US).

Mab-ების ყველა განსხვავებული ფორმა წარმოებული იყო ფუნქციური ანალიზისათვის შესაფერის დონეზე. წარმოების დონე ტიპიურად რეგულირდება სუფთა Mab-ის 15 და 30 მგ/ლ შორის.

ფუნქციური ანალიზი სრულდებოდა ადამიანის ფილტვის კიბოს უჯრედებზე. c-Met რეცეპტორის ფოსფორილების სტატუსის მონიტორინგი მიმდინარეობდა უჯრედების ლიზატზე სპეციფიკური ჩამჭერი ELISA ანალიზის გამოყენებით. თხის ანტი-c-Met Mab (R&D, ref AF276) იყო გამოყენებული ჩამჭერ ანტისხეულად, ხოლო დეტექტირების ანტისხეული შეესაბამებოდა ანტი-ფოსფო-c-Met Mab-ს (Biosource ref KHO0281). ლუმინესცენციის ანათვლები რეგისტრირდებოდა Mithras LB920 მრავალტიპიანი პეტრის თასის რეგისტრატორის მეშვეობით (Berthold).

თავის სამივე Mab 11E1, 224G11 და 227H1 ამჟღავნებდა შესადარ შიგა აქტივობას c-Met რეცეპტორის ფოსფორილებაზე: თითქმის არავითარი საკუთარი აგონისტური აქტივობა (HGF ეფექტის 5%-ზე ნაკლები, ფიგურა 1A) და HGF-ით (100 ნგ/მლ) ინდუცირებული c-Met რეცეპტორის ფოსფორილების ძლიერი ინჰიბირება (HGF ეფექტის 70%-ზე მეტით ინჰიბირება, ფიგურა 1B). გასაოცარია, მაგრამ თავის IgG1/კაპადან ადამიანის IgG1/კაპაზე გადართვისათვის Mab-ის მხოლოდ მუდმივი დომენის მოდიფიცირებით აღნიშნულ იქნა შედეგად მიღებული ქიმურული Mab-ების შიგა აქტივობის სრული მოდიფიკაცია (ფიგურები 1A-1B). მართლაც, აღინიშნებოდა ანტაგონისტური ეფექტურობის მნიშვნელოვან კლებასთან (c224G11-თვის HGF ეფექტის მხოლოდ ნარჩენი 60%, ფიგურა 1B) ასოცირებული მძლავრი აგონიზმი (c11E1-თვის HGF ეფექტის 20% აღწევს, ფიგურა 1A). ეს ეფექტი არ არის დამოკიდებული ანტისხეულის ვარიანტულ დომენზე, რადგანაც მსგავსი მოვლენა აღინიშნებოდა სამივე გამოკვლეული Mab-სთვის (11E1, 224G11 და 227H1 მონოკლონური ანტისხეულები სეკრეტირებული იყო Collection Nationale de Cultures Microorganismes (CNCM) – მიკროორგანიზმების კულტურების ეროვნულ კოლექციაში (Institut Pasteur, Paris, France) ნომრებით CNCM I-3724

(შეესაბამება 11E1-ს), I-3731 (შეესაბამება 224G11-ს) და I-3732 (შეესაბამება 227H1-ს), დეპონირებული ჰიბრიდომას საშუალებით (იხილეთ პატენტის განაცხადი გამოქვეყნებული ნომრით WO 2009/007427).

მაგალითი 2: ინჟინირებული სახსრული უბნის ვერსიების დიზაინი, კლონირება და წარმოება

ზემოთ აღწერილი დაკვირვებების საფუძველზე, გამოთქმულ იქნა ჰიპოთეზა, რომ თავის IgG1-ის ადამიანის IgG1 Mab-ში რეფორმირებისას აღნიშნული ფარმაკოლოგიური პროფილის გაუარესება განპირობებული იყო ადამიანის IgG1 დომენით.

ერთის მხრივ, ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ c-Met რეცეპტორის აქტივაცია ასოცირებულია მის დიმერიზაციასთან, და რომ c-Met რეცეპტორის დიმერიზაციის ინჰიბირებამ შეიძლება მოახდინოს c-Met რეცეპტორის ფოსფორილებისა და ქვემოთკენ სიგნალიზაციის ინჰიბირება.

მეორეს მხრივ, Mab-ები არსით ორვალენტიანი მოლეკულებია თავიანთი თანდაყოლილი სტრუქტურიდან გამომდინარე და, ამრიგად, ისინი შეიძლება მოქმედებდნენ როგორც c-Met რეცეპტორის დიმერიზაციის მაინდუცირებლები.

ამიტომ, გამოთქმულ იქნა ჰიპოთეზა, რომ ქიმერული Mab-ების კონფორმაციული დრეკადობის, როგორცაა ბრუნვა, მოღუნვა ან ქნევა (იხილეთ Roux et al., 1997) შეზღუდვის საშუალებით შესაძლებელი იქნებოდა საწყისი თავის Mab-ების ჩვენთვის საინტერესო შიგა აქტივობების აღდგენა (მძლავრი ანტაგონიზმის და სუსტი აგონიზმის). ეს ჰიპოთეზა განმტკიცებული იყო თავისა და ადამიანის IgG1 სახსრული უბნების (მოიხსენიება ასევე, როგორც IgG1 H-უბანი) შესაბამისი თანამიმდევრობების ანალიზით.

თავის IgG1 H-უბანი	PRDCGCKPCICT	(SEQ ID No.1)
ადამიანის IgG1 H-უბანი	PKSCDKTHTCPPCP	(SEQ ID No.11)
ადამიანის IgG2 H-უბანი	RKCCVECPCP	(SEQ ID No.7)

ამ განლაგებით ნაჩვენებია, რომ თავის IgG1 H-უბანი უფრო მოკლეა და შეიცავს ერთ დამატებით დისულფიდურ ხიდს (Cys) ადამიანის IgG1 H-უბანთან შედარებით. ასევე ჩანს, რომ ადამიანის IgG2 H-უბანი წააგავს თავის IgG1 H-უბანს, როგორც სიგრძით (11AA), ისე დისულფიდური ხიდების რიცხვით (4).

ამიტომ, გამოთქმულ იქნა მოსაზრება, რომ ადამიანის IgG1 H-უბანის სიხისტის გაზრდა შესაძლებელი იქნებოდა მასტაბილიზირებელი მუტაციების, როგორიცაა Cys ნაშთების შეყვანა, და/ან ამ ცალკე სეგმენტის დამოკლების საშუალებით. H-უბნის სიხისტის ეს სავარაუდო გაზრდა შეიძლება ასოცირებულ იქნეს ინჟინერიით მიღებული ადამიანის IgG1 Mab-ის გაუმჯობესებულ ფუნქციურ თვისებებთან.

გენური ინჟინერიით მიღებული პირველი 7 ვერსიის სერიები დაპროექტებულ იქნა (ცხრილი 2) ქიმერული H-უბნების შექმნით ადამიანისა და თაგვის ანტისხეულების თანამიმდევრობებს შორის N-ტერმინალური ან C-ტერმინალური სახსრული ნაწილების გაცვლის შედეგად. შესრულებულ იქნა აგრეთვე IgG2 ეკვივალენტის კონსტრუქცია.

ცხრილი 2

WT-IgG2	WT-IgG ₁		ვარიანტები					
Hu-IgG ₂	Hu-IgG ₁	Mu-IgG ₁	MH-IgG ₁	MMCH-IgG ₁	MMH-IgG ₁	MUP9H-IgG ₁	MUC7H-IgG ₁	TH7CA6,9-IgG ₁
-	P	P	P	P	P	P	P	P
R	K	R	R	K	K	R	R	K
K	S	D	D	S	S	D	D	S
C	C	C	C	C	C	C	C	C
-	D	G	G	G	G	G	G	D
-	K	-	-	-	-	-	-	-
C	T	C	C	C	C	C	C	C
V	H	K	K	K	K	K	H	H
E	T	P	P	P	P	P	T	-
C	C	C	C	C	C	C	C	C
P	P	I	I	I	I	P	P	P
P	P	-	-	-	-	P	P	P
C	C	C	C	C	C	C	C	C
P	P	T	T	T	P	P	P	P

დაპროექტებულ და კონსტრუირებულ იქნა H-უბანში 28 მუტანტის დამატებითი სერია იმისათვის, რომ შეფასებული ყოფილიყო H-უბანში ერთი დამატებითი ცისტეინის ნაშთის შეტანის ან, სულ მცირე, ერთი მაინც ამინომჟავას დელეციის, ან ერთდროულად ერთი ცისტეინის დამატებისა და, სულ მცირე, ერთი მაინც ამინომჟავას დელეციის ერთობლივი ზეგავლენა.

სახსრული უბნის მუტანტების ეს ახალი სერია აღწერილია ცხრილში 3.

ცხრილი 3

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14
C1	C	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C2	P	C	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C3	P	K	C	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C5	P	K	S	C	C	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C6	P	K	S	C	D	C	T	H	T	C	P	P	C	P
C7	P	K	S	C	D	K	C	H	T	C	P	P	C	P
C8	P	K	S	C	D	K	T	C	T	C	P	P	C	P
C9	P	K	S	C	D	K	T	H	C	C	P	P	C	P
C11	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	C	P	C	P
C12	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	C	C	P
C14	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	C
Δ2	P	-	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ6	P	K	S	C	D	-	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ9	P	K	S	C	D	K	T	H	-	C	P	P	C	P
Δ1-3	-	K	-	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ2-5	P	-	S	C	-	K	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ6-9	P	K	S	C	D	-	T	H	-	C	P	P	C	P
Δ5-6	P	K	S	C	-	-	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ8-11	P	K	S	C	D	K	T	-	T	C	-	P	C	P
Δ9-14	P	K	S	C	D	K	T	H	-	C	P	P	C	-
C7Δ6	P	K	S	C	D	-	C	H	T	C	P	P	C	P
C6Δ9	P	K	S	C	D	C	T	H	-	C	P	P	C	P
C2Δ5-7	P	C	S	C	-	K	-	H	T	C	P	P	C	P
C5Δ2-6	P	-	S	C	C	-	T	H	T	C	P	P	C	P
C9Δ2-7	P	-	S	C	D	K	-	H	C	C	P	P	C	P
Δ4-5-6	P	K	S	-	-	-	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ5-6-7-8	P	K	S	C	-	-	-	-	T	C	P	P	C	P
IgG1/IgG2	P	K	S	C	D	K	C	V	E	C	P	P	C	P

სახსრული უბნის ინჟინერიის ნიმუშად არჩეული იყო თავის ანტი-c-Met Mab-ის, რომელსაც 224G11 ეწოდება, ვარიანტური დომენი (მძიმე და მსუბუქი ჯაჭვები).

თავის ანტისხეულის ეს თანამიმდევრობები ჯერ შერწყმულ იქნა ადამიანის ანტისხეულის მუდმივ დომენებთან [Ckappa] მსუბუქი ჯაჭვისათვის და [CH1-სახსარი-CH2-CH3] ადამიანის IgG1 მძიმე ჯაჭვისათვის. სახსრული უბნის მოდიფიკაცია შესრულებული იყო {NheI-BclI} რესტრიქციის

ფრაგმენტის შეცვლით სასურველი მოდიფიკაციის მატარებელი ეკვივალენტური წილით, ამასთან ყოველი შესაბამისი {NheI-BclI} ფრაგმენტი სინთეზირებული იყო გენების გლობალური სინთეზის საშუალებით (Genecust, LU). სახსრული უბნის ყველა ახალი მუტანტი კონსტრუირებული იყო იგივე საფუძველზე.

კლონირების ყველა ეტაპი სრულდებოდა ჩვეულებრივი მოლეკულურ ბიოლოგიური ტექნიკის მიხედვით, როგორც აღწერილია ლაბორატორიულ სახელმძღვანელოში (Sambrook and Russel, 2001) ან მომწოდებლის ინსტრუქციების მიხედვით. ყოველი გენეტიკური კონსტრუქცია სრულად იყო შემოწმებული ნუკლეოტიდების თანამიმდევრობების განსაზღვრის საშუალებით Big Dye ტერმინატორული ციკლის თანამიმდევრობის განმსაზღვრელი კომპლექტის დახმარებით (Applied Biosystems, US) და ანალიზირებული 3100 Genetic Analyzer-ის გამოყენებით (Applied Biosystems, US).

სუსპენზია-ადაპტირებული HEK293 EBNA უჯრედები (Invitrogen, US) ჩვეულებრივ იქნა გაზრდილი 250 მლ-იან კოლბებში 50 მლ შრატისაგან თავისუფალ გარემოში Excell 293 (SAFC Biosciences), რომელშიც დამატებული იყო 6 მმოლი გლუტამინი ორბიტალურ შეიკერზე (110 ციკლი წუთში (rpm) ბრუნვის სიჩქარე). ტრანსიტიული ტრანსფექცია შესრულებული იყო 2.10^6 უჯრედი/მლ ხაზოვანი 25 კდალტონი პოლიეთილენიმინის (PEI) გამოყენებით (Polysciences), რომელიც დამზადებული იყო წყალში საბოლოო კონცენტრაციით 1 მგ/მლ და პლაზმიდის μm -ის გამოყენებით (საბოლოო კონცენტრაცია 1.25 მკგ/მლ, მძიმე ჯაჭვის მსუბუქ ჯაჭვთან პლაზმიდის შეფარდებისათვის 1:1). ტრანსფექციიდან 4 საათის შემდეგ კულტურა განზავებულ იქნა ახალი მკვებავი გარემოს ერთი მოცულობით, რათა მიღებული ყოფილიყო უჯრედების საბოლოო სიმკვრივე 10^6 უჯრედი/მლ. კულტივაციის პროცესის მონიტორინგი მიმდინარეობდა უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობისა და Mab-ის წარმოების საფუძველზე. ჩვეულებრივ, კულტურები ინახებოდა 4-დან 5 დღემდე. Mab-ები სუფთავდებოდა ჩვეულებრივი ქრომატოგრაფიული მეთოდის გამოყენებით Protein A ფისზე (Ge Healthcare, US).

Mab-ების ყველა სხვადასხვა ფორმა იწარმოებოდა ფუნქციური შეფასებისათვის შესაფერის დონეზე. გასუფთავებული Mab-ების წარმოების დონეები ჩვეულებრივ არის 15-დან 30 მკ/ლ-მდე ფარგლებში.

მაგალითი 3: ინჟინერიით მიღებული Mab-ების შეფასება ფოსფო-c-Met-სპეციფიკურ ELISA ანალიზში

A549 უჯრედები დათესილ იქნა 12 მრავალფოსოიან (MW) თასში ზრდის სრულ მკვებაზე გარემოში [F12K+10% FCS]. HGF-ით [100 ნგ/მლ] სტიმულაციამდე 16 საათით ადრე უჯრედები აშიმშილეს და ლიგანდით სტიმულაციამდე 15 წუთით ადრე მათ დაემატა თითოეული სატესტო Mab 30 მკგ/მლ საბოლოო კონცენტრაციით. დამატებულ იქნა ყინულით გაცივებული ლიზისის ბუფერი HGF-ის დამატებიდან 15 წუთის შემდეგ, რათა შეეჩერებინათ ფოსფორილების რეაქცია. უჯრედები აფხევილ იქნა მექანიკურად და უჯრედების ლიზატი მოგროვებულ იქნა ცენტრიფუგირების საშუალებით 13000 ციკლი წუთში (rpm) ბრუნვის სიჩქარით 10 წუთში და 4°C ტემპერატურის პირობებში და იგი შეესაბამებოდა სუპერნატანტის ფაზას. პროტეინის შემცველობა გამოთვლილ იქნა BCA კომპლექტის (Pierce) გამოყენებით და გამოყენებამდე გააჩერეს -20°C ტემპერატურაზე. c-Met-ის ფოსფორილების სტატუსი დადგენილ იქნა ELISA-ს საშუალებით. თხის ანტი-c-Met Mab (R&D, ref AF276) იყო გამოყენებული ჩამჭერ ანტისხეულად (ლამის განმავლობაში გადაფარვა 4°C-ზე) და TBS-BSA-5%-იანი ბუფერით გაჯერების საფეხურის შემდეგ (1 საათი ოთახის ტემპერატურაზე (RT)), დამატებულ იქნა 25 მკგ პროტეინის ლიზატებისა გადაფარულ 96MW თასის ყოველ ფოსიში. ოთახის ტემპერატურაზე (RT) 90 წუთის განმავლობაში ინკუბაციის შემდეგ, თასები გაირეცხა ოთხჯერ და დამატებულ იქნა დეტექტირების ანტისხეული (ანტი-ფოსფო-c-Met Mab, მიმართული ფოსფორილებული Tyr ნაშთების წინააღმდეგ პოზიციებზე 1230, 1234 და 1235). დამატებითი 1 საათიანი ინკუბაციისა და 4 გარეცხვის შემდეგ, დამატებულ იქნა ანტი-ბოცვერის ანტისხეული შეუღლებული HRP-თან (Biosource), 1 საათის განმავლობაში RT-ზე, ხოლო ლუმინესცენციის დეტექტირება ხორციელდებოდა Luminol-ის დამატების საშუალებით. ლუმინესცენციის ანათვლები რეგისტრირდებოდა Mitras LB920 მრავალტიპიან თასების რეგისტრატორზე (Berthold).

c-Met რეცეპტორის ფოსფორილების ცდაში კონსტრუირებულ და გაანალიზებულ იქნა მძიმე ჯაჭვის სახსრული დომენის ინჟინერიით მიღებული ვერსიების სერიები. როგორც ფიგურაზე 2A არის ნაჩვენები, 224G11[IgG1-Chim]-თან შედარებით აღინიშნებოდა hIgG1/კაპა იზოტიპთან ასოცირებული აგონისტური ეფექტის მნიშვნელოვანი შემცირება ორივე IgG2-დაფუძნებულ კონსტრუქციისათვის და ინჟინერიით მიღებული ზოგიერთი კონსტრუქციისათვის [MH, MUP9H და TH7, ფიგ.2A]. ყველაზე სუსტი და შესადარი აგონისტური აქტიურობა აღენიშნა 224G11[MH-IgG1]-ს, რომელიც შეიცავს თავის IgG1-ის სრულ სახსრულ უბანს და 224G11[TH7]-ს, რომელიც შეიცავს გენური ინჟინერიით მიღებული ადამიანის IgG1-ის უმეტეს სახსრულ უბანს. მიღებულ იქნა აგრეთვე ანტაგონისტური ეფექტურობის თანმდევით ზრდა [ფიგ.2B]. ამრიგად, ორივე, IgG2-დაფუძნებული და ინჟინერიით მიღებული hIgG1/კაპა-დაფუძნებული TH7 მუტანტი, ასოცირებული თავის 224G11 ვარიანტულ დომენთან, ამჟღავნებს ფუნქციურ აქტივობას, რომელიც თითქმის მსგავსია თავის 224G11 Mab-ის ფუნქციური აქტივობისა. თუმცა, 224G11[MMCH-IgG1-chim]-ის 224G11[IgG1-chim]-თან აგონისტურ/ანტაგონისტური აქტივობების შედარებამ აჩვენა, რომ გაზრდილი ანტაგონისტური აქტივობის მიღება შესაძლებელი იქნებოდა ანტისხეულის ინჟინერიით, დამოუკიდებლად ამ ანტისხეულის დამახასიათებელი აგონისტური თვისებებისგან.

მძიმე ჯაჭვის სახსრული დომენის ინჟინერიით მიღებული ვერსიების მეორე სერია კონსტრუირებულ და გაანალიზირებულ იქნა c-Met რეცეპტორის ფოსფორილების ცდაში. როგორც ფიგ.11A-დან ჩანს, ამინომჟავას ჩანაცვლება მძიმე ჯაჭვის სახსრულ დომენში ცისტეინის ნაშთების შეტანით, ახდენს ანტისხეულების აგონისტური ეფექტის მოდიფიცირებას. მართლაც, ერთის მხრივ, ზოგიერთი მუტანტი ვერსია ამჟღავნებს უფრო სუსტ აგონისტურ ეფექტს, ვიდრე c224G11, როგორც მაგალითად, c224G11[C2], c224G11[C3], c224G11[C5], c224G11[C6] ან c224G11[C7], მაშინ როცა სხვები ავლენენ გაზრდილ აგონისტურ ეფექტს, მაგალითად, c224G11[C11], c224G11[C12] და c224G11[C14]. გარდა ამისა, ამინომჟავების დელეციაც მძიმე ჯაჭვის სახსრულ უბანში, დამოუკიდებლად იმისგან ასოცირებულია იგი თუ არა ამინომჟავას ჩანაცვლებასთან, ასევე ახდენს ანტისხეულების აგონისტური თვისებების მოდიფიცირებას [ფიგ.11B]. მაგალითად, c224G11[Δ1-3], c224G11[Δ4-5-6],

c224G11[Δ5-6-7-8], c224G11[C7Δ6], c224G11[C6Δ9], c224G11[C2Δ5-7], c224G11[C5Δ2-6] ან c224G11[C9Δ2-7]-მა აჩვენეს უფრო სუსტი აგონისტური ეფექტი, ვიდრე c224G11-მა, ხოლო c224G11[Δ8-11]-მა აჩვენა უფრო ძლიერი აგონისტური ეფექტი. ისევე, როგორც c224G11[TH7] შემთხვევაში, ყველა ახალი ვერსია, რომელიც ამჟღავნებს უფრო სუსტ აგონისტურ ეფექტს, აჩვენებს ანტაგონისტური ეფექტურობის თანმდევ ზრდას [ფიგურები 12A და 12B], მაშინ როცა უფრო ძლიერი აგონისტური ეფექტის მქონე ანტისხეულებს გააჩნიათ უფრო სუსტი ანტაგონისტური ეფექტურობა.

მოცემულ განაცხადში კუთხური ფრჩხილების გამოყენება არ არის აუცილებელი და, მაგალითისათვის, აღნიშვნა [224G11][IgG2chim] უნდა ჩაითვალოს 224G11IgG2chim-ის იდენტურად. ასევე, იმის მითითებისათვის რომ ანტისხეული არის თავის ანტისხეული, შეიძლება დანატებული იქნეს სიტყვა “თავის” ან ასო m; იმის მითითებისათვის, რომ ანტისხეული არის ქიმერული ანტისხეული შეიძლება დამატებულ იქნეს chim ან ასო c; და იმის მითითებისათვის, რომ ანტისხეული არის ჰუმანიზებული ანტისხეული, შეიძლება დამატებულ იქნეს გამოსახულება hum ან ასო h. მაგალითისათვის, ქიმერული ანტისხეული 224G11IgG2 შეიძლება აღნიშნული იყოს როგორც c224G11IgG2, c224G11[IgG2], c[224G11]IgG2, c[224G11][IgG2], 224G11IgG2chim, 224G11[IgG2chim], [224G11]IgG2chim ან [224G11][IgG2chim].

სიმბოლო Δ აღნიშნავს დელეციას.

მაგალითი 4: BRET ანალიზი

ექსპერიმენტების პირველ კომპლექტში კონტროლირდებოდა, რომ შეუსაბამო თავის IgG1, ადამიანის IgG1 და ადამიანის IgG2-ს არავითარი გავლენა არ ჰქონდა HGF-ით ინდუცირებულ BRET სიგნალზე ორივე BRET მოდელში (ფიგ.3). ეს Mab-ები შემდგომ გამოყენებული იყო როგორც კონტროლი.

შემდეგ შეფასებულ იქნა თავის 224G11 Mab ([224G11]chim), თავის 11E1 Mab ([11E1]chim) და თავის 227H1 Mab ([227H1]chim) IgG1-ის ქიმერული ფორმების გავლენა c-Met-ის დიმერიზაციასა და აქტივაციაზე BRET მოდელში.

მაშინ როცა, თავის 224G11 Mab ახდენს HGF-ით ინდუცირებული BRET სიგნალის 59% ინჰიბირებას c-Met დიმერიზაციის მოდელში, [224G11]chim Mab

ინჰიბირებს მხოლოდ 29% (ფიგ.4). [224G11]chim ანტისხეული ასევე ნაკლებად ეფექტურია HGF-ით ინდუცირებულ c-Met აქტივაციაში, ვინაიდან [224G11]chim და m224G11 ანტისხეულები ახდენენ HGF ინდუცირებული BRET სიგნალის ინჰიბირებას 34.5% და 56.4% (ფიგ.5). გარდა ამისა, ცალკე მხოლოდ m224G11-ს არავითარი გავლენა არ ჰქონდა c-Met აქტივაციაზე, მაშინ როცა, [224G11]chim-მა გამოამჟღავნა ნაწილობრივი აგონისტური ეფექტი c-Met აქტივაციაზე, რაც შეესაბამებოდა 32.9% HGF-ით ინდუცირებული სიგნალისა. [224G11]chim-ის ეს ნაწილობრივი აგონისტური ეფექტი ასევე გამოჩნდა c-Met დიმერიზაციის BRET მოდელზე, რადგან [224G11]chim მარტო ინდუცირებდა BRET სიგნალის ზრდას, რაც შეესაბამებოდა HGF-ით ინდუცირებული სიგნალის 46.6% შედარებით 21.3%-თან m224G11-თვის.

მძიმე ჯაჭვის სახსრული დომენის გენური ინჟინერიით მიღებული ვერსიების მეორე სერიის აგონისტური ეფექტურობა შეფასებულ იქნა c-Met აქტივაციის BRET მოდელში (ფიგურები 13A და 13B). c224G11-ის საპირისპიროდ, რომელსაც გააჩნდა ნაწილობრივი აგონისტური ეფექტი c-Met აქტივაციაზე, 224G11 ანტისხეულის სახსარის სხვადასხვა მუტაციის ქიმერულ ფორმებს, რომლებიც შეიცავდა ამინომჟავას ჩანაცვლებას, ამინომჟავას დელეციას, ან ორივეს, არ გააჩნდა მნიშვნელოვანი გავლენა cMet აქტივაციაზე, ესენია: c224G11[C2], c224G11[C3], c224G11[C5], c224G11[C6], c224G11[C7], c224G11[Δ1-3], c224G11[Δ4-5-6], c224G11[Δ5-6-7-8], c224G11[C7Δ6], c224G11[C6Δ9], c224G11[C2Δ5-7], c224G11[C5Δ2-6] ან c224G11[C9Δ2-7]. საპირისპიროდ, სახსარის მუტაციით მიღებულმა სხვა ქიმერულმა ფორმებმა აჩვენეს გაზრდილი აგონისტური ეფექტი, ესენია: c224G11[Δ6], c224G11[C11], c224G11[C12] და c224G11[C14].

მაგალითი 5: c-Met-ის ამოცნობა ქიმერული და ჰუმანიზებული 224G11 ფორმების მიერ

რეკომბინანტულ c-Met-ზე სხვადასხვა ქიმერული და ჰუმანიზებული ფორმების ბმის უნარის განსაზღვრის მიზნით ჩატარებულ იქნა პირდაპირი ELISA. ცდის მოკლე აღწერილობა შემდეგია: რეკომბინანტული დიმერული c-Met, მიღებული R&D Systems-დან, 1.25 მკგ/მლ, დაფარულ იქნა 96 ფოსოიან Immunlon II თასებზე. ღამის განმავლობაში ინკუბაციის შემდეგ 4°C

ტემპერატურის პირობებში, ფოსოები გაჯერებულ იქნა 0.5% ჟელატინი/PBS ხსნარით. ამის შემდეგ სატესტო ანტისხეულების ორჯერადად განზავებული ხსნარების დამატებამდე, თასები ინკუბირებულ იქნა 1 საათის განმავლობაში 37°C ტემპერატურის პირობებში. თავის ანტისხეულის დეტექტირებისათვის თხის ანტი-თავი IgG HRP-ს დამატებამდე და ქიმერული და ჰუმანიზებული ანტისხეულის ამოცნობის მიზნით თხის ანტი-ადამიანი Kappa მსუბუქი ჯაჭვის HRP-ს დამატებამდე თასები ინკუბირებულ იქნა დამატებითი ერთი საათის განმავლობაში. შემდეგ თასები ინკუბირებულ იქნა ერთი საათის განმავლობაში, რის შემდეგაც დამატებულ იქნა პეროქსიდაზას სუბსტრატი TMB Uptima 5 წუთის განმავლობაში 1 მოლი H₂SO₄-ით ნეიტრალიზაციამდე. შედეგები მოცემულია ფიგურებზე 6A და 6B, რომლებიდანაც ჩანს, რომ ყველა ტესტირებული ფორმა შესაძარია c-Met ამოცნობისათვის.

მაგალითი 6: თავისა და ქიმერული ანტისხეულების გავლენა HGF-ინდუცირებული NCI-H441 უჯრედების პროლიფერაციაზე *in vitro*

NCI-H441 უჯრედები ATCC-დან ჩვეულებრივ იქნა კულტივირებული RPMI 1640 მკვებაჲ გარემოში (Invitrogen Corporation, Scotland, UK), 10% FCS-ში (Invitrogen Corporation), 1% L-გლუტამინში (Invitrogen Corporation). პროლიფერაციის ცდებისათვის გამოყენებამდე 3 დღით ადრე უჯრედები დაყოფილ იქნა ისე, რომ დათესვის წინ ისინი იმყოფებოდნენ მთლიანი ზრდის ფაზაში. NCI-H441 უჯრედები დათესილ იქნა 96 ფოსოიან, ქსოვილის კულტივირებისათვის განკუთვნილ თასებში სიმკვრივით 3.75×10^4 უჯრედი/ფოსოზე, 200 მკლ უშრატო გარემოში (RPMI 1640 მკვებაჲ გარემო პლუს 1% L-გლუტამინი). დათესვიდან 24 საათის შემდეგ, სატესტო ანტისხეულები დამატებულ იქნა NCI-H441 უჯრედებზე და ინკუბირებულ იქნა 37°C ტემპერატურის პირობებში, 30 წუთის განმავლობაში მანამ, სანამ დამატებული იქნებოდა HGF საბოლოო კონცენტრაციით 400 ნგ/მლ (5 ნმოლი) დამატებითი 142 საათის განმავლობაში. თითოეული ანტისხეულისათვის ტესტირებული დოზების დიაპაზონი იყო 10-დან 0.0097 მკგ/მლ-მდე (საბოლოო კონცენტრაცია ყოველ ფოსოში). ამ ექსპერიმენტში თავის IgG1 Mab დამატებულ იქნა როგორც თავის იზოტიპის კონტროლი, ხოლო სატესტო ანტისხეულები იყო: m224G11, m11E1, m227H1 და მათი ადამიანის IgG1-ის

ქიმერული ფორმები, შესაბამისად აღნიშნული როგორც [224G11]chim, [11E1]chim და [227H1]chim. შეტანილ იქნა აგრეთვე მხოლოდ უჯრედებადთესილი ფოსოები $\pm$ HGF. შემდეგ უჯრედები 0.25 მიკროკიური (μ Ci) [3 H]თიმიდინთან (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) ერთად ინჯღრეოდა 7 საათისა და 30 წუთის განმავლობაში. [3 H]თიმიდინის რაოდენობა, რომელიც ჩართულ იქნა ტრიქლორმმარმუა-უხსნად dnm-ში, დათვლილ იქნა თხევადი სცინტილაციის გამოთვლის საშუალებით. შედეგები გამოსახულ იქნა როგორც არატრანსფორმირებული ციკლი წუთში (cpm) მონაცემები, რათა უკეთესად იქნეს შეფასებული პოტენციალური საკუთარი აგონისტური აქტივობა, რომელიც შეიძლება ახასიათებდეს ანტი-c-Met Mab-ებს, როდესაც ისინი ცალკე ემატება სიმსივნის უჯრედებს.

როგორც მოსალოდნელი იყო, ფიგურებზე 7A, 7B და 7C გამოსახული შედეგები გვიჩვენებს, რომ თავის ანტისხეულები კიბოს უჯრედებზე მარტო, ნებისმიერი სატესტო დოზით დამატებისას, არ ამჟღავნებს აგონისტურ ეფექტს. HGF-ინდუცირებულ პროლიფერაციაზე მნიშვნელოვან ზეგავლენას არ ჰქონდა ადგილი იზოტიპის კონტროლის მხრიდან, ამ ექსპერიმენტში ამ იზოტიპის კონტროლისათვის აღნიშნულ მაღალ ციკლი წუთში (cpm) ვარიაციებთან მიმართებაში. mIgG1 იზოტიპის კონტროლის Mab-თან ან მხოლოდ უჯრედებთან შედარებით, ცალკე დამატებისას არც თავის m224G11, m11E1 ან m227H1 ანტისხეულები ამჟღავნებდნენ რაიმე აგონისტურ ეფექტს. დოზაზე დამოკიდებულმა ანტი-პროლიფერაციის აქტივობამ მიაღწია 78%, 80% ან 80% შესაბამისად m224G11, m11E1 ან m227H1 Mab-ებისთვის (ინჰიბირების % გამოთვლა: $100 - [(cpm \text{ უჯრედები} + Mab \text{ სატესტო-საშუალო cpm ფონის mIgG1}) \times 100 / (საშუალო cpm \text{ უჯრედები} + HGF\text{-საშუალო cpm მარტო უჯრედები})]$). გასაოცარია, მაგრამ ამ სამი Mab-ის ქიმერულ ფორმას აღნიშნება მნიშვნელოვანი, დოზაზე დამოკიდებული აგონისტური ეფექტის ინდუცირება ცალკე დამატებისას, ზრდის სტიმულაციით, რომელიც [11E1]chim და [227H1]chim-თვის ახლოს არის HGF-ით გამოწვეულ ზრდის სტიმულაციასთან. ამ 2 ანტისხეულისათვის, რომლებიც აჩვენებს განსაკუთრებით მაღალ საკუთარ აგონისტურ აქტივობას, ანტაგონისტური ეფექტი მნიშვნელოვნად შემცირებული იყო, აღინიშნებოდა 53% და 21% მაინჰიბირებელი ეფექტი შედარებით 80%-თან, რომელსაც ადგილი ჰქონდა

ორივე მათი თავის ფორმისათვის. აგონისტური ეფექტი, რომელიც აღინიშნებოდა ქიმერულ [224G11]chim-თვის ასევე დოზადამოკიდებულია, მაგრამ უფრო დაბალი, ვიდრე [11E1]chim და [227H1]chim-თვის აღნიშნული ეფექტი. თუმცა ამ აგონისტურ ეფექტს გავლენა ჰქონდა HGF-ინდუცირებულ პროლიფერაციის *in vitro* ინჰიბირებაზე, რომელმაც თავის m224H1-ის 78%-დან წაინაცვლა 50%-კენ მისი ქიმერული ფორმისათვის. იმის განსასაზღვრავად არის თუ არა ასეთი “უფრო დაბალი” *in vitro* საკუთარი აგონისტური აქტივობა თავსებადი უცვლელ *in vivo* ეფექტთან, ორივე m224G11 და [224G11]chim წარმოებულ იქნა *in vivo* ტესტირებისათვის. წინა კვლევების მსგავსად, 30 მკგ/თავი დოზამ აჩვენა მნიშვნელოვანი აქტივობა და ეს დოზა იქნა არჩეული *in vivo* შეფასებისათვის.

მაგალითი 7: NCI-H441 ქსენოტრანსპლანტანტის მოდელზე თავისა და ქიმერული 224G11 Mab-ების *in vivo* შედარება

NCI-H441 მიღებულ იქნა ფილტვის პაპილარული ადენოკარცინომიდან, მას აღინიშნებოდა c-Met-ის მაღალი დონეები და c-Met RTK-ს არსებითი ფოსფორილება.

NCI-H441 ქსენოტრანსპლანტანტურ მოდელზე ანტისხეულების *in vivo* ეფექტის შეფასებისათვის რვა კვირის ასაკის ექვსი თავი მოთავსებულ იქნა სტერილიზებულ, ფილტრით გადაფარულ გალიებში, რომლებიც სტერილურ პირობებში იმყოფებოდა და მანიპულირება მიმდინარეობდა ფრანგული და ევროპული ინსტრუქციების მიხედვით. თავებს კანქვეშ გაუკეთდათ 9×10^6 უჯრედის ინექცია. უჯრედების იმპლანტაციიდან 6 დღის შემდეგ სიმსივნეები გაზომვადი იყო (დაახლოებით 100 მმ³), ცხოველები დაიყო შესადარი ზომის სიმსივნეების მქონე 6 თავისაგან შედგენილ ჯგუფებად და მათი მკურნალობა დაიწყო 60 მკგ/თავი დარტყმითი დოზით და შემდეგ კვირაში ორჯერ კეთდებოდა ყოველი სატესტო ანტისხეულის 1 მგ/დოზა. თავებში ხდებოდა ქსენოტრანსპლანტანტის ზრდის დაკვირვება. სიმსივნის მოცულობა გამოითვლებოდა ფორმულით: $\pi(\text{Pi})/6 \times \text{სიგრძე} \times \text{სიგანე} \times \text{სიმაღლე}$. ფიგურაზე 8 გამოსახული შედეგები გვიჩვენებს, რომ თავის Mab, რომელსაც არ აღინიშნებოდა აგონისტური აქტივობა, როგორც მოსალოდნელი იყო, *in vivo* იქცეოდა როგორც ძლიერი ანტაგონისტი დაბალი სატესტო დოზის

შემთხვევაშიც. თავის Mab-თან დაკავშირებით აღნიშნულის საპირისპიროდ, ქიმერული Mab ამუღავნებდა ძლიერ ტრანზიტულ *in vivo* აქტივობას და სიმსივნე სრულიად არ დაექვემდებარა მკურნალობას D20-ით უჯრედების ინექციის შემდეგ. ამ ექსპერიმენტით ნათლად არის ნაჩვენები, რომ *in vitro* აგონისტური ეფექტის ზრდა, რაც იწვევს ანტაგონისტური აქტივობის შემცირებას, ასევე სამართლიანია ანტაგონისტური აქტივობის *in vivo* მნიშვნელოვანი დანაკარგის თვალსაზრისით.

მაგალითი 8: NCI-H441 უჯრედების HGF-ინდუცირებულ პროლიფერაციაზე თავის 224G11 Mab-ის და ამ ანტისხეულის ქიმერული და ჰუმანიზებული სხვადასხვა ვერსიების *in vitro* ეფექტი

NCI-H441 უჯრედები ATCC-დან ჩვეულებრივ იქნა კულტივირებული RPMI 1640 მკვებავ გარემოში (Invitrogen Corporation, Scotland, UK), 10% FCS-ში (Invitrogen Corporation), 1% L-გლუტამინში (Invitrogen Corporation). პროლიფერაციის ცდებისათვის გამოყენებამდე 3 დღით ადრე უჯრედები დაყოფილ იქნა ისე, რომ დათესვის წინ ისინი იმყოფებოდნენ მთლიანი ზრდის ფაზაში. NCI-H441 უჯრედები დათესილ იქნა 96 ფოსოიან, ქსოვილის კულტივირებისათვის განკუთვნილ თასებში სიმკვრივით 3.75×10^4 უჯრედი/დრემულზე 200 მკლ უშრატო გარემოში (RPMI 1640 მკვებავი გარემო პლუს 1% L-გლუტამინი). დათესვიდან 24 საათის შემდეგ, სატესტო ანტისხეულები დამატებულ იქნა NCI-H441 უჯრედებზე და ინკუბირებულ იქნა 37°C ტემპერატურის პირობებში 30 წუთის განმავლობაში მანამ, სანამ დამატებული იქნებოდა HGF საბოლოო კონცენტრაციით 400 ნგ/მლ (5 ნმოლი) დამატებითი 142 საათის განმავლობაში. თითოეული ანტისხეულისათვის ტესტირებული დოზების დიაპაზონი იყო 10-დან 0.0097 მკგ/მლ-მდე (საბოლოო კონცენტრაცია ყოველ ფოსოში). ამ ექსპერიმენტში თავის IgG1 Mab დამატებულ იქნა როგორც თავის იზოტიპის კონტროლი და როგორც აგონისტური უარყოფითი კონტროლი. სატესტო ანტისხეულები იყო: i) m224G11, ii) მისი ადამიანის IgG1-ის ქიმერული ფორმები, რომლებიც შესაბამისად აღნიშნულია, როგორც [224G11]chim, [224G11][MHchim], [224G11][MUP9Hchim], [224G11][MMCHchim], [224G11][TH7chim] და iii) მისი ჰუმანიზებული ფორმები, რომლებიც აღნიშნულია, როგორც [224H1][Hz1],

[224H1][Hz2], [224H1][Hz3]. შეტანილ იქნა აგრეთვე მხოლოდ უჯრედებადათესილი ფოსოები +/- HGF. 5D5 მოლიანი ანტისხეული Genentech-იდან, რომელიც კომერციულად არის ხელმისაწვდომი ATTC-ში როგორც ჰიბრიდომას უჯრედების ხაზი, შეტანილ იქნა როგორც სრული აგონისტური დადებითი კონტროლი და შემდგომში აღინიშნება როგორც m5D5. შემდეგ უჯრედები 0.25 მიკროკიური (μCi) [^3H]თიმიდინთან (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) ერთად ინჯღროდა 7 საათისა და 30 წუთის განმავლობაში. [^3H]თიმიდინის რაოდენობა, რომელიც ჩართულ იქნა ტრიქლორმმარმუაჟ-უხსნად dnm-ში, დათვლილ იქნა თხევადი სცინტილაციის გამოთვლის საშუალებით. შედეგები გამოსახულ იქნა, როგორც არატრანსფორმირებული ციკლი წუთში (cpm) მონაცემები, რათა უკეთესად ყოფილიყო შეფასებული პოტენციალური საკუთარი აგონისტური აქტივობა, რომელიც შეიძლება ახასიათებდეს ანტი-c-Met Mab-ებს, როდესაც ისინი ცალკე ემატება სიმსივნის უჯრედებს.

ფიგურაზე 9A ასახულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ როგორც მოსალოდნელი იყო, არც იზოტიპის კონტროლს და არც m224G11-ს არ გამოუმჟღავნებია რაიმე აგონისტური აქტივობა NCI-H441 პროლიფერაციაზე. იზოტიპის კონტროლს HGF-ინდუცირებულ უჯრედების პროლიფერაციაზე არავითარი გავლენა არ ჰქონია, მაგრამ m224G11-ს აღმოაჩნდა 66% ინჰიბირების უნარი 10 მკგ/მლ საბოლოო კონცენტრაციით დამატებისას. m5D5-მა, რომელიც აგონისტ-კონტროლად იყო გამოყენებული, აჩვენა, როგორც მოსალოდნელი იყო, სრულად დოზაზე დამოკიდებული აგონისტური ეფექტი უჯრედებზე ცალკე დამატებისას. როგორც უკვე დაკვირვებული იყო, [224G11]chim Mab ამჟღავნებს მნიშვნელოვან დოზადამოკიდებულ აგონისტურ ეფექტს და შემცირებულ ინჰიბიტორულ აქტივობას: 19% ნაცვლად თავის ფორმის 66%-ისა. ცალკე დამატებისას სამი IgG1 ჰუმანიზებული Mab ამჟღავნებდა დოზადამოკიდებულ აგონისტურ ეფექტს m224G11 ფორმასთან შედარებით. [224G11][Hz1], [224G11][Hz2], [224G11][Hz3]-ს აღენიშნებათ შესადარი ანტაგონისტური აქტივობა, რომელიც დაახლოებით 46, 30 და 35% ტოლია. აქტივობის ეს სიდიდეები მნიშვნელოვნად ნაკლებია ვიდრე m224G11-თვის მიღებული აქტივობა. ფიგურაზე 9B გამოსახულია სხვადასხვა IgG1 ქიმერული ფორმების ტესტირების შედეგები. [224G11]chim ფორმასთან

შედარებით, რომელსაც NCI-H441 უჯრედებზე ცალკე დამატებისას აღნიშნება დოზადამოკიდებული აგონისტური ეფექტი, [224G11][MH chim], [224G11][MUP9H chim], [224G11][MMCH chim], [224G11][TH7 chim] ფორმებს არ აღმოაჩნდათ მნიშვნელოვანი აგონისტური ეფექტი. მათი ანტაგონისტური აქტივობა მეტი აღმოჩნდა, ვიდრე m224G11 Mab-ის ანტაგონისტური აქტივობა (57%), და ინჰიბირების სიდიდე იყო 79, 78, 84 და 93% შესაბამისად [224G11][MH chim], [224G11][MUP9H chim], [224G11][MMCH chim], [224G11][TH7 chim]-თვის.

მაგალითი 9: 224G11 Mab-ის სხვადასხვა IgG1 ქიმერული და ჰუმანიზებული ფორმის *in vitro* ეფექტი

NCI-H441 უჯრედები ATCC-დან ჩვეულებრივ იქნა კულტივირებული RPMI 1640 მკვებაზე გარემოში (Invitrogen Corporation, Scotland, UK), 10% FCS-ში (Invitrogen Corporation), 1% L-გლუტამინში (Invitrogen Corporation). პროლიფერაციის ცდებისათვის გამოყენებამდე 3 დღით ადრე უჯრედები დაყოფილ იქნა ისე, რომ დათესვის წინ ისინი იმყოფებოდა მთლიანი ზრდის ფაზაში. NCI-H441 უჯრედები დათესილ იქნა 96 ფოსოიან, ქსოვილის კულტივირებისათვის განკუთვნილ თასებში სიმკვრივით 3.75×10^4 უჯრედი/ფოსოზე 200 მკლ უშრატო გარემოში (RPMI 1640 მკვებაზე გარემო პლუს 1% L-გლუტამინი). დათესვიდან 24 საათის შემდეგ, სატესტო ანტისხეულები დამატებულ იქნა NCI-H441 უჯრედებზე და ინკუბირებულ იქნა 37°C ტემპერატურის პირობებში 30 წუთის განმავლობაში მანამ, სანამ დამატებული იქნებოდა HGF საბოლოო კონცენტრაციით 400 ნგ/მლ (5 ნმოლი) დამატებითი 142 საათის განმავლობაში. თითოეული ანტისხეულისათვის ტესტირებულული დოზების დიაპაზონი იყო 10-დან 0.0097 მკგ/მლ-მდე (საბოლოო კონცენტრაცია ყოველ ღრმულში). ამ ექსპერიმენტში თავის IgG1 Mab დამატებულ იქნა როგორც ფონის უარყოფითი კონტროლი აგონისტური აქტივობისათვის. სატესტო ანტისხეულები იყო: i) m224G11, ii) მისი ადამიანის IgG1-ის ქიმერული ფორმები, რომლებიც შესაბამისად აღნიშნულია, როგორც [224G11]chim, [224G11][TH7chim] iii) მისი ჰუმანიზებული IgG1 ფორმები, რომლებიც აღნიშნულია, როგორც [224G11][TH7 Hz1], [224G11][TH7 Hz3]. შეტანილ იქნა აგრეთვე მხოლოდ უჯრედებდათესილი ფოსოები +/- HGF. 5D5

მთლიანი ანტისხეული Genentech-დან, რომელიც კომერციულად არის ხელმისაწვდომი ATTC-ში როგორც ჰიბრიდომას უჯრედების ხაზი, შეტანილ იქნა როგორც სრული აგონისტური დადებითი კონტროლი და შემდგომში აღინიშნება როგორც m5D5. შემდეგ უჯრედები 0.25 მიკროკიური (μCi) [^3H]თიმიდინთან (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) ერთად ინჯეროდა 7 საათისა და 30 წუთის განმავლობაში. [^3H]თიმიდინის რაოდენობა, რომელიც ჩართულ იქნა ტრიქლორმმარმჟავა-უხსნად dnm-ში, დათვლილ იქნა თხევადი სცინტილაციის გამოთვლის საშუალებით. შედეგები გამოსახულ იქნა, როგორც არატრანსფორმირებული ციკლი წუთში (cpm) მონაცემები, იმისათვის, რომ უკეთესად ყოფილიყო შეფასებული პოტენციალური საკუთარი აგონისტური აქტივობა, რომელიც შეიძლება ახასიათებდეს ანტი-c-Met Mab-ებს, როდესაც ისინი ცალკე ემატება სიმსივნის უჯრედებს.

ფიგურაზე 10 ნაჩვენებია, რომ m224G11 Mab ამჟღავნებს ჩვეულებრივ ინჰიბიტორულ ეფექტს (74% ინჰიბირება). ქიმერული IgG1 ფორმას [224G11]chim, როგორც მოსალოდნელი იყო, გააჩნია დოზადამოკიდებული საკუთარი აგონისტური ეფექტი და თავის ფორმასთან შედარებით უფრო დაბალი ანტაგონისტური ეფექტი: 33% შედარებით 74% ინჰიბირებასთან. ამ ექსპერიმენტში [224G11][TH7 chim]-ს გააჩნდა ძლიერ სუსტი აგონისტური აქტივობა. გარდა ამისა, მან გამოამჟღავნა მაღალი ინჰიბიტორული ეფექტი (81%), რომელიც ახლოს არის თავის Mab-ის აღნიშნულ ეფექტთან. ორ ჰუმანიზებულ ფორმას არ აღენიშნებოდა არავითარი აგონისტური ეფექტი და ანტაგონისტური ეფექტი ახლოს იყო თავის Mab-თვის ან [224G11][TH7 chim]-თვის მიღებულ ანტაგონისტურ ეფექტთან და იგი ტოლი იყო 67 და 76% ინჰიბირებისა [224G11][Hz1] და [224G11][Hz3]-თვის შესაბამისად.

მაგალითი 10: იზოტიპის გადართვა ინჟინერიით მიღებული [TH7] სახსრული უბნისათვის

[TH7] სახსრული უბნის თანამიმდევრობით, რომელიც შეესაბამება PKSCDCHCPPCP-ს, ინდუცირებული ფარმაკოლოგიური თვისებების მოდულაციის შეფასების მიზნით, იმუნოგლობულინის იზოტიპის ძირითად ჯაჭვში, ადამიანის IgG1-ის გამოკლებით, ზემოაღწერილი [TH7] თანამიმდევრობა გენეტიკურად გადატანილ იქნა ადამიანის IgG2 და IgG4-ის ძირითად ჯაჭვებში. სახსრული უბნის მოდიფიკაცია განხორციელებულ იქნა

{NheII-BclI} რესტრიქციის ფრაგმენტის შეცვლით [TH7] მოდიფიკაციის მატარებელი კევივალენტური ნაწილით. {NheI-BclI} ფრაგმენტი სინთეზირებული იყო გლობალური გენური სინთეზის საშუალებით (Genecust, LU). კლონირების ეტაპები შესრულებულ იქნა ჩვეულებრივი მოლეკულურ-ბიოლოგიური ტექნიკის გამოყენებით, რომელიც აღწერილია ლაბორატორიულ სახელმძღვანელოში (Sambrook and Russel, 2001) ან მომწოდებლის ინსტრუქციების მიხედვით. თითოეული გენეტიკური კონსტრუქცია სრულად შემოწმებული იყო ნუკლეოტიდების თანამიმდევრობის განსაზღვრით Big Dye terminator cycle sequencing კომპლექტის (Applied Biosystems) გამოყენებით და ანალიზირებულ იქნა 3100 Genetic Analyzer-ის გამოყენებით (Applied Biosystems, US). შედეგად მიღებული თანამიმდევრობები აღნიშნულია SEQ ID No; 78, 79, 80 და 81, ადამიანის IgG2 და IgG4 TH7-ინჟინირებული იზოტიპების შესაბამისი ამინომჟავებისა და ნუკლეოტიდების თანამიმდევრობებისთვის (მხოლოდ მძიმე ჯაჭვი, მსუბუქი ჯაჭვი c224G11/human Ckappa-ს იდენტური იყო, რომელიც გამოიყენებოდა ყველა დანარჩენი IgG1-დაფუძნებულ კონსტრუქციებისათვის). ეს ახალი კონსტრუქციები გამოყენებულ იქნა ქიმერულ 224G11 ანტი-c-Met Mab-ში, როგორც აღწერილი იყო ზემოთ, მაგალითში 2.

გენური ინჟინერიით მიღებული შესაბამისი ანტისხეულების c224G11[IgG2TH7] და c224G11[IgG4TH7] წარმოება მიმდინარეობდა ზემოაღწერილის მიხედვით, ტრანზიტული ექსპრესიის საშუალებით სუსპენზია-ადაპტირებულ HEK293 EBNA უჯრედებში.

მაგალითი 11: ინჟინერიით მიღებული Mab-ების c224G11[IgG2TH7] და c224G11[IgG4TH7] შეფასება ფოსფო-c-Met-სპეციფიკურ ELISA ანალიზში და BRET ანალიზში

TH7 სახსარი ასევე შეტანილ იქნა IgG2 და IgG4 ქიმერულ 224G11 Mab-ებში და ტესტირებულ იქნა c-Met რეცეპტორის ფოსფორილების ანალიზის საშუალებით. როგორც 14A და 14B ნახაზებიდან ჩანს, c224G11[IgG2TH7] და c224G11[IgG4TH7] ცალცალკე იწვევს სუსტ აგონისტურ ეფექტს, რომელიც მნიშვნელოვნად უფრო სუსტია, ვიდრე c224G11 Mab-ის აგონისტური ეფექტი, და ამჟღავნებს 224G11 Mab-ის თავის ფორმის (m224G11) შესადარ ანტაგონისტურ ეფექტს. ეს შედეგი დადასტურებული იყო c-Met აქტივაციის

BRET მოდელით (ფიგ.15), სადაც c224G11[IgG2TH7] და c224G11[IgG4TH7]-მა აჩვენა აგრეთვე უფრო სუსტი აგონისტური ეფექტი, ვიდრე c224G11 Mab-მა.

ამრიგად, TH7 სახსარის მუტაცია შეტანილი IgG2 ან IgG4 Mab ფორმატში იძლევა c224G11[TH7]-ის მსგავს თვისებებთან ფუნქციურ ანტისხეულებს.

მაგალითი 12 უჯრედების ადჰეზიის ანალიზი

PC3 პროსტატის კიბოს უჯრედები აშრევებულ იქნა თასიდან ტრიპსინით, გარეცხილ იქნა 3-ჯერ უშრატო F12k გარემოთი და რესუსპენდირებულ იქნა იმავე გარემოში. უჯრედები (100.000 უჯრედი/ფოსო) დათესილ იქნა 96-ფოსოიან Laminin 1-ით (1 მკგ/მლ) გადაფარულ თასებში. ერთდროულად დამატებულ იქნა ანტი-CD151 Mab-ის მომდევნო ფორმები, საბოლოო კონცენტრაციით 10 მკგ/მლ: თავის IgG1 Mab m214B2, c214B2-ად წოდებული, არამოდიფიცირებული ქიმერული IgG1 ანტისხეულის ფორმა და ქიმერული IgG1 ანტისხეულის ფორმა TH7 მოდიფიკაციით, რომელსაც ეწოდება cTH7-214B2.

CD151 არის მემბრანული პროტეინი, რომელიც ეკუთვნის ტეტრასპანინების ოჯახს, ხოლო ანტი-CD151 Mab 214B2 წარმოებულია ჰიბრიდომას საშუალებით, რომელიც რეგისტრირებულია I-3919, CNCM-ში 2008 წლის 21 თებერვალს და აღწერილია გამოქვეყნებულ პატენტის განაცხადში WO 2009/136070.

თავისა და ადამიანის IgG1 ანტისხეულები გამოყენებული იყო როგორც იზოტიპის კონტროლის ანტისხეულები. საბოლოო პირობები შემდეგი იყო: 100000 უჯრედი/ფოსოზე და ანტისხეულების 10 მკგ/მლ. 37°C ტემპერატურის პირობებში ერთი საათის განმავლობაში ინკუბაციის შემდეგ, თასები სწრაფად იქნა გამოღებული და გარეცხილი ორჯერ უშრატო F12k გარემოში. ანალიზამდე 100 მკლ უშრატო F12k გარემო განაწილებულ იქნა თითოეულ ფოსოში. უჯრედების ადჰეზიაზე ანტისხეულების გავლენის შეფასების მიზნით, ფოსოები გადაღებულ იქნა ფაზა-კონტრასტულ მიკროსკოპში (ფიგ.16). ადჰეზირებული უჯრედების რიცხვი განსაზღვრულ იქნა ATP ანალიზის საშუალებით (ფიგ.17).

თავის 214B2 და ქიმერულ TH7-214B2 ანტისხეულებს გააჩნიათ უჯრედი-უჯრედთან ურთიერთქმედების მოდიფიცირების (ფიგ.16) და

ეკვივალენტურად PC3 უჯრედების ადჰეზიის გაზრდის უნარი (ფიგ.17). ამავე დროს, არავითარი გავლენა არ აღინიშნებოდა არამოდიფიცირებული ქიმერული ფორმისა 214B2 (c214B2), რომელიც შესაძარია ადამიანის IgG1 იზოტიპის კონტროლის ანტისხეულის.

gamogonebis formula

1. ხერხი სპეციფიკურ სამიზნე მოლეკულის წინააღმდეგ მიმართული IgG1 მონოკლონური ანტისხეულის ან მისი ორვალენტიანი ფუნქციური ფრაგმენტის ან წარმოებულის ანტაგონისტური აქტივობის გაუმჯობესებისათვის, ამასთან აღნიშნულ ანტისხეულს გააჩნია სამიზნე მოლეკულის ერთი ან მეტი ბიოლოგიური აქტივობის ინჰიბირების უნარი, სადაც ხერხი ითვალისწინებს აღნიშნული IgG1 ანტისხეულის სახსრული უბნის რეკონფიგურაციის ეტაპს, ამასთან სახსრული უბანი შეიცავს ნაშთებს H1-H14 და რეკონფიგურაციის ეტაპში გათვალისწინებულია სახსრული უბნის ამინომჟავური თანამიმდევრობის მოდიფიკაცია, სადაც აღნიშნული მონოკლონური ანტისხეული IgG1 ან მისი ორვალენტიანი ფუნქციური ფრაგმენტი ან წარმოებული შეიცავს სახსრული უბნის მოდიფიცირებულ ამინომჟავურ თანამიმდევრობას, შერჩეულს ჯგუფიდან: SEQ ID No. 2-6, SEQ ID No. 22-26, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 33-39 და SEQ ID No. 41-49.

2. ხერხი, მ. 1 მიხედვით, სადაც აღნიშნული მონოკლონური ანტისხეული არის ორვალენტიანი ანტისხეული.

3. ხერხი, მ. 1 ან 2 მიხედვით, სადაც აღნიშნული მონოკლონური ანტისხეული არის ქიმერული ანტისხეული.

4. ხერხი, მ. 1 ან 2 მიხედვით, სადაც აღნიშნული მონოკლონური ანტისხეული არის ჰუმანიზებული ანტისხეული.

5. ხერხი, მ. 1-4 ნებისმიერმის მიხედვით, სადაც აღნიშნული სამიზნე მოლეკულა არის ტრანსმემბრანული რეცეპტორი.

6. ხერხი, მ.5-ის მიხედვით, სადაც აღნიშნული ტრანსმემბრანული რეცეპტორი შერჩეულია ჯგუფიდან, რომელიც შედგება ტიროზინ კინაზას რეცეპტორებიდან, ტეტრასპანინიდან და GPCR-ებიდან.

7. სპეციფიკური სამიზნე მოლეკულის წინააღმდეგ მიმართული ანტაგონისტური მონოკლონური IgG1 ანტისხეულის, ან მისი ორვალენტური ფუნქციური ფრაგმენტის ან წარმოებულის სკრინინგის ხერხი, ამასთან აღნიშნულ ანტისხეულს გააჩნია სამიზნე მოლეკულის ერთი ან მეტი ბიოლოგიური აქტივობის ინჰიბირების უნარი, სადაც აღნიშნული ხერხი ითვალისწინებს ეტაპებს:

(a) საწყისი ანტისხეულის არჩევას, რომელსაც გააჩნია აღნიშნული სამიზნე მოლეკულის ერთი ან მეტი ბიოლოგიური აქტივობის ინჰიბირების საწყისი დონე,

(b) აღნიშნული საწყისი ანტისხეულის სახსრული უბნის ამინომჟავური თანამიმდევრობის მოდიფიცირებას, სადაც აღნიშნული ხერხი შეიცავს სახსრული უბნის რეკონფიგურაციის ეტაპს, რომელიც ითვალისწინებს აღნიშნული სახსრული უბნის ამინომჟავური თანამიმდევრობის მოდიფიკაციას, სულ მცირე, ერთი ამინომჟავას დელეციით, დამატებით ან ჩანაცვლებით,

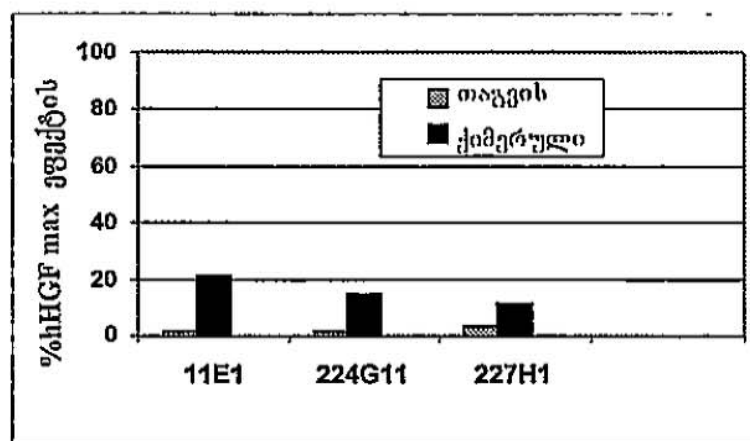
(c) ეტაპზე (b) მოდიფიცირებული ანტისხეულის მიერ აღნიშნული სამიზნე მოლეკულის ერთი ან მეტი ბიოლოგიური აქტივობის ინჰიბირების უნარის შეფასებას, და

(d) ეტაპზე (c) გამოვლენილი დადებითი შედეგის მქონე იმ ანტისხეულის არჩევას, რომელსაც გააჩნია აღნიშნული სამიზნე მოლეკულის საწყის დონეზე ერთი ან მეტი ბიოლოგიური აქტივობის ინჰიბირების უფრო მაღალი დონე.

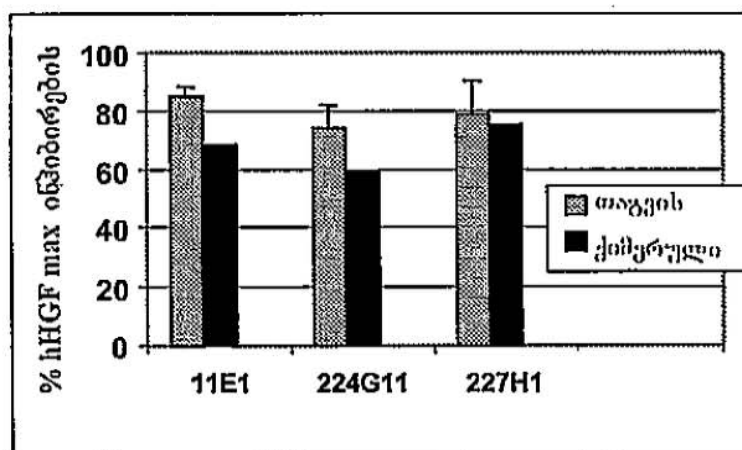
8. იზოლირებული ნუკლეინმჟავა, რომლითაც კოდირებულია მოდიფიცირებული მონოკლონური ანტისხეული მუხლების 1-7 მიხედვით.

9. იზოლირებული ნუკლეინმჟავა, მ.8 მიხედვით, სადაც აღნიშნული ნუკლეინმჟავა შეიცავს ნუკლეოტიდურ თანამიმდევრობას, შერჩეულს ჯგუფიდან: SEQ ID No. 16-20, SEQ ID No. 50-54, SEQ ID No. 56, SEQ ID No. 57, SEQ ID No. 61-67 და SEQ ID No. 69-77.

1/15

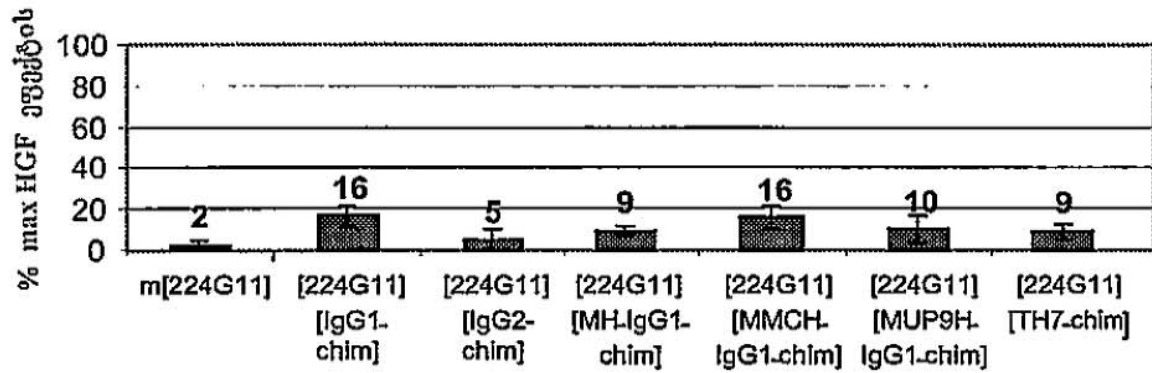


ფიგურა 1A

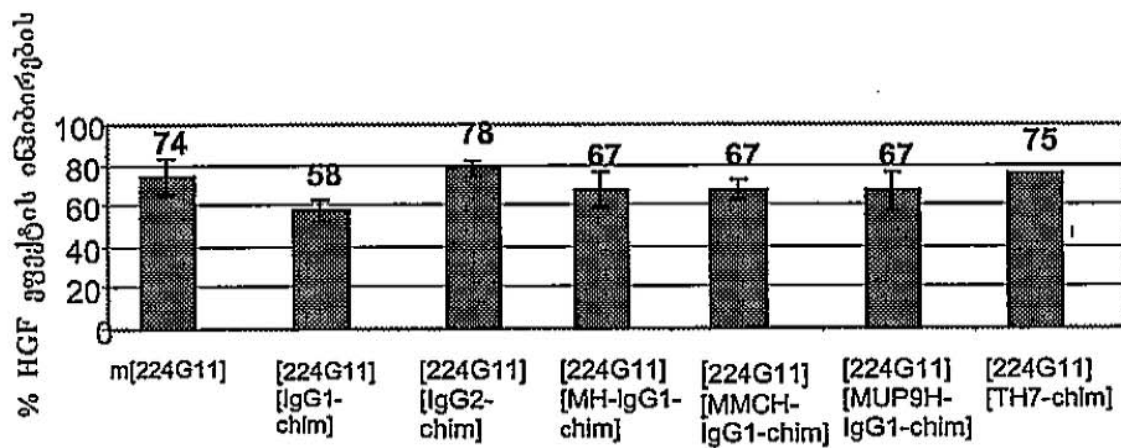


ფიგურა 1B

2/15

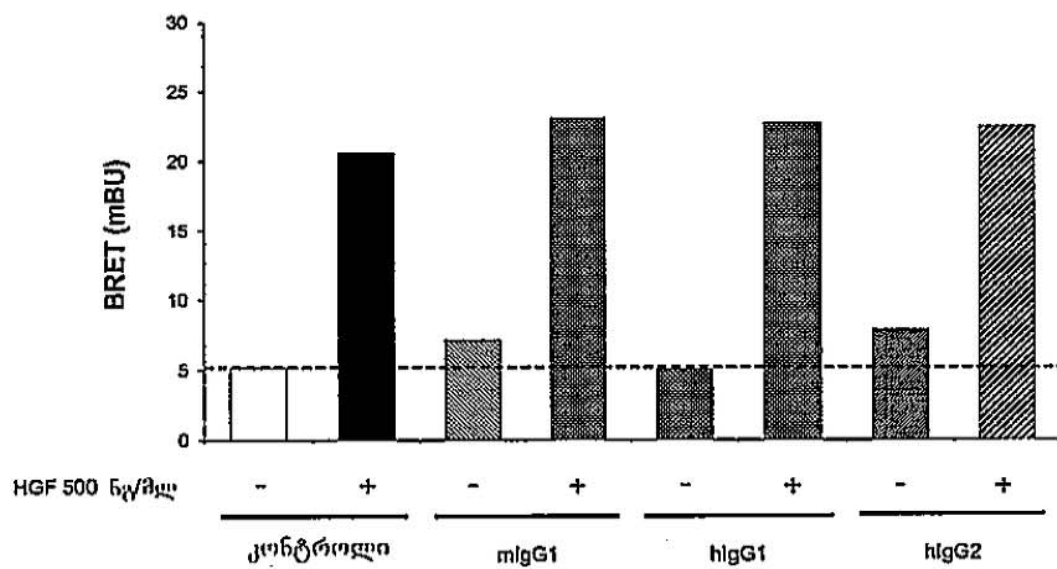


ფიგურა 2A

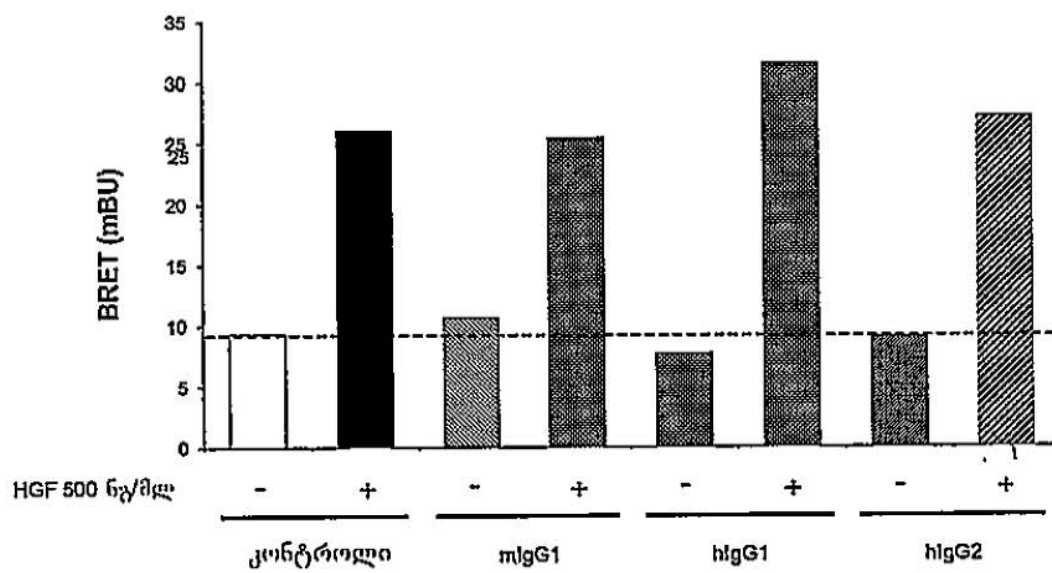


ფიგურა 2B

3/15

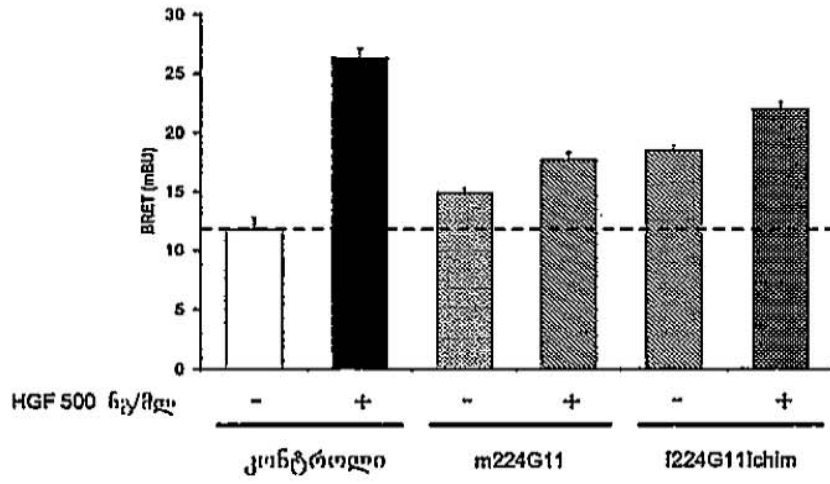


ფიგურა 3A

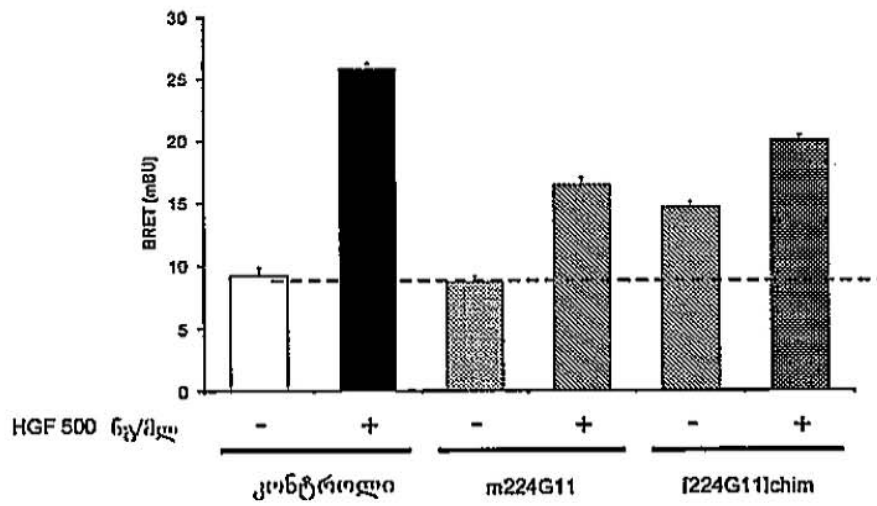


ფიგურა 3B

4/15

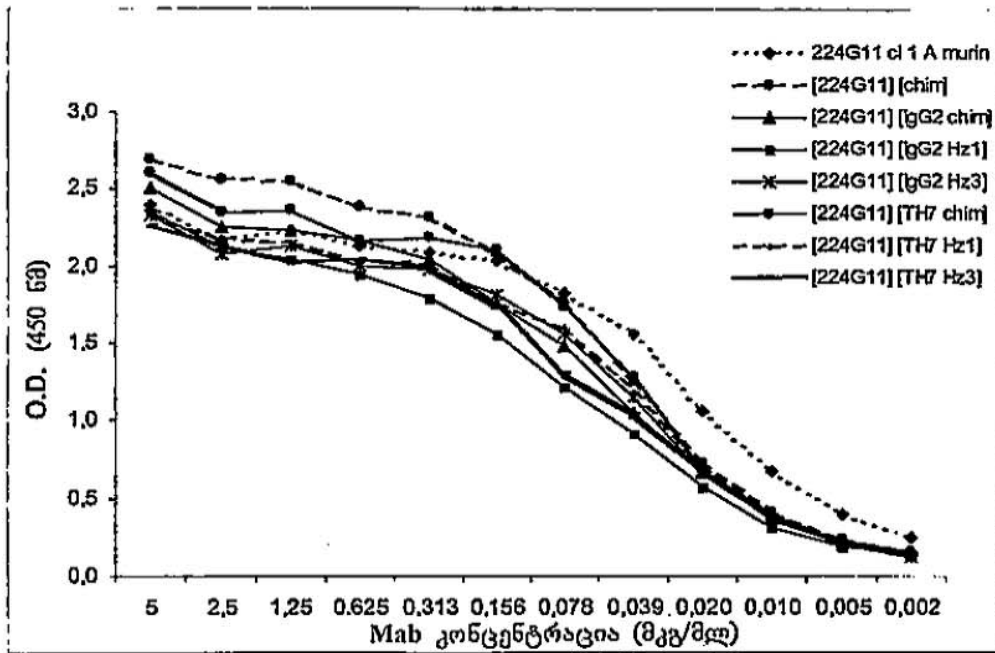


ფიგურა 4

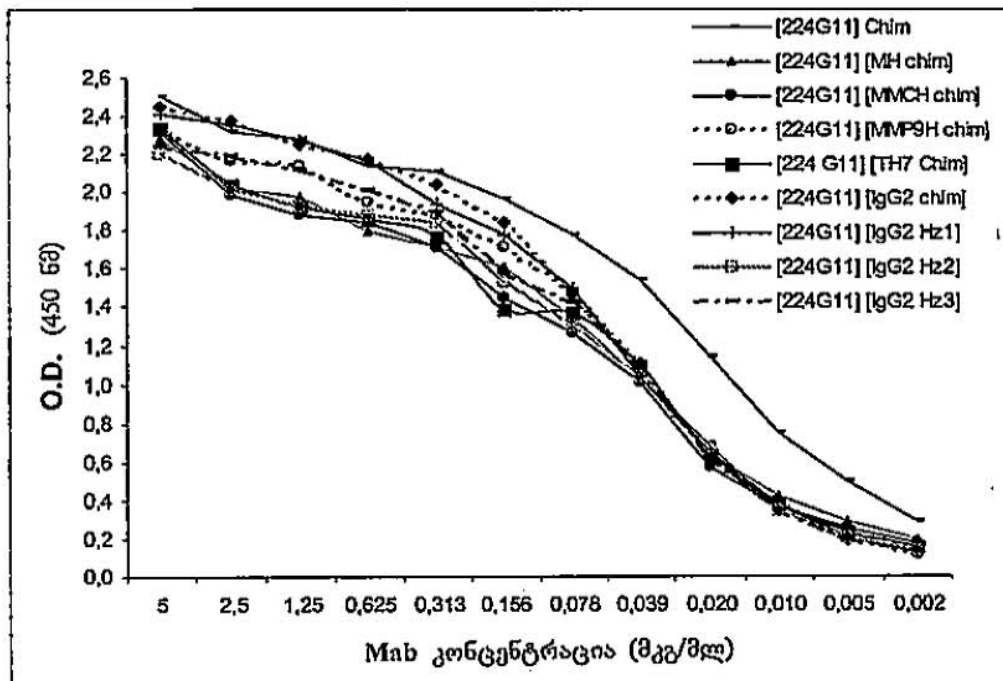


ფიგურა 5

5/15

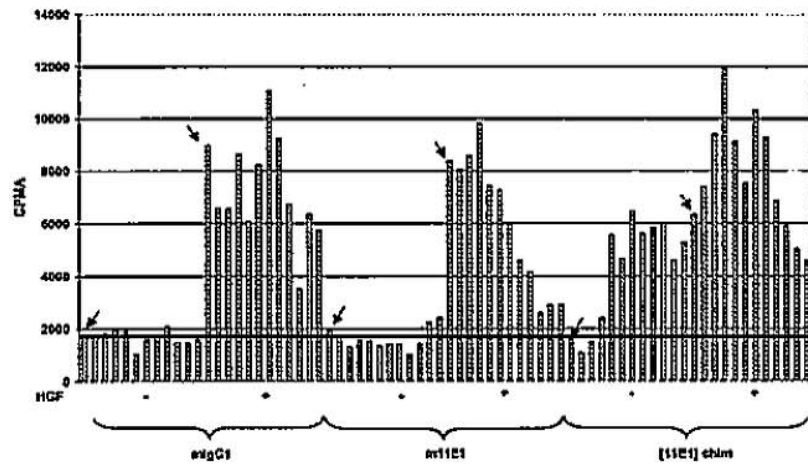


ფიგურა 6A

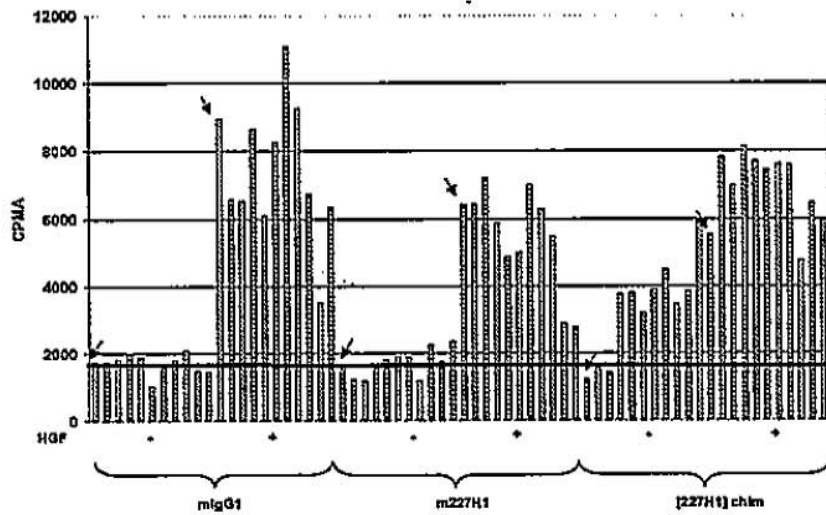


ფიგურა 6B

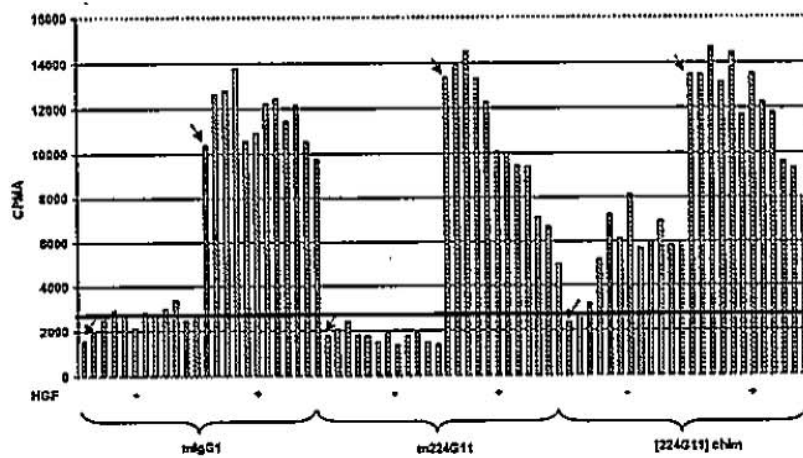
6/15



ფიგურა 7A

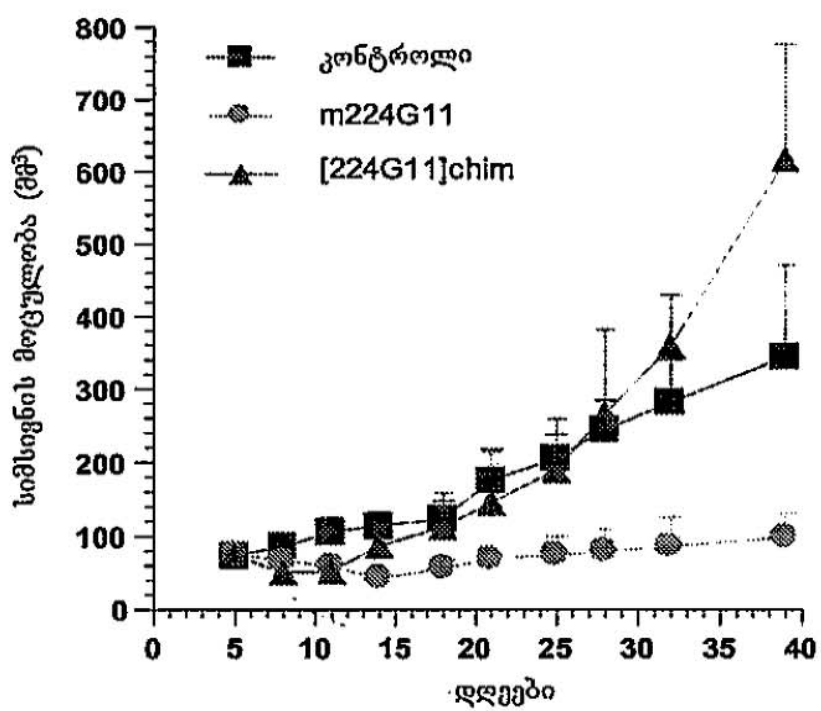


ფიგურა 7B



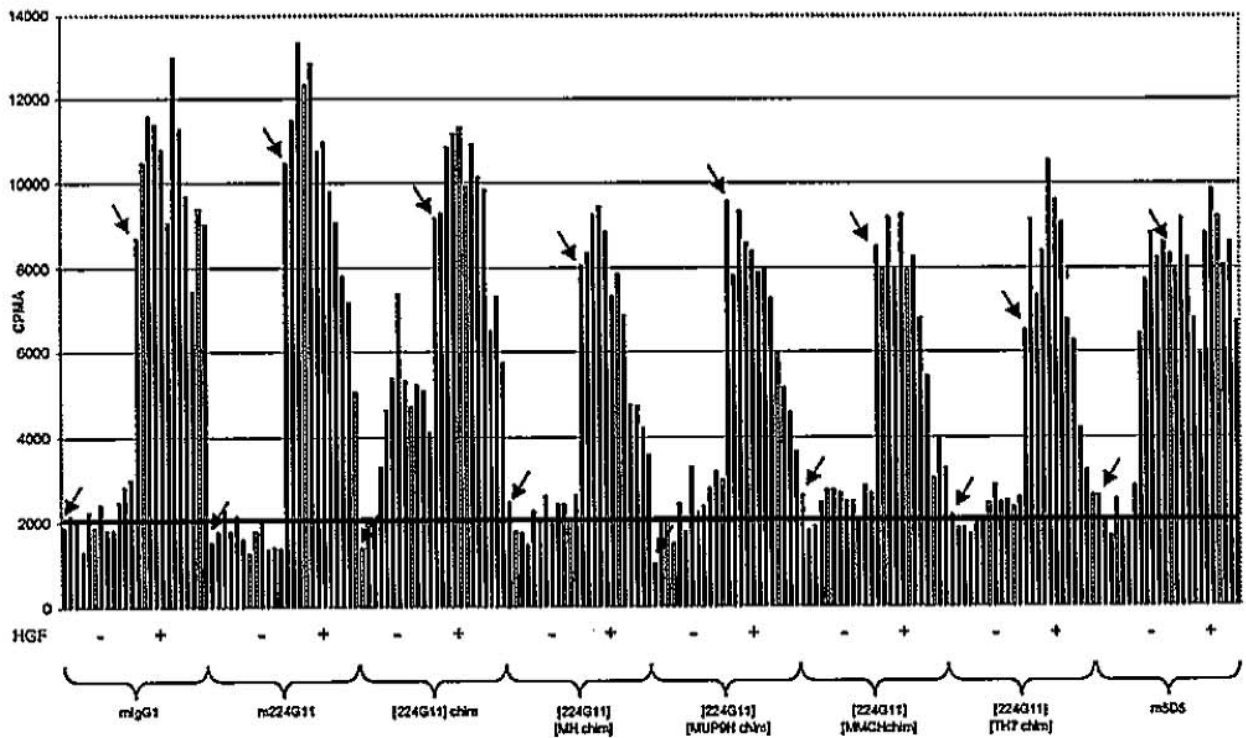
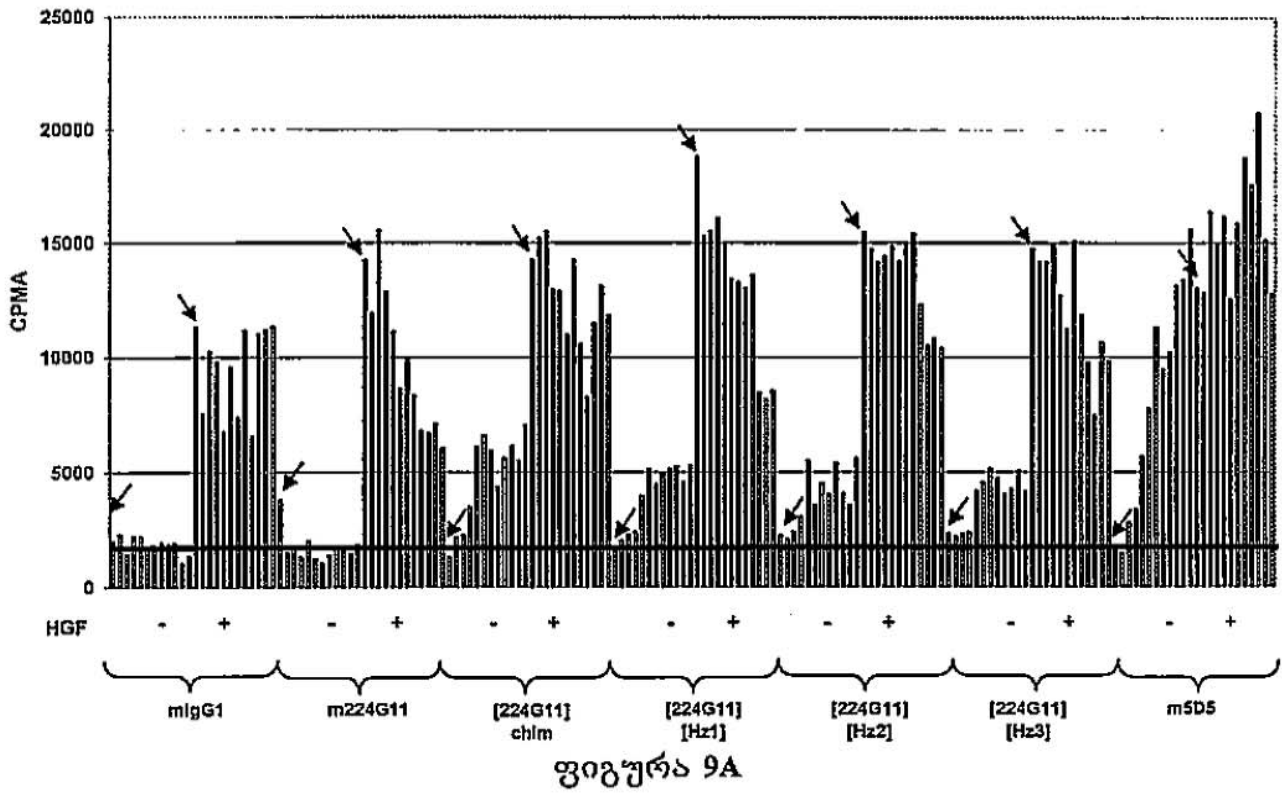
ფიგურა 7C

7/15



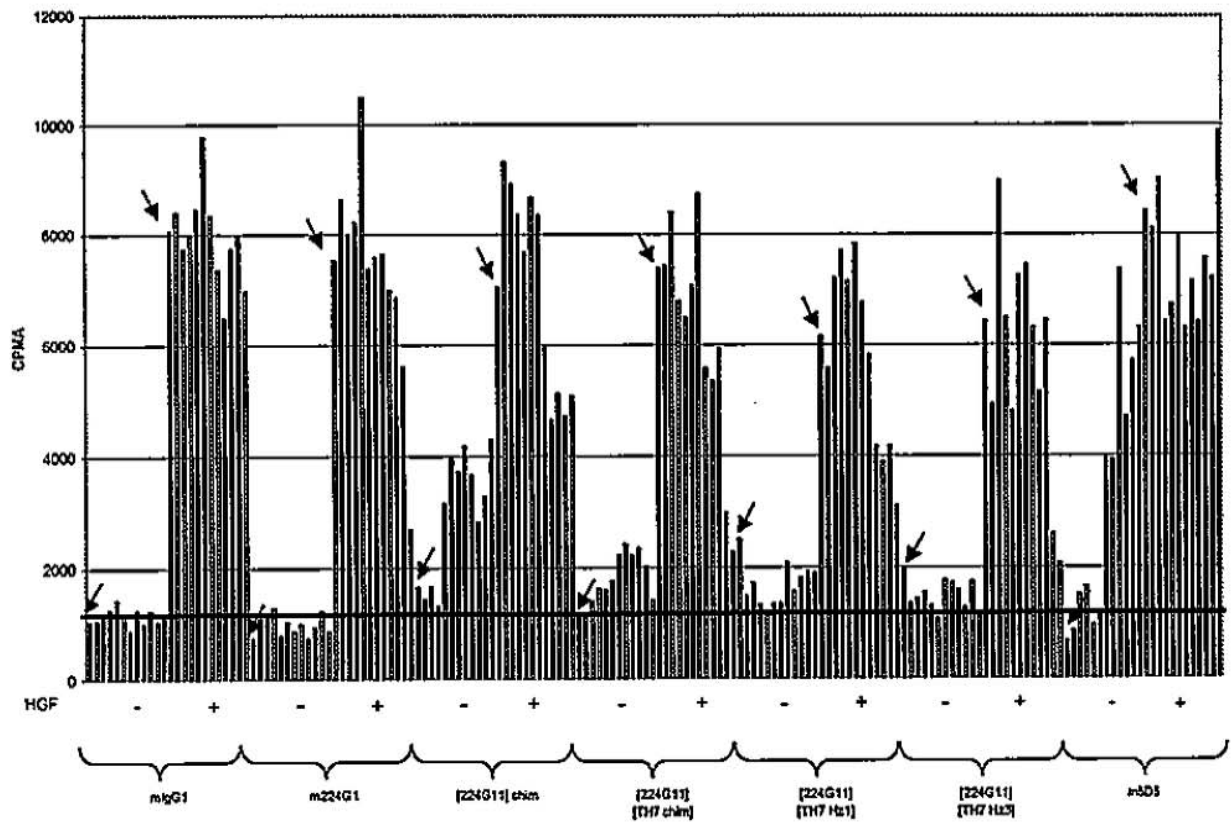
ფიგურა 8

8/15



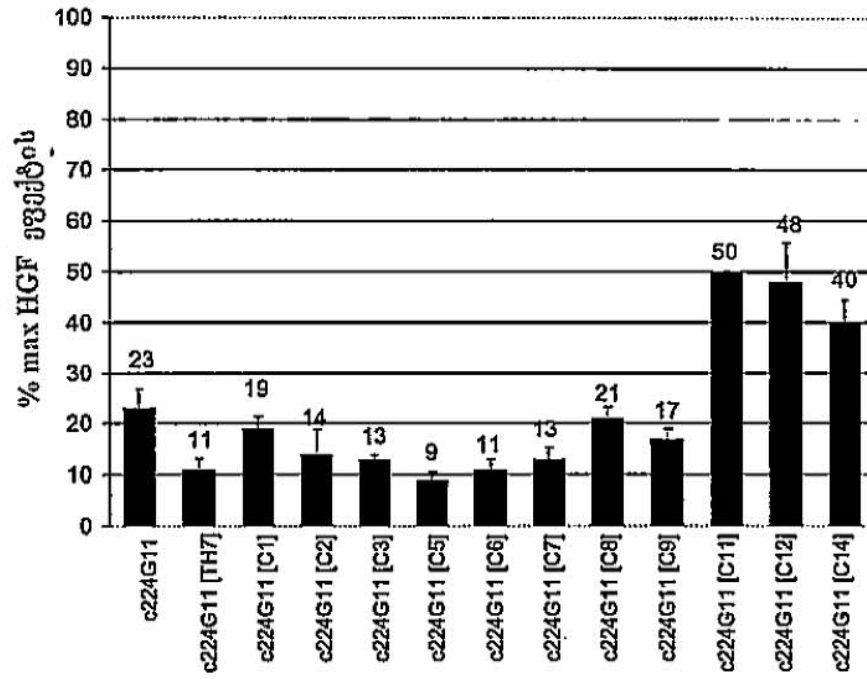
ფიგურა 9B

9/15

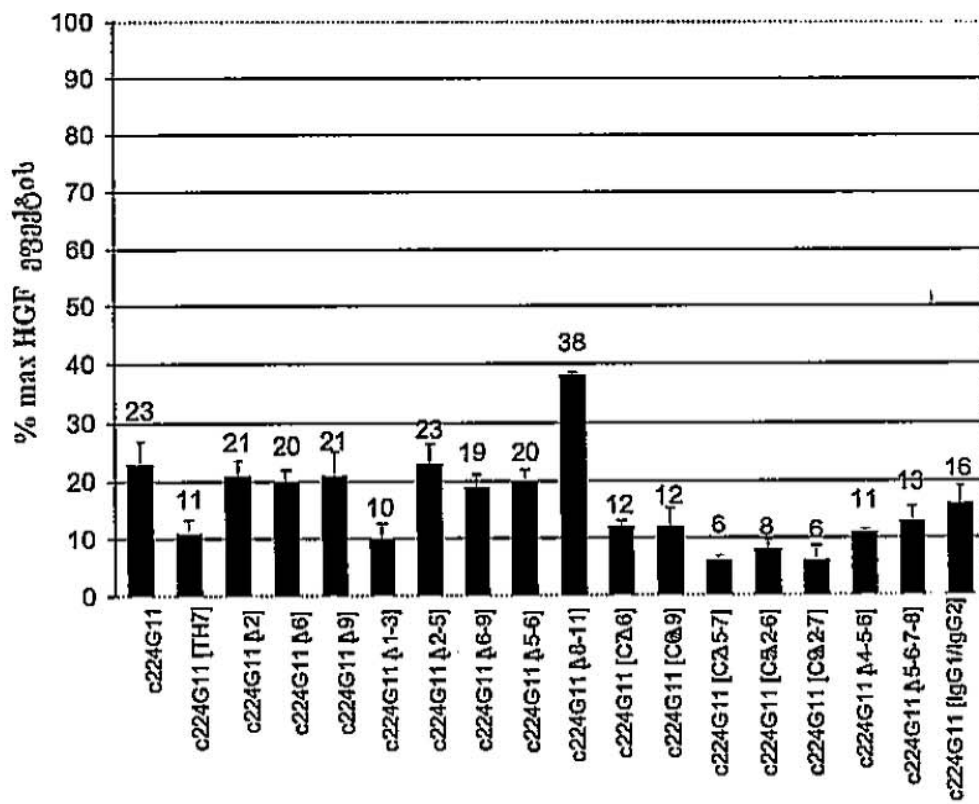


ფიგურა 10

10/15

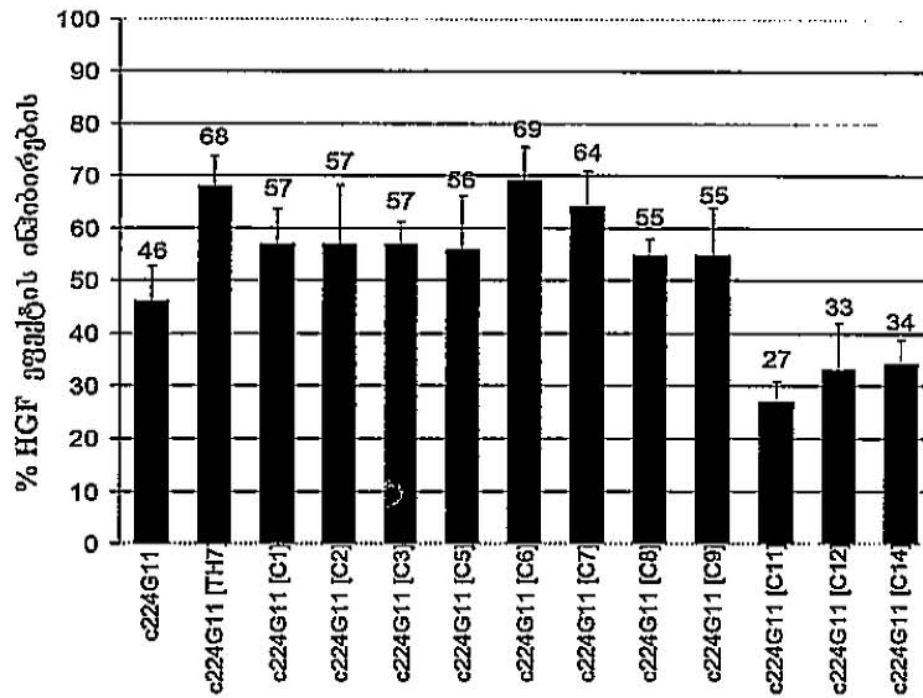


ფიგურა 11A

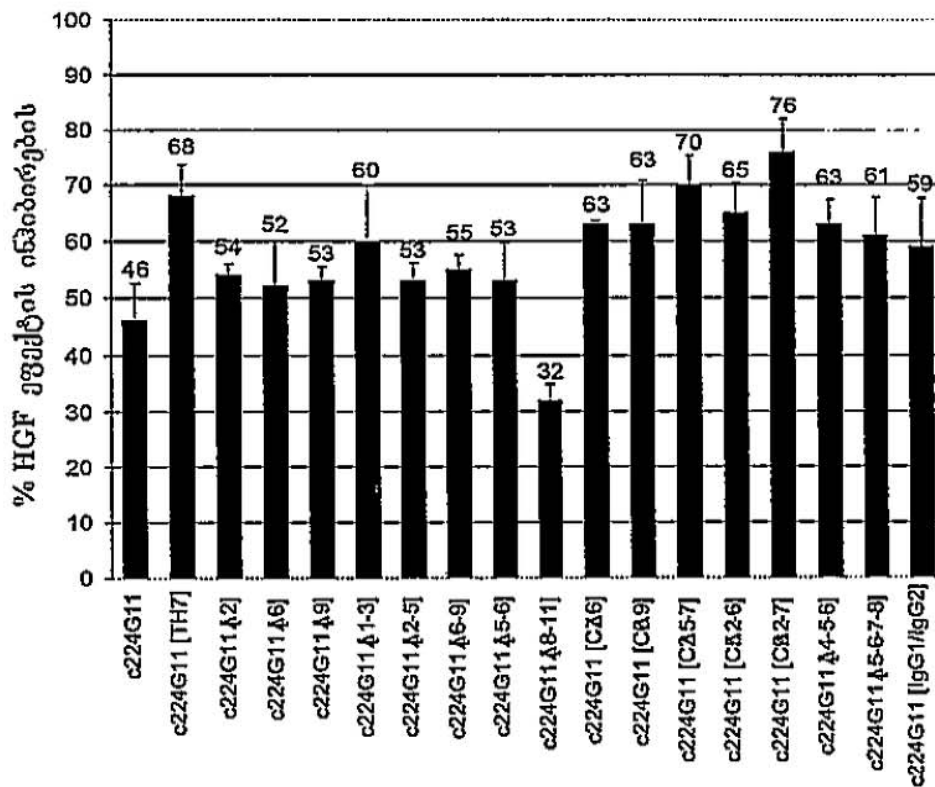


ფიგურა 11B

11/15

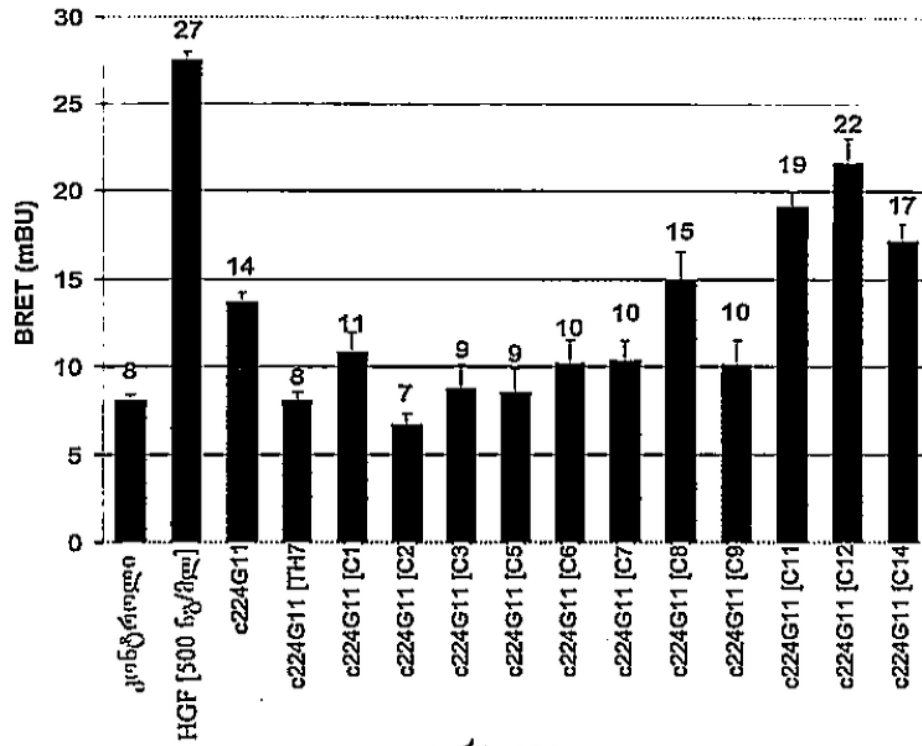


ფიგურა 12A

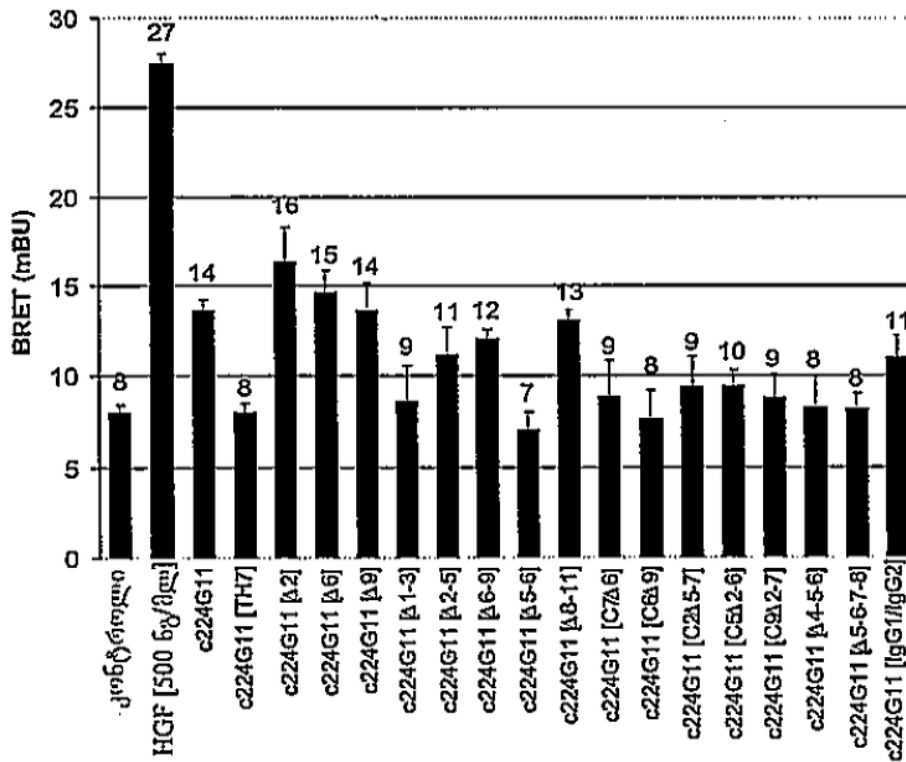


ფიგურა 12B

12/15

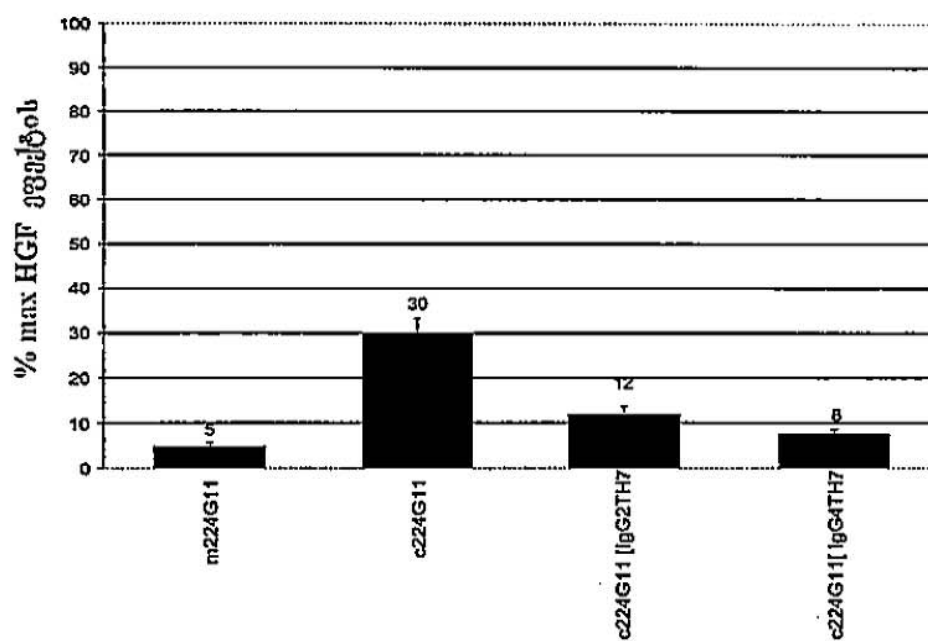


ფიგურა 13A

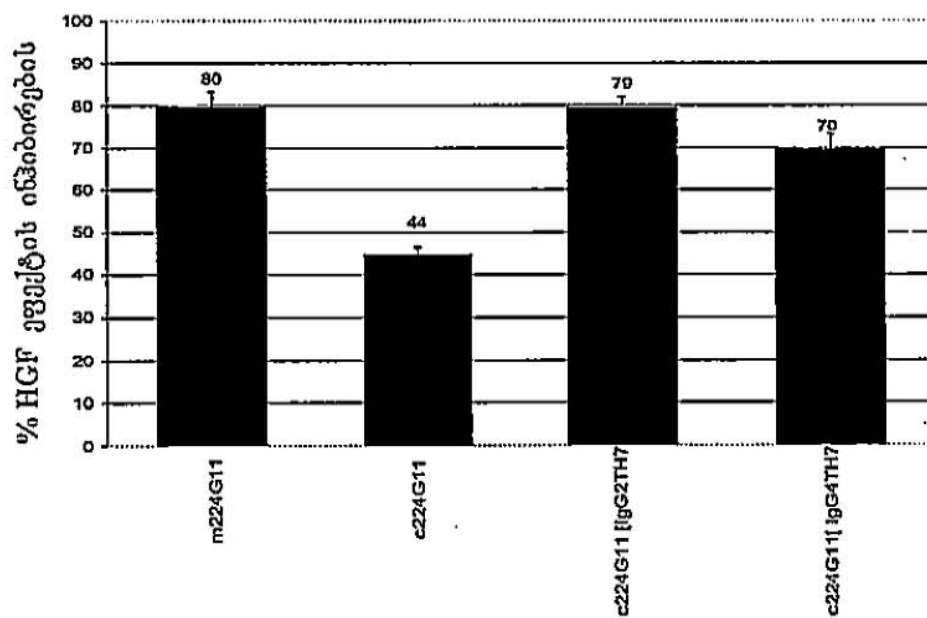


ფიგურა 13B

13/15

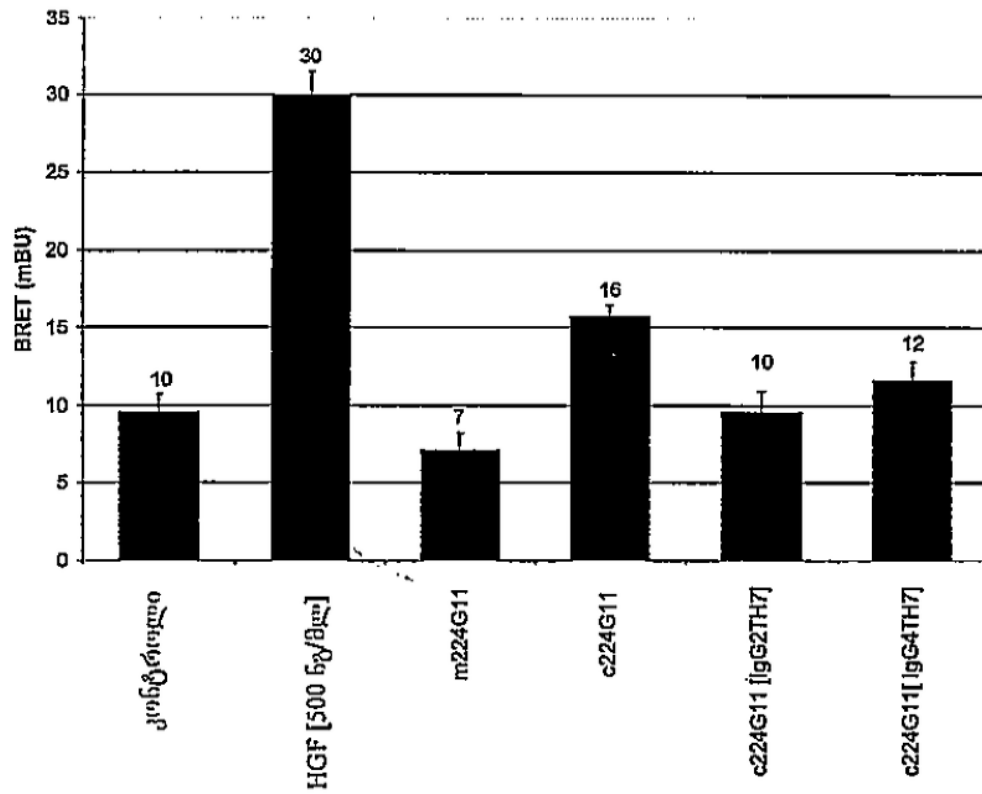


ფიგურა 14A



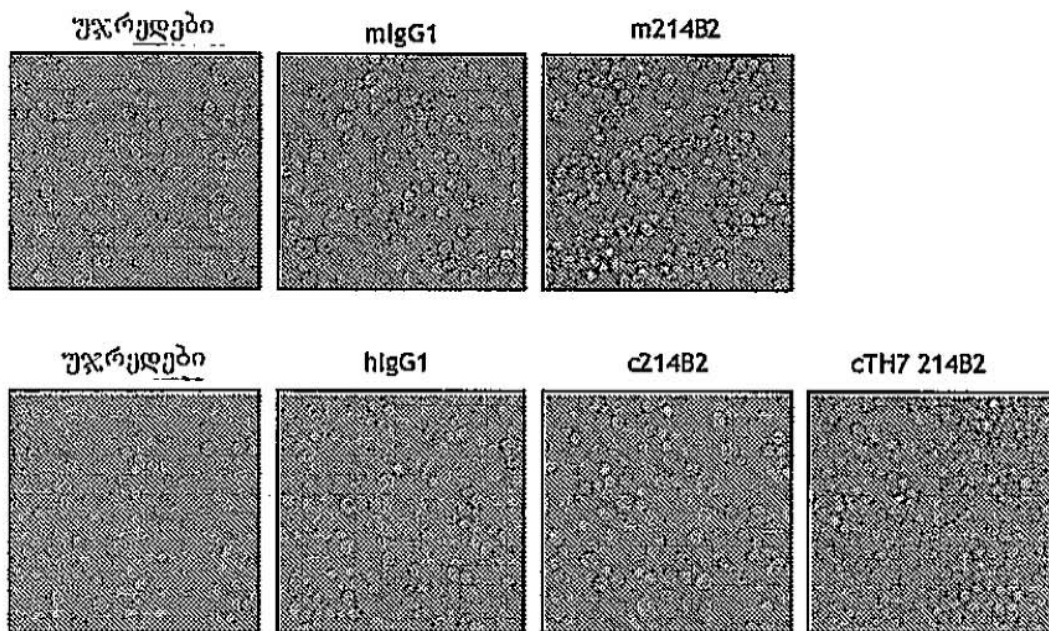
ფიგურა 14B
66

14/15

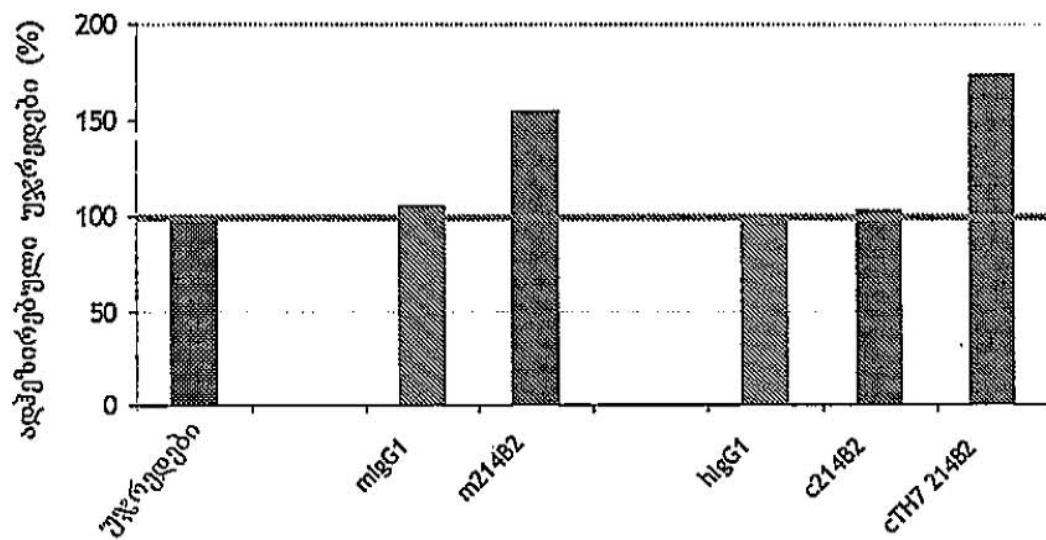


ფიგურა 15

15/15



ფიგურა 16



ფიგურა 17

თანამშრომლობითი ჩამონათვალი

<110> კიბრ ზაბრ გეოკაჩინტი
 <120> მიმოკლონური ანტისხეულის ანტაგონისტური აქტივობის
 მოდულაციის ხერხი
 <130> D27128
 <140> PCT EP2009/066205
 <141> 2009-12-02
 <150> IB2008/055664
 <151> 2008-12-02
 <150> US 61/184406
 <151> 2009-06-05
 <160> 81
 <170> PatentIn ვერსია 3.3
 <210> 1
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> ხელოვნური
 <220>
 <223> ხელოვნური მოდიფიცირებული სახსრული უბანი
 <400> 1
 Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> ხელოვნური
 <220>
 <223> ხელოვნური მოდიფიცირებული სახსრული უბანი
 <400> 2
 Pro Lys Ser Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> ხელოვნური
 <220>
 <223> ხელოვნური მოდიფიცირებული სახსრული უბანი
 <400> 3
 Pro Lys Ser Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Pro

1 5 10

<210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 4

Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 5

Pro Arg Asp Cys Gly Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 6

Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 7

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 8

Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser
 1 5 10 15

Pro Ser

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 9

Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5

<210> 10

<211> 56

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 10

Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala Gln Pro Gln Ala
 1 5 10 15

Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn
 20 25 30

Thr Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln
 35 40 45

Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro
 50 55

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 11

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 12

<211> 63

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 12

Leu Lys Thr Pro Leu Phe Thr Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg
 1 5 10 15

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 20 25 30

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 35 40 45

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 50 55 60

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 13

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
 1 5 10

<210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 14

Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
 1 5 10

<210> 15
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 15
 ccccgaggact gtgggtgcaa gccttgcatt tgtacc 36

<210> 16
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 16
 cccaagagct gtgggtgcaa gccttgcatt tgtacc 36

<210> 17
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> artificial modified hinge region

 <400> 17
 ccaaagagct gcggtgcaa gccttgatc tgtccc 36

 <210> 18
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> artificial modified hinge region

 <400> 18
 ccacgggact gtggctgcaa gccctgccct cctgtcca 39

 <210> 19
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> artificial modified hinge region

 <400> 19
 ccagagact gtgggtgtca cacctgccct ccttgctc 39

 <210> 20
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> artificial modified hinge region

 <400> 20
 cccaaaagct gcgattgcca ctgtcctcca tgtcca 36

 <210> 21
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

 <400> 21
 aggaagtgt gtgtggagtg cccccctgc cca 33

 <210> 22
 <211> 14

<212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 22

Cys Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 23

Pro Cys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 24
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 24

Pro Lys Cys Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 25

Pro Lys Ser Cys Cys Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 26

Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 27

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 28

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Cys Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 29

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Cys Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 30

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Cys Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 31

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Cys Cys Pro
 1 5 10

<210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 32

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Cys
 1 5 10

<210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 33

Pro Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 34
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 34

Pro Lys Ser Cys Asp Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 35
 <211> 13
 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 35

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 36

Lys Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 37

Pro Ser Cys Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 38

Pro Lys Ser Cys Asp Thr His Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 39

Pro Lys Ser Cys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 40

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Thr Cys Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 41

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Cys Pro Pro Cys
1 5 10

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 42

Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 43

Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr His Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 44
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 44

Pro Cys Ser Cys Lys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 45
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 45

Pro Ser Cys Cys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 46
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 46

Pro Ser Cys Asp Lys His Cys Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 47
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 47

Pro Lys Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 48

Pro Lys Ser Cys Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 49

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 50

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 50

tgcaagagct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 51

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 51

ccctgcagct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 52

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 52

cccaagtgt gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 53

<211> 42
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 53
 cctaagagct gttgcaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 54
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 54
 cccaagagct gcgactgcac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 55
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 55
 cccaagagct gcgacaagtg ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 56
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 56
 cccaagagct gcgacaagac ctgtacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 57
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 57
 cccaagagct gcgacaagac ccactgctgt cccccctgcc ct 42

<210> 58
 <211> 42

<212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 58
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgt tgcccoctgcc ct 42

<210> 59
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 59
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgt cctgtctgcc ct 42

<210> 60
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 60
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgt ccccocttgcct gc 42

<210> 61
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 61
 cccagctgcg acaagaccca cacctgtccc cctgtccct 39

<210> 62
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region

<400> 62
 cccaagagct gcgacaccca cacctgtccc cctgtccct 39

<210> 63
 <211> 39
 <212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 63

cccaagagct gcgacaagac ccactgcccc ccctgcct

39

<210> 64

<211> 36

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 64

aagtgcgaca agacccacac ctgtcccccc tgcct

36

<210> 65

<211> 36

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 65

cccagctgca agacccacac ctgtcccccc tgcct

36

<210> 66

<211> 36

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 66

cccaagagct gcgacaccca ctgccccccc tgcct

36

<210> 67

<211> 36

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 67

cccaagagct gcacccacac ctgtcccccc tgcct

36

<210> 68

<211> 36

<212> DNA

<213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region
 <400> 68
 cccaagagct gcgacaagac cacctgtccc tgcctt 36

<210> 69
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region
 <400> 69
 cccaagagct gcgacaagac ccaactgcccc ccctgc 36

<210> 70
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region
 <400> 70
 cccaagagct gcgactgcca cacctgtccc ccctgcct 39

<210> 71
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region
 <400> 71
 cccaagagct gcgactgcac ccaactgcccc ccctgcct 39

<210> 72
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> artificial modified hinge region
 <400> 72
 ccctgcagct gcaagcacac ctgtcccccc tgcctt 36

<210> 73
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 73

cctagctgct gcacccacac ctgtcccccc tgcct 36

<210> 74

<211> 36

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 74

cccagctgcg acaagcactg ctgcccccc tgcct 36

<210> 75

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 75

cccaagagca cccacacctg tcccccttgt cct 33

<210> 76

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 76

cccaagagct gcacctgtcc cccttgctct 30

<210> 77

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 77

cccaagagct gcgataagtg cgtggagtgc cccccctgtc ct 42

<210> 78

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 78

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu

225		230		235		240									
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				245					250					255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
			260						265				270		
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
		275					280					285			
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
	290					295					300				
Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
305					310					315					320
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				325					330					335	
Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
			340					345					350		
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
		355					360					365			
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
	370					375					380				
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
385					390					395					400
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
			405						410					415	
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
			420					425					430		
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
	435						440					445			

<210> 79
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 79

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225		230		235		240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro	245		250		255	
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val	260		265		270	
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr	275		280		285	
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val	290		295		300	
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	305		310		315	320
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser	325		330		335	
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	340		345		350	
Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	355		360		365	
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	370		375		380	
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	385		390		395	400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	405		410		415	
Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His	420		425		430	
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	435		440		445	

<210> 80

<211> 1338

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 80

```

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctgggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt    60
agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt    120
ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat    180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac    240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag    300
atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc    360
accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc ccctgcagca gaagcaccag cgagagcaca    420
gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaaac    480
agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccagccg tgctgcagag cagcggcctg    540
tacagcctga gcagcgtggt gacagtgcgc agcagcaact tcggcaccga gacctacacc    600
tgtaacgtgg accacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaccgtgga gccaagagc    660
tgcgattgcc actgcccccc ttgtcctgct cctcctgtgg ccggaccagc cgtgttctctg    720
ttccccccaa agcccaagga caccctgatg atcagccgga cccccaagt gacctgcgtg    780
gtggtggacg tgtcccacga ggaccccgag gtgcagttca attggtacgt ggacggcggtg    840
gaggtgcaca acgccaagac caagccccgg gaggaacagt tcaacagcac ctccggggtg    900
gtgtccgtgc tgaccgtggt gcaccaggac tggctgaacg gcaaagagta caagtgcgaag    960
gtctccaaca agggcctgcc tgccccatc gagaaaacca tcagcaagac caagggccag    1020
cctcgggagc ctcaggtgta caccctgccc ccagccggg agggaaatgac caagaaccag    1080
gtgtccctga cctgtctggt gaaaggcttc taccacagcg atatcgccgt ggagtgggag    1140
agcaacggcc agcccgagaa caactacaag accaccccccc ccatgctgga cagcgacggc    1200
agcttcttcc tgtactccaa actgaccgtg gataagagcc ggtggcagca gggcaacgtg    1260
ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gtccctgagc    1320
ctgagccccg gcaaatga                                     1338

```

<210> 81

<211> 1341

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificial modified hinge region

<400> 81

```

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctgggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt    60

```

agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt	120
ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat	180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac	240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcaagtgt actactgccc ccggtctgag	300
atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcaactgcac tgaccgtctc ctccgccagc	360
accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc ccctgcagca gaagcaccag cgagagcaca	420
gccgccctgg gctgcctgggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttgggaac	480
agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccgagcc tgctgcagag cagcggcctg	540
tacagcctga gcagcgtggt gacagtgcct agcagcagcc tgggcaccaa gacctacacc	600
tgtaacgtgg accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agcgggtgga gccaagagc	660
tgcgattgcc actgcccccc ttgccctgcc cctgagttcc tgggcccagc cagcgtgttc	720
ctgttcccc caaagcccaa ggacaccctg atgatcagcc ggacccccga agtgacctgc	780
gtggtggtgg acgtgtccca ggaagatccc gaggtgcagt tcaactggta cgtggacggc	840
gtggaggtgc acaacgcca gaccaagccc cgggaggaac agttcaacag cacctaccgg	900
gtggtgtccg tgotgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaaaga gtacaagtgc	960
aaggtgtcca acaagggcct gccagcagc atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc	1020
cagcctagag aaccocaggt gtacaccctg ccccccagcc aggaagagat gaccaagaac	1080
caggtgtccc tgacctgtct ggtgaaaggc ttctacccca gcgatatcgc cgtggagtgg	1140
gagagcaacg gccagccccga gaacaactac aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac	1200
ggcagcttct tcctgtactc ccggtgacc gtggacaaga gccgggtggc ggaaggcaac	1260
gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccttg	1320
agcctgagcc tgggcaaatg a	1341